

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL – UFMS
PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E
BIOLOGIA MOLECULAR – PMBqBM – SBBq

ANA LORENA DE OLIVEIRA SIMAS

**ESTUDO BIOQUÍMICO DE FITASE, PROTEASE E XILANASE
PRODUZIDAS POR FUNGOS FILAMENTOSOS USANDO FONTES DE
CARBONO ALTERNATIVAS: COMPARAÇÃO COM AS ENZIMAS
COMERCIAIS E APLICAÇÃO NA ALIMENTAÇÃO ANIMAL**

CAMPO GRANDE – MS

2023

ANA LORENA DE OLIVEIRA SIMAS

**ESTUDO BIOQUÍMICO DE FITASE, PROTEASE E XILANASE
PRODUZIDAS POR FUNGOS FILAMENTOSOS USANDO FONTES DE
CARBONO ALTERNATIVAS: COMPARAÇÃO COM AS ENZIMAS
COMERCIAIS E APLICAÇÃO NA ALIMENTAÇÃO ANIMAL**

Dissertação apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular – PMBqBM – SBBq, da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre.

Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Giovana Cristina Giannesi

Co-orientador: Prof. Dr. Charles Kiefer

CAMPO GRANDE – MS

2023

FICHA CATALOGRÁFICA

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Simas, Ana Lorena de Oliveira

Estudo bioquímico de fitase, protease e xilanase produzidas por fungos filamentosos usando fontes de carbono alternativas: comparação com as enzimas comerciais e aplicação na alimentação animal. – Campo Grande, 2023. 84 f.

Orientadora: Giannesi, Giovana Cristina.

Dissertação de Mestrado apresentada à Universidade Federal de Mato Grosso do Sul/UFMS. Instituto de Biociências, 2023.

TERMO DE APROVAÇÃO

ANA LORENA DE OLIVEIRA SIMAS

ESTUDO BIOQUÍMICO DE FITASE, PROTEASE E XILANASE PRODUZIDAS POR FUNGOS FILAMENTOSOS USANDO FONTES DE CARBONO ALTERNATIVAS: COMPARAÇÃO COM AS ENZIMAS COMERCIAIS E APLICAÇÃO NA ALIMENTAÇÃO ANIMAL

Dissertação apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular – PMBqBM – SBBq, da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, para a obtenção do título de Mestre em Ciências (Bioquímica e Biologia Molecular).

_____ de _____ de 2023.

Comissão Examinadora:

Prof^a. Dr^a. Giovana Cristina Giannesi (Orientadora)
Instituto de Biociências – INBIO
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS)

Prof^a. Dr^a. Fabiana Fonseca Zanoelo
Instituto de Biociências – INBIO
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS)

Prof^a. Dr^a. Karina Márcia Ribeiro de Souza Nascimento
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – FAMEZ
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS)

DEDICATÓRIA

Dedico essa dissertação ao meu pai, Roberto Alves Simas

AGRADECIMENTOS

Dentre aqueles que se fizeram presentes durante o processo de desenvolvimento do projeto, venho por aqui oferecer a minha gratidão:

Primeiramente a minha mãe Tania Maria de Arruda Oliveira por sempre me apoiar e incentivar a evoluir;

Ao meu irmão Gabriel de Oliveira pela companhia e carinho;

Aos meus familiares, a tia Jacy e o tio Antônio que me acolheram em Campo Grande e por sempre me apoiar;

A minha orientadora Prof.^a Dr.^a Giovana Cristina Giannesi pela amizade, paciência, orientação e dedicação;

Ao Prof. Dr. Charles Kiefer pelo apoio durante a execução do projeto;

A Prof.^a Dr.^a Fabiana Fonseca Zanoelo pela instrução e colaboração;

Aos meus colegas e amigos de laboratório (LBq-UFMS), Rodrigo Galeano, Jessica Teles, Nathalia Glienke, Nelciele Guimarães e a todos pela ajuda teórica e prática.

As instituições de fomento, CAPES e CNPq, pelo auxílio financeiro. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001;

Ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular – SBBq pela oportunidade de obter o título de Mestre em Bioquímica e Biologia Molecular;

À Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS) e a todos seus funcionários, alunos e professores pela estrutura acadêmica.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE TABELAS	10
LISTA DE SIMBOLOS E ABREVIATURAS	11
RESUMO	12
ABSTRACT.....	13
INTRODUÇÃO.....	14
1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
1.1 Fungos	16
1.2 Gênero <i>Aspergillus</i>	16
1.3 Gênero <i>Thermoascus</i>.....	18
1.4 Produção enzimática por microrganismos	18
1.5 Enzimas.....	20
1.5.1 Fitase	20
1.5.1.1 Ácido fítico.....	24
1.5.2 Protease.....	26
1.5.3 Xilanase.....	29
1.5.3.1 Xilana	32
1.6 Alimentação animal	33
2. OBJETIVOS.....	36
2.1 Objetivo geral	36
2.2 Objetivos específicos	36
3. MATERIAL E MÉTODOS	37
3.1 Microrganismos e manutenção de crescimento	37

3.2 Produção de fitase, protease e xilanase em cultivo semi-sólido (FSS) usando diferentes fontes de carbono	37
3.3 Efeito do tempo de crescimento na produção das enzimas	37
3.4 Ensaio de atividade enzimática e proteica	38
3.5 Enzimas comerciais.....	39
3.6 Caracterização bioquímica de fitase, protease e xilanase	39
3.6.1 Avaliação da temperatura na atividade enzimática	39
3.6.2 Avaliação do pH na atividade enzimática.....	39
3.7 Avaliação das atividades enzimáticas produzidas nesse estudo e das enzimas comerciais em diferentes alimentos para animais.....	40
3.8 Teste estatístico.....	41
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
4.1 Efeito de diferentes fontes de carbono na produção enzimática	42
4.2 Efeito do tempo de crescimento na produção das enzimas	45
4.3 Efeito da temperatura na atividade de fitase, protease e xilanase de <i>A. niveus</i> comparando com enzimas comerciais	48
4.4 Efeito do pH na atividade de fitase, protease e xilanase de <i>A. niveus</i> comparando com enzimas comerciais.....	51
4.5 Aplicação <i>in vitro</i> das enzimas produzidas por <i>A. niveus</i> e das enzimas comerciais nos alimentos para animais.....	54
5. CONCLUSÃO	59
6. REFERÊNCIAS.....	60

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Hidrólise do ácido fítico pela enzima fitase, liberando inositol e fosfato inorgânico	21
Figura 2. Hidrólise da cadeia polipeptídica por ação das proteases, liberando aminoácidos e cadeias menores.....	26
Figura 3. Sistema xilanolítico e seus pontos de clivagem até a liberação de xilose	30
Figura 4. Avaliação do tempo de crescimento para a produção de fitase	46
Figura 5. Avaliação do tempo de crescimento para a produção de protease	47
Figura 6. Avaliação do tempo de crescimento para a produção de xilanase.....	48
Figura 7. Efeito da temperatura na atividade da fitase de <i>A. niveus</i> e da fitase comercial.....	49
Figura 8. Efeito da temperatura na atividade da protease de <i>A. niveus</i> e da protease comercial	50
Figura 9. Efeito da temperatura na atividade da xilanase de <i>A. niveus</i> e da xilanase comercial.....	51
Figura 10. Efeito do pH na atividade da fitase de <i>A. niveus</i> e da fitase comercial.....	52
Figura 11. Efeito do pH na atividade da protease de <i>A. niveus</i> e da protease comercial.....	53
Figura 12. Efeito do pH na atividade da xilanase de <i>A. niveus</i> e da xilanase comercial	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Constituição dos componentes presentes nos alimentos para animais.....	40
Tabela 2. Composição nutricional dos alimentos (PNA's)	41
Tabela 3. Avaliação de diferentes fontes de carbono na produção de fitase	49
Tabela 4. Avaliação de diferentes fontes de carbono na produção de protease.....	50
Tabela 5. Avaliação de diferentes fontes de carbono na produção de xilanase.....	51
Tabela 6. Avaliação da atividade de fitase de <i>A. niveus</i> e fitase comercial aplicadas em alimentos para animais	55
Tabela 7. Avaliação da atividade de protease de <i>A. niveus</i> e protease comercial aplicadas em alimentos para animais.....	56
Tabela 8. Avaliação da atividade de xilanase de <i>A. niveus</i> aplicada em alimentos para animais	57
Tabela 9. Avaliação da atividade da xilanase comercial aplicada em alimentos para animais	58

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

µg	Micrograma
µmol	Micromol
µmoles	Micromoles
µL	Microlitros
BDA	Ágar dextrose batata
BSA	Albumina sérica bovina “bovine serum albumin”
M	Molar
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mM	Milimolar
nm	Nanômetro
pH	Potencial de hidrogênio iônico
g	Força gravitacional
TCA	Ácido tricloro acético
U	Unidades
DDGS	Grãos secos de destilaria solúveis “distillers dried grain with solubles”
FAMEZ - UFMS	Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UFMS
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
IP	Inositol fosfato
GH	Glicosil hidrolase
CAZY	“Carbohydrate-active enzyme”
N	Normal
PB	Proteína bruta
PNA	Polissacarídeos não amiláceos

RESUMO

Nas últimas décadas a fabricação de ração animal passou a substituir o uso de proteínas de origem animal por fontes de proteína vegetal. Entretanto, muitos ingredientes de origem vegetal contêm fatores antinutricionais como polissacarídeos não amiláceos, fitatos e outros. Desta maneira, são adicionadas enzimas nas rações para aumentar a disponibilidade dos nutrientes dos alimentos, promover o crescimento animal e melhorar o desempenho produtivo zootécnico. Sendo assim, esse estudo foi realizado com o objetivo de selecionar e caracterizar o fungo com melhor produção de fitase, protease e xilanase, aplicar estas enzimas em diferentes alimentos e compará-las com as enzimas comerciais. Foram utilizados sete fungos filamentosos dos gêneros *Aspergillus* sp e *Thermoascus* sp em cultivo semi-sólido usando fonte de carbono alternativas. Os melhores produtores de fitase foi *A. niveus* em arroz integral seguido por *Aspergillus* sp. M2 em palha de arroz. Os melhores produtores de protease foram *Aspergillus* sp. M2 em palha de arroz, seguido por *A. flavus* em farelo de trigo. Em xilanase, os melhores produtores foram *A. niveus* em arroz integral, seguido por *Aspergillus* sp. M2 em palha de arroz. O teste de tempo de crescimento mostrou o pico de produção de fitase sendo em *A. niveus* em 144 horas (3,14 U/mg) de incubação em palha de arroz, assim como para a produção de xilanase com produção máxima de 11,53 U/mg. Já a protease obteve pico em 96 horas com *A. niveus* (2,67 ± 0,35 U/mg) em palha de arroz. Posteriormente, foi realizada a caracterização enzimática quanto ao pH e temperatura ótima usando *A. niveus* crescido em palha de arroz. A fitase produzida apresentou um pico de atividade em pH e temperatura de 4,5-5 e 45°C, respectivamente. O pico de temperatura e pH ótimos para as proteases foram 50°C e pH 6, e para as xilanases e 45°C e pH 5, respectivamente. A atividade *in vitro* nos alimentos para animais foi determinada em µmoles/mL de produto liberado, e a fitase de *A. niveus* foi melhor em FT (farelo de trigo) com 2,21 ± 0,15 µmoles/mL, já a fitase comercial mostrou melhor atividade em FA (farelo de arroz) com 1,86 ± 0,04 µmoles/mL. A atividade *in vitro* de protease de *A. niveus* mostrou maior atividade em FA com 8,34 ± 0,76 µmoles/mL, a protease comercial mostrou melhor resultado no alimento DAF (dieta alternativa - pura fibra) com 5,57 ± 0,14 µmoles/mL. A atividade *in vitro* da xilanase de *A. niveus* mostrou altos níveis de atividade enzimática, destacando-se no alimento MI (milho) com 96,55 ± 6,79 µmoles/mL, já xilanase comercial se destacou na degradação de FT com 31,05 ± 3,85 µmoles/mL de açúcar liberado. Desta maneira, foram produzidas enzimas que se adicionadas a alimentos para animais, podem ser capazes de melhorar a disponibilidade de nutrientes em animais não-ruminantes.

ABSTRACT

In recent decades, the manufacture of animal feed began to replace the use of animal proteins with vegetable protein sources. However, many plant-based ingredients contain anti-nutritional factors such as non-starch polysaccharides, phytates and others. In this way, enzymes are added to the feed to increase the availability of food nutrients, promote animal growth and improve zootechnical productive performance. Therefore, this study was carried out with the objective of selecting and characterizing the fungus with the best production of phytase, protease and xylanase, applying these enzymes in different foods and comparing them with commercial enzymes. Seven filamentous fungi of the genera *Aspergillus* sp and *Thermoascus* sp were used in semi-solid cultivation using alternative carbon sources. The best phytase producers were *A. niveus* in brown rice followed by *Aspergillus* sp. M2 in rice straw. The best protease producers were *Aspergillus* sp. M2 on rice straw, followed by *A. flavus* on wheat bran. In xylanase, the best producers were *A. niveus* on brown rice, followed by *Aspergillus* sp. M2 in rice straw. The growth time test showed the peak of phytase production in *A. niveus* at 144 hours (3.14 U/mg) of incubation in rice straw, as well as for xylanase production with a maximum production of 11.53 U/mg. Protease peaked at 96 hours with *A. niveus* (2.67 ± 0.35 U/mg) in rice straw. Subsequently, the enzymatic characterization was performed regarding pH and optimum temperature using *A. niveus* grown on rice straw. The phytase produced showed a peak of activity at pH and temperature of 4.5-5 and 45°C, respectively. The optimal peak temperature and pH for proteases were 50°C and pH 6, and for xylanases and 45°C and pH 5, respectively. The *in vitro* activity in animal feed was determined in $\mu\text{mol/mL}$ of released product, and the phytase from *A. niveus* was better in WB (wheat bran) with 2.21 ± 0.15 $\mu\text{mol/mL}$, whereas the commercial phytase showed better activity on RB (rice bran) with 1.86 ± 0.04 $\mu\text{mol/mL}$. The *in vitro* protease activity of *A. niveus* showed greater activity in RB with 8.34 ± 0.76 $\mu\text{mol/mL}$, the commercial protease showed better results in ADF food (alternative diet - pure fiber) with 5.57 ± 0.14 $\mu\text{moles/mL}$. The *in vitro* activity of *A. niveus* xylanase showed high levels of enzymatic activity, standing out in the CN (corn) with 96.55 ± 6.79 $\mu\text{mol/mL}$, whereas commercial xylanase stood out in the degradation of WB with 31.05 ± 3.85 $\mu\text{mol/mL}$ of released sugar. In this way, enzymes were produced that, if added to animal feed, may be able to improve the availability of nutrients in non-ruminant animals.

INTRODUÇÃO

Os microrganismos têm se destacado nas últimas décadas como importantes produtores de metabolitos bioativos. Com a globalização, crescimento populacional e as mudanças climáticas, são exigidos do mercado avanços biotecnológicos capazes de suprir as necessidades da sociedade. Desta maneira, é necessário o uso da biotecnologia fúngica que se trata de processos industriais modernos (Money, 2016).

O mercado global de enzimas foi avaliado em US\$ 8,2 bilhões em 2015 e foi previsto um crescimento constante de 6,6% entre 2016 e 2024, culminando em uma receita global de US\$ 17,6 bilhões em 2024 (Adaptado de: <https://www.ameriresearch.com/product/global-enzymes-market-size>). No Brasil, estima-se que, somente em 2019, quase 30 mil toneladas de enzimas ou preparações enzimáticas tenham sido importadas, contra 9,3 mil toneladas exportadas. O principal tipo de enzima importada pelo Brasil são as amilases (cerca de 3,5 mil toneladas), trazidas principalmente da China, Estados Unidos e Dinamarca e utilizadas pelas indústrias têxtil, de produtos de limpeza, cervejeira, de panificação e suco, de alimentos à base de amido, ração para animais e cosméticos.

A fabricação de ração animal, utiliza cerca de 90% de ingredientes de origem vegetal (Scottá et al., 2016). Muitos ingredientes de origem vegetal contêm fatores antinutricionais tais como polissacarídeos não amiláceos no milho, pentosanas no trigo, glucanos da cevada, oligossacarídeos da soja ou fitatos que são limitantes para a digestibilidade dos nutrientes (Marques, 2007). Além disso, o sistema digestivo de animais não-ruminantes não é totalmente eficiente. Suínos e aves não conseguem digerir aproximadamente um quarto da dieta que recebem, pois, o animal é desprovido das enzimas necessárias para degradar certos componentes da ração (Ohja, 2019).

Desta maneira, a indústria de ração animal usa enzimas exógenas como β -glucanases, manases, celulases, hemicelulases, xilanases, pectinases, amilases, proteases, fitases, lipases, entre outras (Ohja, 2019). O uso de enzimas exógenas pode potencializar o aproveitamento de polissacarídeos, dentre outros nutrientes, aumentando a digestibilidade dos nutrientes, favorecendo a absorção e com isso melhorando o desempenho produtivo (Campestrini et al., 2005).

O fitato excretado pode ser degradado por microrganismos, liberando um excesso de fósforo no solo, que se levado a mananciais, pode ajudar a proliferar algas e a eutrofização em águas superficiais (Jatuwong et al., 2020). Ademais, o custo da ração animal é elevado em até

70%, quando necessário a utilização de fósforo inorgânico e não renovável (Vasudevan et al., 2019). A utilização de enzimas que conseguem hidrolisar o fitato, causando a liberação do fósforo na ração, tem se destacado na indústria por ser eficaz e econômica (Afify et al., 2011).

O Brasil tem se destacado mundialmente pela sua forte produção no setor agropecuário e do agronegócio o que torna a busca por novas fontes enzimáticas e o conhecimento de suas propriedades cada vez mais importante. Devido à diversidade de microrganismos produtores de enzimas, este trabalho torna-se importante para explorar o potencial de produção de fitases, proteases e xilanases por fungos filamentosos. Dessa forma, esse estudo foi conduzido com o objetivo de selecionar e caracterizar entre os fungos estudados o melhor produtor de fitase, protease e xilanase, aplicação *in vitro* dessas enzimas em alimentos para animais comparando com as enzimas comerciais.

1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Fungos

Os fungos são organismos uni e pluricelulares, eucarióticos, aclorofilados (com exceções), heterotróficos com reserva energética de glicogênio, além de decompositores. Fungos pluricelulares são caracterizados por uma estrutura somática geralmente constituída de filamentos alongados microscópicos, denominados hifas. O conjunto de hifas que compõem o corpo do fungo é chamado micélio, que pode formar estruturas reprodutivas macroscópicas morfologicamente complexas (Oliveira, 2014).

Os fungos são atores poderosos na biogeoquímica global, reciclando carbono e mobilizando nitrogênio, fósforo e outros bioelementos (Naranjo-Ortiz & Gabaldón, 2019). Estes microrganismos são amplamente distribuídos nos ecossistemas, como no fundo do oceano (Nagahama et al., 2011), em geleiras antárticas (Freeman et al., 2009), em desertos tórridos (Gonçalves et al., 2016) e nos pontos mais altos do mundo (Kaur et al., 2017). A maioria dos fungos vivem nos mais diversos substratos da natureza e são isolados do: solo seco, pântanos, troncos apodrecidos ou nas frutas, leite, água e poeira. Estes organismos podem ser denominados geofílicos (preferência para o solo), zoofílicos (animais) e antropofílicos – os que só têm sido isolados do homem (Oliveira, 2014).

As singularidades metabólicas de muitos fungos fornecem à humanidade alimentos e bebidas fermentadas, remédios e compostos com importantes usos industriais (Naranjo-Ortiz & Gabaldón, 2019). A biotecnologia consiste no uso de sistemas celulares para o desenvolvimento de produtos de interesse econômico ou social (Silva, 2016). Diferentes linhagens fúngicas têm sido utilizadas como fontes de genes e vias metabólicas para a síntese de compostos de interesse econômico, incluindo peptídeos, vitaminas, enzimas, ácidos orgânicos (cítrico, láctico e succínico), antibióticos (penicilina), entre outros (Orlandelli, 2012).

1.2 Gênero *Aspergillus*

As primeiras classificações taxonômicas dos fungos do gênero *Aspergillus* foram baseadas em características macroscópicas (cor de conídios, taxas de crescimento, etc.) e microscópicas (formato da vesícula) (Arastehfar et al., 2021). Devido à sua importância econômica, a taxonomia do gênero foi estudada várias vezes na história. Atualmente, para

descrever uma espécie de *Aspergillus* são feitas análises fenotípicas, genotípicas e filogenéticas (Arastehfar et al., 2021).

O gênero *Aspergillus* pertence ao filo Ascomycota, classe Eurotiomycetes, ordem Eurotiales, família *Trichocomaceae* (*Aspergillaceae*). O filo Ascomycota é o maior grupo monofilético, compreendendo cerca de dois terços de todas as espécies descritas (McLaughlin & Spatafora, 2015). Este filo possui cerca de 15 classes, 68 ordens, 327 famílias, 6.300 gêneros e mais de 64.000 espécies registradas (Kirk et al., 2008). A diversidade do filo Ascomycota e a facilidade da manipulação experimental, fez destes fungos o ‘padrão’ para estudos (Naranjo-Ortiz & Gabaldón, 2019). A principal característica macroscópica para diferenciação das espécies do gênero *Aspergillus* se dá pela coloração das colônias. As seções (classificação por características morfológicas e coloração) de *Aspergillus*, são marrons, amarelas, brancas, verdes, cinzas e pretas, e em vários tons (Klich, 2002).

O gênero *Aspergillus* possui forma anamórfica de ascomycetos que se caracteriza pela produção de esporos assexuais (Klich & Pitt, 1988). As espécies pertencentes a esse gênero tipicamente produzem um conidióforo, asseptado e com a base normalmente em forma de “T” ou “L”, comumente chamada de “célula pé”, conectada a uma hifa vegetativa. Entretanto, no gênero *Aspergillus* algumas espécies possuem morfologia característica heterotática, como por exemplo, *Aspergillus takadae* (Matsuzawa et al., 2019) e *Aspergillus fumigatus* (O’Gorman et al., 2009).

Os fungos *Aspergillus* se destacam na produção de proteínas, metabólitos secundários e micotoxinas. As micotoxinas são um grupo de metabólitos secundários produzidos por fungos e que apresentam riscos à saúde em humanos e outros vertebrados quando ingeridos mesmo que em pequenas quantidades (Frisvad, 2018). Espécies de fungos com uso industrial têm o potencial de produzir um número bastante limitado de compostos tóxicos para vertebrados (micotoxinas) e uma grande variedade de outros compostos que podem apresentar atividade anticarcinogênica ou antimicrobiana, atividade antioxidante, pigmentos etc. (Mushtaq et al., 2018). Assim, os fungos *Aspergillus* são muito usados na biotecnologia industrial.

A utilização destes fungos começou com o químico de alimentos James Currie, que publicou um estudo descrevendo as propriedades superiores do *A. niger* para a produção industrial de ácido cítrico (Currie, 1917). As espécies mais conhecidas do gênero são aquelas que são mais usadas na indústria e que possuem relação com humanos. Podem ser organismos que atuam na deterioração de alimentos (por exemplo, *Aspergillus proliferans*, patogênicos

para humanos (por exemplo, *A. fumigatus*, *Aspergillus flavus*) e contaminantes internos (por exemplo, *Aspergillus versicolor*, *Aspergillus penicillioides*) (Frisvad et al., 2019).

Além disso, as espécies de *Aspergillus* são extensivamente usadas em fermentações de alimentos, por exemplo, *Aspergillus oryzae*: molho de soja, missô, e para a produção de produtos farmacêuticos, por exemplo, *Aspergillus terreus*: lovastatina. Uso na biotecnologia para produzir ácidos orgânicos e enzimas, como por exemplo, *Aspergillus niger* e a produção de ácido cítrico (Houbraken et al., 2014, Frisvad et al., 2019). Além de mostrar potencial para outras aplicações como o fungo *A. niger* que produz várias enzimas usadas na produção de alimentos e rações, como glicoamilases, proteases e fitases (Cairns, 2018).

1.3 Gênero *Thermoascus*

O gênero *Thermoascus* pertence ao filo Ascomycota, classe Eurotiomycetes, ordem Eurotiales e à família Trichocomaceae. As espécies *Thermoascus* são termofílicas, podendo crescer a altas temperaturas (Hosoya, 2014), sendo de 20 a 62°C (Wareing, 1997). O gênero *Thermoascus* é composto por seis espécies identificadas: *Thermoascus verrucosus*, *T. yaguchii*, *T. crustaceus*, *T. thermophilus*, *T. aurantiacus* e *T. aegyptiacus* (Schoch, 2020). A espécie *Thermoascus aurantiacus*, mais estudada do gênero, é um fungo termofílico que cresce de maneira eficiente em biomassa lignocelulósica (Leite et al., 2008; Mól et al., 2019). Diferentes cepas de *T. aurantiacus* têm sido relatadas como produtoras de xilanases termoestáveis (Ping et al., 2018). Um estudo mostrou a eficiência da aplicação de uma xilanase GH10 recombinante de *T. aurantiacus* para produção de xilooligossacarídeos, tendo como substrato bagaço de cana-de-açúcar (Nascimento et al., 2022). Além disso, foi reportado que *T. aurantiacus* é capaz de produzir carboximetilcelulases, xilanases e β -glicosidases com estabilidade ao pH e temperatura (da Silva et al., 2005; Ping et al., 2018; Mól et al., 2019).

1.4 Produção enzimática por microrganismos

Os microrganismos são excelentes produtores de enzimas, pois tem capacidade de originar enzimas mais ativas e estáveis quando comparado com as enzimas de plantas e animais. Estas enzimas têm alto rendimento e são fáceis de modificação e otimização do produto devido à diversidade bioquímica e suscetibilidade à manipulação gênica (Singh & Kumar, 2019). O uso de enzimas em processos biotecnológicos, possibilitam uma variedade de reações bioquímicas que proporcionam benefícios como rentabilidade de processos,

diminuição de problemas ambientais e toxicológicos (Cousi & Damaso, 2021). Cada enzima atua em um substrato, pH e temperatura específica, otimizando a reação para converter um reagente em um produto (Afroz et al., 2015). Portanto, nas produções industriais são imprescindíveis enzimas robustas, capazes de atuar em uma ampla gama de condições (pH extremo, temperatura, osmolaridade, pressão etc.) (Corrêa et al., 2014).

Existem duas partes principais na produção enzimática: triagem de potenciais cepas microbianas e o processo de fermentação. Cepas particularmente selecionadas são capazes de produzir enzimas bem caracterizadas em larga escala (Singh & Kumar, 2019). As enzimas devem ser produzidas com alto rendimento por meio de processos fermentativos de baixo custo e simples (Corrêa et al., 2014). Deste modo, a composição do meio de produção é um componente da produção comercial de enzimas; o meio adequado contém fontes de carbono, fontes de nitrogênio e micronutrientes, que são parâmetros importantes para produção de enzimas usadas na indústria. A fermentação submersa e sólida também são parâmetros importantes, que suportam o crescimento de microrganismos no processo de fermentação (Singh & Kumar, 2019).

O processo de fermentação pode ser realizado em uma de duas maneiras – fermentação em estado sólido ou fermentação submersa (Rana & Bhat, 2005). A produção enzimática em microrganismos como as bactérias é quase exclusivamente realizada por fermentação submersa. No entanto, com o objetivo de produzir enzimas industriais, os processos de fermentação em estado sólido são adequados para fungos filamentosos (Singh & Kumar, 2019).

A fermentação em estado sólido pode ser definida como o processo de fermentação de microrganismos cultivados em uma superfície de material sólido com ausência ou com baixa quantidade de água. Entretanto, o processo deve possuir umidade suficiente para suportar o crescimento de microrganismos (Jatuwong et al., 2020). O fungo filamentoso prefere a fermentação superficial, ou fermentação em estado sólido, para a produção de enzimas e outros metabólitos, pois as condições são semelhantes às aquelas em que esses fungos crescem na natureza (Sandhya et al., 2005).

A fermentação sólida oferece vantagens de baixo custo, simplicidade, maior rendimento, estabilidade do produto, menor exigência de esterilidade e possibilidade de aproveitamento de inúmeros resíduos agroindustriais como substrato (Contesini et al., 2018). Assim, é importante avaliar os efeitos do pH, temperatura, umidade, aeração, agitação, oxigênio dissolvido e sais inorgânicos (Jatuwong et al., 2020; Afroz et al., 2015; Gimenes et al., 2019).

A fermentação submersa é responsável por cerca de 90% da produção de todas as enzimas industriais. Esse tipo de fermentação é geralmente usado em bactérias, pois apresenta facilidade de controle das variáveis físico-químicas, porém, as enzimas produzidas ficam diluídas e são menos estáveis (Gimenes et al., 2019). Por outro lado, a fermentação sólida é mais adequada para fungos pois as condições são semelhantes àquelas em que esses fungos crescem na natureza (Sandhya et al., 2005). Razzaq et al. (2019) relataram a produção de proteases em meio sólido usando resíduos agroindustriais, incluindo farelo de trigo, palha de trigo, esterco de vaca e bagaço de cana-de-açúcar.

1.5 Enzimas

1.5.1 Fitase

As fitases são encontradas na natureza em plantas, animais e em microrganismos (Pandey et al. 2001; Vohra & Satyanarayana, 2003; Yao et al., 2011). A atividade enzimática da fitase foi detectada pela primeira vez há mais de um século (Suzuki et al., 1907), nos grãos de arroz e nos micélios de *A. niger* (Gessler et al., 2018). No século XX, foram feitos estudos para promover potenciais usos da fitase. Somente no ano de 1991, a primeira fitase alimentar tornou-se comercialmente disponível, em resposta à legislação destinada a limitar a poluição de fósforo do meio ambiente na Holanda (Selle & Ravindran, 2007). A utilização de fitases foi possibilitada pela redução no seu custo de produção, viabilizando a entrada no mercado de dietas para animais não-ruminantes.

As fitases ou mio-inositol hexaquisfosfato fosfohidrolase, são enzimas responsáveis pela liberação de fosfatos do fitato, conforme apresentado na Figura 1 (Konietzny & Greiner, 2002). A eliminação do grupo fosfato se inicia com o ácido fítico totalmente fosforilado, seguido em ordem decrescente com penta-, tetra-, tri-, di- e monoésteres de inositol (Dersjant-Li et al., 2014). Estas enzimas podem ser classificadas de três modos, com base ao ataque a determinado carbono na composição do ácido fítico, pH ótimo e informações estruturais (Singh et al., 2020) que são baseadas em sequências de aminoácidos, mecanismos de reação enzimática, conformação tridimensional e propriedades bioquímicas (Kumar et al., 2016).

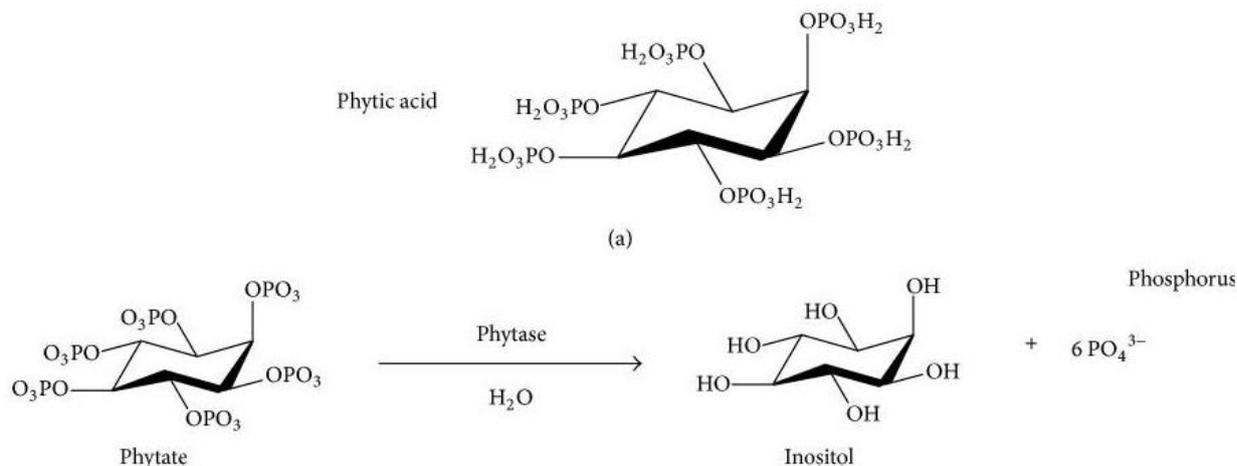


Figura 1. Hidrólise do ácido fítico pela enzima fitase, liberando inositol e fosfato inorgânico. (Cangussu et al., 2018).

Com base ao ataque a diferentes posições do inositol, a classificação das fitases incluem 3-fitases (E.C. 3.1.3.8), 4-fitases (E.C. 3.1.3.26), 5-fitases (E.C. 3.1.3.72) e 6-fitases (E.C. 3.1.3.26) (Gontia-Mishra & Tiwari, 2013; Selle & Ravindran, 2007). O maior grupo de fitases, faz parte das 3-fitases que são de origem fúngica e bacteriana, agindo no C3 do anel inositol (configuração D e L) (Singh et al., 2020). As fitases que atuam preferencialmente no C6 tem origem vegetal, porém, podem ser encontradas em *Escherichia coli* (Greiner et al., 1993, Suleimanova et al., 2015), *Selenomonas ruminantium* (Yao et al., 2011), *Peniophora lycii* e fungos basidiomicetos (Lassen et al., 2001).

As fitases também podem ser classificadas de acordo com seu pH ótimo, sendo enzimas ácidas, neutras e alcalinas. As fitases ácidas foram relatadas em muitos microrganismos (Singh et al., 2020). Os fungos são as principais fontes de fitase ácida de pH ótimo entre 2 a 6, como por exemplo, as fitases de espécies de *Aspergillus* (Singh & Satyanarayana, 2015). As fitases alcalinas são encontradas em espécies de *Bacillus* que diferente de fitases ácidas, o pH de atividade ótima é entre 7 e 8, e geralmente dependem de Ca²⁺ como cofator (Yao et al., 2011; Zhang et al., 2020).

Ainda, com base em catálise e informações estruturais, as fitases também são classificadas em fosfatase ácida histidina (HAPs, fitases ácidas), fosfatases ácida púrpura (PAPs, metaloenzimas), β -propeller fitases (BPP, fitases alcalinas) e proteínas fosfatase tirosina (PTP) ou fitases cisteínas (CP) (Yao et al., 2011; Kumar et al., 2016; Singh et al., 2020). As HAPs contêm terminais N e C convencionais, contendo uma histidina, que se aproximam para formar o centro catalítico durante a catálise do substrato (Gessler et al., 2018).

Esta classe de fitases foi identificada na maioria dos fungos e bactérias, incluindo *Aspergillus oryzae* SBS50 (Sapna, 2017), *Penicillium oxalicum* (Kaur et al., 2017), *Trichoderma harzianum* (de Souza et al., 2016), etc. Os BPPs foram relatados principalmente em diferentes espécies de *Bacillus* (Sanangelantoni et al., 2018). As PAPs são fitases roxas ou rosas por causa da presença de Fe^{3+} , Fe^{2+} , Zn^{2+} e Mn^{2+} em seus centros e são relatados principalmente em plantas (Singh & Satyanarayana, 2015). As CPs pertencem a uma nova subfamília de fitases que está relacionada às proteínas tirosina fosfatases (Puhl et al., 2008; Gontia-Mishra & Tiwari, 2013).

A primeira fitase comercial (Natuphos ®), lançada em 1991 pela BASF, é produzida por uma cepa de *Aspergillus niger* (Mittal et al., 2013). Atualmente, a maioria dos trabalhos científicos têm focado em fitases obtidas de fungos filamentosos dos gêneros *Aspergillus*, *Myceliophthora*, *Mucor*, *Penicillium*, *Rhizopus* e *Trichoderma* (Roopesh et al., 2006; Dailin et al., 2019). Outras espécies de fungos filamentosos que produzem fitase durante o processo de fermentação são *Aspergillus oryzae* (Sapna, 2014), *Humicola nigrescens*, *Aspergillus flavus* (Gaiind & Singh, 2015), *Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Penicillium chrysogenum* e *Schizophyllum commune* (Casey & Walsh, 2004; Salmon et al., 2012; Correa et al., 2015).

Estratégias de recombinação gênica buscam soluções para obter cepas recombinantes que produzam altos níveis de enzimas com interesses industriais (Correa et al., 2015). Uma fitase termoestável foi isolada de *Aspergillus aculeatus* (RCEF 4894) e expresso em *Pichia pastoris*, resultando alta termoestabilidade e atividade enzimática (Kumar et al., 2016). Vários genes microbianos que codificam fitases com alta afinidade pelo fitato têm sido usados no desenvolvimento de plantas transgênicas, aumentando a biodisponibilidade de fósforo (Mohsin et al., 2017). As enzimas fitases são importantes no crescimento de vegetais, Lucca et al. (2001) registraram a expressão de fitase de *Aspergillus fumigatus* em arroz (*Oryza sativa*); Pen et al. (1993) relataram a expressão de fitases de *Aspergillus niger* em sementes de tabaco transgênico.

O ácido fítico está presente na farinha branca e na farinha integral, portanto, está na composição de vários tipos de massa e pão. Desta maneira, as fitases têm sido usadas como aditivo alimentar em processos fermentativos e em diversas aplicações no processo de panificação (Jatuwong et al., 2020). As fitases de *A. ficuum* e *A. niger*, foram usadas em processos de panificação e mostraram eficiência na degradação do fitato (Han & Wilfred, 1988; Haros et al., 2001). A adição de fitase fúngica pode ser usada no processo de panificação e no

armazenamento congelado de pão, a fim de superar os efeitos prejudiciais do farelo e melhorar a biodisponibilidade de macronutrientes (Rosell et al., 2009).

Recentemente, o uso de fitase termoestável se tornou indiretamente relacionado à produção de bioetanol a partir do milho. O ácido fítico tem a capacidade de se ligar a polissacarídeos e diminuir sua suscetibilidade à hidrólise enzimática, diminuindo assim a quantidade de açúcares fermentáveis (Vasudevan et al., 2019). Neste caso, a hidrólise do ácido fítico pela fitase pode aumentar a disponibilidade de polissacarídeos, como o amido melhorando a qualidade e eficiência na produção de etanol. (Keiji et al., 2004). A remoção de ácido fítico resolve um problema de desperdício de nutrientes e descarte de resíduos, além de criar simultaneamente um coproduto de etanol (DDGS - grãos secos de destilaria com solúveis) de maior valor (Shetty et al., 2008).

Além da necessidade do fósforo no crescimento vegetal, este macronutriente é essencial no desenvolvimento animal. O fósforo ligado ao ácido fítico, presente em fontes de alimentos e ração animal, é pouco absorvido em animais não-ruminantes como cachorros, suínos, aves e peixes, pois não possuem ou contêm baixos níveis de fitase gastrointestinal para a degradação do fitato (Costa, 2007; Zhang et al., 2013; Jatuwong et al., 2020). O fitato forma complexos com aminoácidos, proteínas carregadas positivamente e cátions multivalentes, causando deficiência relacionada a minerais em animais e humanos (Greiner & Konietzny, 2006). Portanto, o fitato pode ser considerado como um fator antinutricional, devido a sua capacidade de formar quelatos e uma vez que animais não-ruminantes não são capazes de degradá-lo, interferindo na absorção de nutrientes (Conte et al., 2002).

Visto a necessidade, camundongos e porcos transgênicos foram gerados com a super expressão de fitase em suas glândulas salivares, com pH ótimo e resistência à protease. A secreção da fitase na saliva resultou em uma redução substancial do fósforo fecal e o resultado apontou uma forma de lidar com a poluição por fósforo gerada da pecuária (Golovan et al., 2001). Um outro caminho é a inclusão de quantidades adequadas de fitase na dieta de não-ruminantes, sendo possível reduzir a necessidade de suplementação de fósforo inorgânico (Bedford & Partridge, 2010). Em porcos, onde a fitase tem maior ação no estômago, a adição de fitase aumenta a digestibilidade do fósforo de 39% para 65% (Rosenfelder-Kuon et al., 2019). Nelson et al. (1968), analisaram em frangos de corte, um tratamento com farelo de soja usando suplementação de fitase de *A. niger*, onde a disponibilidade de fósforo aumentou em 60% com a fitase microbiana, enquanto que a concentração de fósforo nas fezes dos frangos foi reduzida.

O fósforo é extensivamente usado na suplementação animal, porém a alta excreção de fósforo por animais não-ruminantes cria um problema de poluição por fósforo em corpos d'água (Kumar et al., 2016). Nos últimos anos, a suplementação da fitase em bioprocessos tem demonstrado ser uma eficaz ferramenta para a indústria de produção animal por reduzir a excreção de fósforo dos resíduos (fezes e excretas), além do uso nas produções industriais de alimentos, bioetanol e outros (Selle & Ravindran, 2007). Deste modo, a fitase possibilita benefícios para o meio ambiente, a produção sustentável e a economia. Assim, as fitases destacam-se na aplicação de ração animal, uma vez que hidrolisando o fitato não haverá a formação de quelatos com cátions e complexos com proteínas, carboidratos e enzimas. Ademais, no intuito de melhorar o valor nutritivo de dietas compostas de alimentos com alta presença de polissacarídeos, sugeriu-se o uso de complexos enzimáticos (Krabbe, 2019).

1.5.1.1 Ácido fítico

O substrato da enzima fitase possui três terminologias conhecidas: fitato, fitina e ácido fítico. Quimicamente, os fosfatos de inositol consistem em um anel inositol com 6 grupos fosfato e 12 prótons, ou seja, 2 prótons por grupo fosfato (Cowieson et al., 2004). Outros compostos como inositol tri-(IP3), tetra-(IP4) e penta-fosfato (IP5) também são chamados de fitatos (Kumar et al., 2010). O fitato, refere-se ao sal misto de ácido fítico e cátions, principalmente K^+ e Mg^{+2} , e em menor extensão Ca^{+2} , Fe^{+2} , Fe^{+3} e Zn^+ (hexaquisfosfato de mio-inositol; IP6) (Kumar et al., 2010). O ácido fítico tem capacidade quelante devido à sua estrutura mostrando uma forte afinidade com cátions polivalentes na seguinte ordem de estabilidade: $Cu^{2+} > Zn^{2+} > Ni^{2+} > Co^{2+} > Mn^{2+} > Fe^{3+} > Ca^{2+}$ (Graf & Eaton, 1990). Além disso, a alta carga negativa dada pela presença dos seis grupos fosfato em sua molécula, mesmo que em diferentes faixas de pH, fornece uma alta afinidade por minerais e nutrientes carregados positivamente, ligação direta ou indiretamente ao amido, à proteína e às enzimas, como por exemplo a amilase, podendo formar complexos, influenciando negativamente na digestão de nutrientes (Thompson & Yoon, 1984; Duong et al., 2018).

O termo fitina, refere-se especificamente ao complexo depositado de IP6 com potássio, magnésio e cálcio como ocorre em plantas, enquanto o ácido fítico é sem estes íons ligados, sendo uma forma livre de IP6 (Selle & Ravindran, 2007). A nomenclatura do ácido fítico é usada na literatura de diversas maneiras, podendo ser chamado de mio-inositol 1,2,3,4,5,6-hexaquisfosfato, mio-inositol 1,2,3,4,5,6 ácido hexafosfórico, mio-inositol hexaquisfosfato,

Ins (1,2,3,4,5,6) P₆, InsP₆ ou IP₆ (Kumar et al., 2010; Chen et al., 2018; Zhu, et al., 2019; Duong et al., 2018).

O fósforo pode ser encontrado na natureza nas formas orgânicas ou inorgânicas. O formato inorgânico representa entre 35 a 70% do fósforo total dos solos, e é encontrado principalmente em compostos insolúveis (Dipta et al., 2019). No entanto as fontes inorgânicas são limitadas e não renováveis, com projeções de se esgotarem entre os anos de 2060 e 2130 (Vieira et al., 2019). Em contrapartida, a forma orgânica representa cerca de 20 a 80% do total do solo, e é encontrado em forma de fitinas, ácido fítico, fosfolipídios, polifosfatos, entre outros, porém a biodisponibilidade geralmente é baixa dependendo de vários fatores como o tipo de solo, microrganismos presentes no ambiente, etc. (Dipta et al., 2019).

O ácido fítico ou fitato é a maior fonte de estocagem de fósforo (P) presente em plantas, grãos e sementes oleaginosas (Pandey et al., 2001). O fitato constitui 60 a 97% do fosforo total em grãos de cereais, leguminosas e oleaginosas e 21 a 25% do total de fósforo em raízes e tubérculos (Ravindran, 1994) sendo armazenado na camada aleurona (trigo, cevada, arroz) ou no gérmen (milho) da semente. A proporção de fósforo disponível no farelo de soja varia entre 23 a 31%, enquanto no milho varia de 12 a 14% (Selle & Ravindran, 2008). O fitato pode ser sintetizado por meio de uma via lipídios-independente ou dependente presente no metabolismo das plantas (Feizollahi et al., 2021).

Nas sementes de cereais e leguminosas, ocorre uma via independente de lipídios para a formação do fitato (Feizollahi et al., 2021). O primeiro passo é a formação de inositol-3-fosfato (IP₃) a partir de glicose-6-fosfato, pela enzima mio-inositol-3-fosfato sintase. Em seguida, várias quinases realizam fosforilação dos outros cinco sítios do anel inositol. Inositol-pentaquisfosfato 2-quinase catalisa a última etapa envolvendo a produção de IP₆ a partir de IP₅ (Rasmussen et al., 2010).

Estes complexos, geralmente são insolúveis e resistentes a ação do trato intestinal em animais e humanos, reduzindo a biodisponibilidade desses nutrientes (Niu et al., 2017). Além disso, o fitato também tem enorme potencial para interagir com proteínas, carboidratos e lipídios carregados positivamente, reduzindo a funcionalidade, digestibilidade, solubilidade e biodisponibilidade destes nutrientes nos alimentos (Duong et al., 2018; Vasudevan et al., 2019). Em proteínas, as interações com o ácido fítico podem afetar sua estrutura reduzindo sua atividade, levando a inibição de muitas enzimas tais como tripsina, amilase, pepsina pancreática e lipase (Singh & Satyanarayana, 2010; Duong et al., 2018).

1.5.2 Protease

As enzimas proteolíticas, conhecidas como proteases ou peptidases são capazes de quebrar ligações peptídicas específicas em proteínas, dando origem a peptídeos menores e aminoácidos (Figura 2) (Martínez-Medina et al., 2019). As proteases estão envolvidas em muitos processos biológicos tais como em funções celulares e do organismo, incluindo nutrição, renovação de proteínas, crescimento, adaptação, regulação, esporulação e germinação, doença e morte (Ward, 2011).

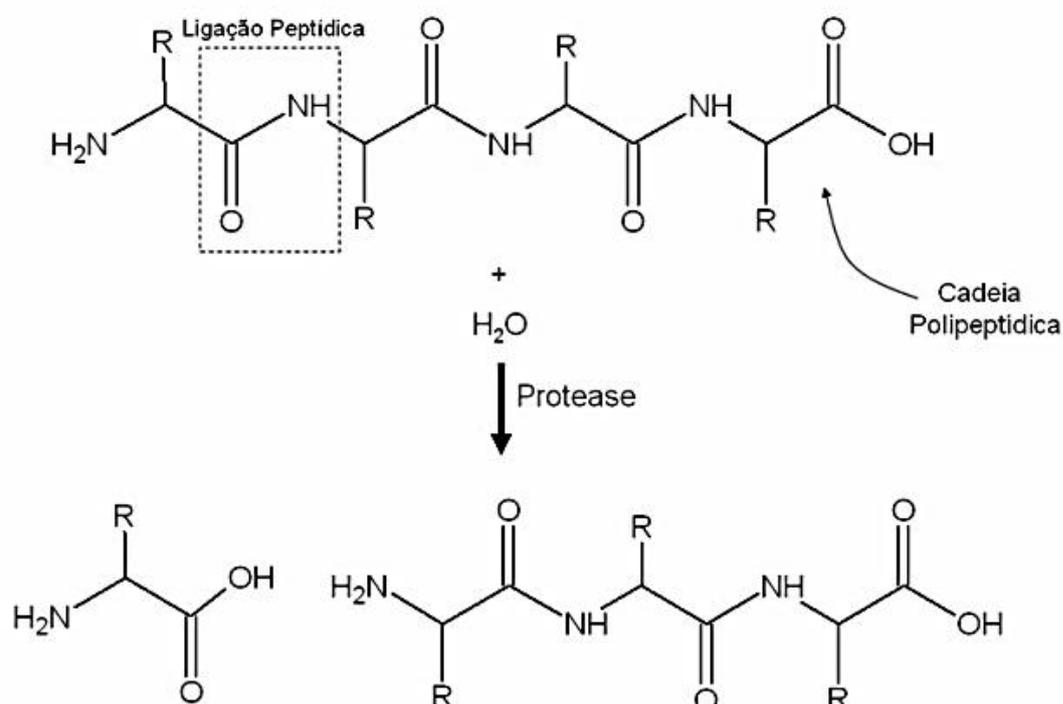


Figura 2. Hidrólise da cadeia polipeptídica por ação das proteases, liberando aminoácidos e cadeias menores. (Lima et al., 2008).

As peptidases representam um diversificado grupo de enzimas hidrolíticas que são classificadas pelo seu sítio de ação, estrutura do sítio ativo da enzima, seus mecanismos de reação específicos (Ward, 2011) e valor de pH ótimo (Martínez-Medina et al., 2019). Quando o sítio de clivagem da cadeia polipeptídica é considerado, as proteases são classificadas nos grupos: (1) Exopeptidases (E.C. 3.4.11), que atuam nas ligações peptídicas terminais de uma proteína, hidrolisando nas extremidades N ou C terminais, resultando em aminoácidos livres, aminopeptidases (E.C. 3.4.14) que atuam no N-terminal livre da cadeia polipeptídica, liberando aminoácidos dipeptídeos ou tripeptídeos, ou carboxipeptidases (E.C. 3.4.16–18), que atuam no C-terminal da cadeia polipeptídica e são divididas em quatro subgrupos. As aminopeptidases

são compreendidas em dipeptidases (E.C. 3.4.13), dipeptidil peptidases (E.C. 3.4.14) e tripeptidil peptidases (E.C. 3.4.14), já as carboxipeptidases são proteases do tipo serina (E.C. 3.4.16), proteases do tipo cisteína (E.C. 3.4.18), metaloproteases (E.C. 3.4.17), peptidil dipeptidase (E.C. 3.4.15) e dipeptidase (E.C. 3.4.13). Além disso, proteases do tipo omegapeptidases (E.C. 3.4.19), também são exopeptidases e liberam resíduos de aminoácidos com a clivagem ocorrendo no N-terminal.

(2) Endopeptidases (E.C. 3.4.21-34), que atuam nas ligações peptídicas internas de uma proteína, resultando em pequenas cadeias peptídicas. Dentro das endopeptidases, podem ser classificadas de acordo com o grupo funcional presente no sítio ativo, sendo divididos em quatro grupos. (1) Serina-protease (E.C. 3.4.21), caracterizadas pela presença de um resíduo serina no sítio ativo e geralmente são ativas em pH neutro a alcalino, entre 7 e 11; (2) Cisteína-proteases (E.C. 3.4.22), caracterizadas pelo resíduo de cisteína e histidina, tendo sua atividade máxima em pH ácido a neutro (2 – 7); (3) Aspártico-proteases (E.C. 3.4.23) tem sua atividade catalítica dependente de resíduos de ácido aspártico e são conhecidas como proteases ácidas, com sua atividade em pH ótimos de 3 a 5; (4) Metaloproteases (E.C. 3.4.24), tem como principal característica a necessidade de íons metálicos para sua atividade, possuindo resíduos de fenilalanina ou leucina no sítio ativo e pH ótimo entre 5 e 7 (Whitaker, 1993; Rao et al., 1998; Jisha et al., 2013; Martínez-Medina et al., 2019).

Peptidases podem ser produzidas por animais, plantas, fungos, bactérias, protozoários e vírus (Horimoto et al., 2009; Whitaker, 1993). As proteases animais, vegetais e, especialmente, microbianas representam os segmentos mais importantes de produção industrial dessas enzimas. As proteases encontradas em animais incluem tripsina pancreática, quimotripsina, pepsina e renina. Porém, para a produção em larga escala destas enzimas não é economicamente viável, pois depende da disponibilidade de animais para sacrifício, além de serem produzidas em pequenas quantidades que devem ser extraídas de seus órgãos ou tecidos. As proteases de origem vegetal, como a papaína e a bromelina são extraídas das plantas. No entanto, o uso de plantas como fonte de proteases é fortemente influenciado por fatores de viabilidade, cultivo, condições climáticas e longos processos de extração (Rani et al., 2012). Por estas razões, a maioria das enzimas de interesse comercial são produzidas a partir de microrganismos.

Na literatura, a produção de protease em meio submerso e meio sólido é relatada por várias espécies de fungos como: meio líquido *Aspergillus carbonarius* (Ire et al., 2011), *Aspergillus flavus* (Hossain et al., 2006), *Aspergillus fumigatus* (Wang et al., 2005), *Aspergillus*

niger AB100 (Basu et al., 2008), *Aspergillus ochraceus* BT21 (El-Khonezy et al., 2021), *Aspergillus oryzae* (Su et al., 2011), *Aspergillus tamaris* (Boer & Peralta, 2000) e *Trichoderma reesei* (Sun et al., 2021), e meio sólido para *Aspergillus brasiliensis* (Novelli et al., 2015), *Aspergillus flavipes* (Zanutto-Elgui et al., 2019; Novelli et al., 2015), *Aspergillus flavus* MTCC 9952 (Yadav et al., 2015), *Aspergillus fumigatus* (Hernández-Martínez et al., 2011), *Aspergillus niger* ANH15 (Villegas et al., 1993), *Aspergillus oryzae* MTCC 5341 (Vishwanatha et al., 2009), *Aspergillus oryzae* (Zanutto-Elgui et al., 2019), *Aspergillus sojae* (Sardjono et al., 1998), *Penicillium* sp. (Germano et al., 2003), *Penicillium roquefortii* (Novelli et al., 2015) e *Rhizopus oryzae* (Aikat & Bhattacharya, 2001).

As proteases representam o maior grupo de enzimas comercialmente disponíveis em todo o mundo, respondendo por 60% do mercado de enzimas industriais (Ward, 2011). As principais proteases comercializadas são Alcalase 0.6L (*Bacillus licheniformis*), Neutrase (*Bacillus subtilis*), Protease 600L (*Bacillus subtilis*), Fungal-protease (*Aspergillus oryzae*), P.E.M. 2500 S (origem animal), Corolase PP (*Aspergillus oryzae*), Corolase PS (*Aspergillus oryzae*), Corolase 7089 (*Bacillus subtilis*), Bromelain Takamina (origem vegetal), Papain Takamina (origem vegetal) e Flavourzyme 500 MG (*A. oryzae*), etc. (Guadix et al., 2000). As proteases têm aplicações em alimentos e bebidas (laticínios), produtos de limpeza, ração animal, couro, farmácia e cosméticos (Martínez-Medina et al., 2019; Mandal & Banerjee, 2019), na degradação de biofilmes, degomagem de seda, biopolimento de lã, degradação de proteínas priônicas, manejo de pragas e manejo de resíduos (Solanki et al., 2021).

Os maiores usos das proteases ocorrem nas indústrias de couro, detergente e alimentos. As proteases são usadas na fabricação do couro, substituindo agentes químicos tóxicos e perigosos ao meio ambiente (Bezerra et al., 2021). Até o momento, o principal método de depilação é o sulfeto de cal, causando altas concentrações de metais pesados e alcalinidade em águas residuais (Dettmer et al., 2013). Ao usar 1000 kg de couro cru para produzir 150 kg de couro sem pelos, são produzidos 30 m³ de esgoto e 700 kg de lixo sólido, além dos contaminantes tóxicos (Saravanabhavan et al., 2004). Desta maneira, proteases alcalinas exibem potencial para diminuir ou substituir o uso de sulfato inorgânico (Kanagaraj et al., 2015). As proteases queratinolíticas, que atacam as ligações S-S na raiz do cabelo e na epiderme, possuem potencial na indústria do couro e têxtil (Gupta et al., 2013).

A protease tem sido utilizada em detergentes desde o final da década de 1990, se tornando a maior indústria a utilizar estas enzimas (Solanki et al., 2021). O uso de proteases na indústria de detergentes é responsável por 20% da venda global de enzimas, com expansão do

mercado prevista (Razzaq et al., 2019). Proteases digerem alimentos como leite, ovos, carne, sangue, e outras sujeiras promovendo uma lavagem de qualidade com menos tempo de agitação e imersão (Singh et al., 2016). As proteases também são usadas na produção de queijos atuando na coagulação do leite (Rao et al., 1998). As serina-proteases produzidas por *Bacillus* sp. e proteases alcalinas produzidas por alguns fungos são as proteínas mais utilizadas em formulações de detergentes devido à sua facilidade e custo de fabricação (Tekin et al., 2020). Assim como no curtimento do couro, a aplicação das proteases na indústria de alimentos tem mostrado potencial na substituição de agentes químicos, ao mesmo tempo em que melhora as propriedades dos produtos alimentícios (Solanki et al., 2021). Na panificação, as peptidases são usadas como aditivos no preparo de massas, atuando no glúten da farinha de trigo, contribuindo na elasticidade, textura e no tempo de mistura da massa (Souza et al., 2015).

Na indústria de ração animal, as proteases são incluídas durante o processamento de alimentos ou ingredientes das rações, para hidrólise de proteínas, ou aplicação direta de proteases como suplementos à ração ou durante o processamento das formulações finais da ração (Philipps-Wiemann, 2018). Assim, a aplicação das proteases aumenta a biodisponibilidade de nutrientes e ajuda na digestão de proteínas no trato gastrointestinal (Hejdysz et al., 2020), garantindo maior nutrição e ajudando a diminuir a excreção de óxido nitroso e amônia no ambiente (Jegannathan & Nielsen, 2013).

1.5.3 Xilanase

Atualmente as xilanases estão classificadas na família glicosil hidrolases (GHs - E.C. 3.2.1.8). As GHs são um grupo difundido de enzimas que hidrolisam a ligação glicosídica entre dois ou mais carboidratos (<http://www.cazy.org>). Até o momento, 173 famílias e 5 subfamílias de glicosil hidrolases estão listadas na plataforma de dados CAZY “Carbohydrate-active enzyme”, das quais os grupos GH5, GH7, GH8, GH9, GH10, GH11, GH12, GH16, GH26, GH30, GH43, GH44, GH51, GH52, GH62, GH98, GH115, GH116, GH120 e GH140 tem a presença de xilanases (Ahmed et al., 2009; Chadha et al., 2019). As xilanases são 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).

Entre as classes de xilanases os termos sinônimos mais usados incluem xilanase, endo-1,4- β -xilanase, endoxilanase, 1,4- β -D-xilana-xilanohidrolase e β -xilanase (Collins et al., 2005; Thomas, 2017). As xilanases são glicosidases (E.C. 3.2.1.x) que catalisam a endo hidrólise de ligações 1,4- β -D-xilosídicas em xilana (Collins et al., 2005). As xilanases ocorrem em

diferentes classes, como endo-1,4- β -xilanase, β -D-xilosidases, acetilxilano esterase, arabinofuranosidases e α -alucuronidase (Srivastana et al., 2020).

A xilana é um polissacarídeo que compõe a parede celular de plantas e consiste em uma β -1,4 cadeia principal, sendo clivada pelas xilanases (Mohan, 2020). Devido as suas heterogeneidades as xilanases diferem no modo de ação e a preferência por certos tipos de xilana com base na natureza dos resíduos laterais, além de provavelmente divergir na função fisiológica (Puchart et al., 2021). A hidrólise completa da xilana requer a participação de muitas enzimas, até a liberação de monômeros.

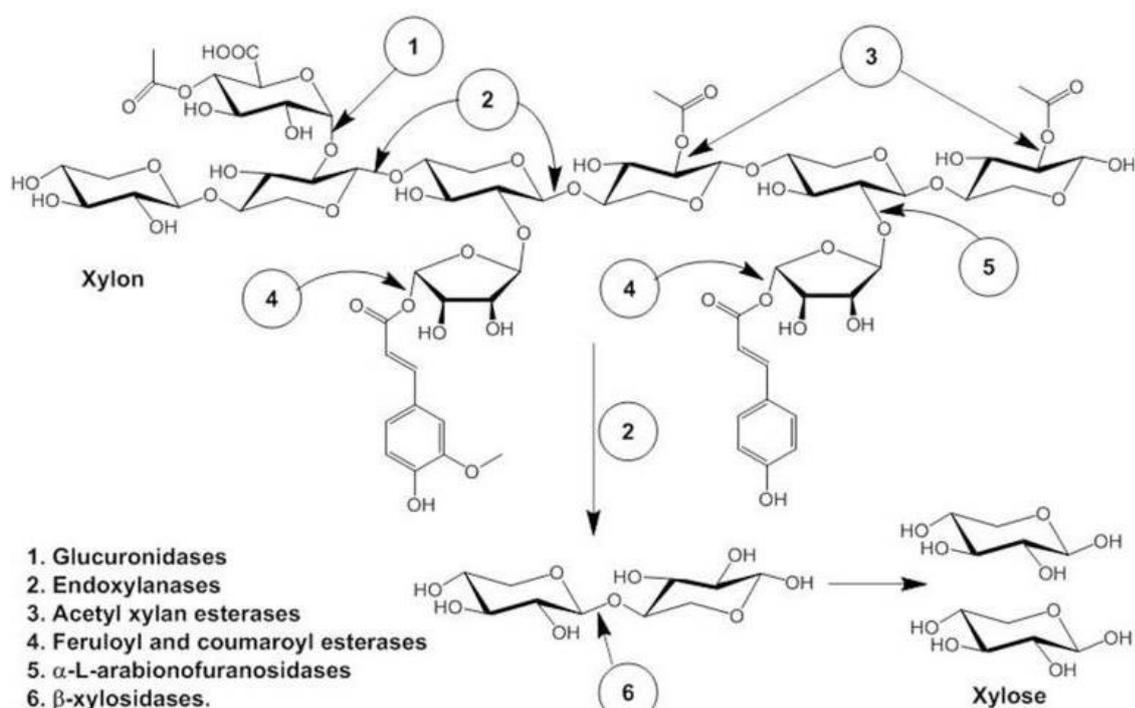


Figura 3. Sistema xilanolítico e seus pontos de clivagem até a liberação de xilose. (Yadav et al., 2018).

A hidrólise da xilana (Figura 3) é principalmente realizada pela endoxilanase que quebra a espinha dorsal da β -D-xilopiranosose liberando xilo-oligômeros e β -xilosidases, que se decompostos ainda mais liberam xilose (Mohan, 2020; Naidu et al., 2018). As endo-1,4- β -xilanases (E.C. 3.2.1.8) são as principais enzimas do sistema xilanolítico, já que despolimerizam a xilana quebrando as ligações β -1,4-glicosídicas da xilana em xilooligossacarídeos (Srivastana et al., 2020). De modo geral, as endo-1,4- β -xilanases não hidrolisam unidades de xilobiose, porque a atividade catalítica dessas enzimas tende a diminuir com a redução de seus substratos (Polizeli et al., 2005). As β -xilosidases (E.C. 3.2.1.37), atuam

em cooperação com as endo-1,4- β -xilanas, liberando unidades de xilose a partir das extremidades não redutoras dos xilooligossacarídeos (Kurakake et al., 2005).

As α -arabinofuranosidases (E.C. 3.2.1.55) removem os resíduos de L-arabinofuranosil ligados às posições C-2 e/ou C-3 dos resíduos de xilose (Polizeli et al., 2005; Burlacu et al., 2016). A remoção desses substituintes contribui para a despolimerização da xilana e favorece o acesso das endo-1,4- β -xilanas (Sun et al., 2012). Ademais, a clivagem de certas xilanas pode requerer a ação de α -glucuronidasas (E.C. 3.2.1.139), enzimas responsáveis pela hidrólise de ligações glicosídicas do tipo α -1,2 que unem os resíduos laterais de α -D-glucuronosil e/ou 4-O-metil- α -D-glucuronosil às unidades de xilose (Polizeli et al., 2005). As α -glucuronidasas agem junto das xilanas para a degradação de polissacarídeos presentes nas paredes celulares das plantas (Nurizzo et al., 2002).

As esterases, no sistema xilanolítico, tem o papel de realizar a remoção dos demais substituintes do complexo estrutural da xilana. As acetil xilana esterases (E.C. 3.1.1.72) exibem a reação de desacetilação, que é geralmente mais complicado devido à posição variável do grupo acetil junto com a substituição do grupo OH. A finalidade da acetil xilana esterase é gerar novos locais onde as GH podem se ligar e, assim, causar hidrólise completa (Biely et al., 2016).

As xilanas são produzidas por vários organismos, como fungos, bactérias, leveduras, protozoários (Heinen, 2017; Collins et al., 2005). Estudos mostraram que algumas cepas são consideradas maiores produtoras de xilanas pertencentes aos gêneros: *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Pichia* e *Fusarium* (Adsul et al., 2005). Os fungos geralmente produzem xilanas que são ativadas em pH ácido, isso inclui os gêneros *Trichoderma*, *Penicillium*, e *Aspergillus*, que também possuem alta atividade em temperaturas entre 40 e 60°C.

Exemplos de fungos produtores de xilanas termofílicas são *Trichoderma reesei*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus sulphureus*, *Aspergillus versicolor*, *Aspergillus fischeri*, *Melanocarpus albomyces*, *Cerrena unicolor*, *Thermomyces lanuginosus*, *Rhizopus oryzae* etc. (Thomas et al., 2014). *Thermotoga* sp., *Caldicellulosiruptor* sp., *Rhodothermus marinus* e *Thermoascus aurantiacus* são consideradas fontes de xilanas termofílicas e hipertermofílicas pertencentes as famílias GH10 e 11 (Thomas, 2017). *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium corylophilum*, *Penicillium funiculosum*, *Penicillium oxalicum*, e *Trichoderma harzianum* são espécies que mostraram alta capacidade de produção de xilanas em resíduos agroindustriais como farelo de trigo, bagaço de cana, palha de arroz, milho etc. (Abdel-Sater & El-Said, 2001).

Os primeiros usos de xilanases foi em ração animal, depois houve expansão para indústrias de alimentos, papel e têxteis (Harris & Ramalingam, 2010). As xilanases desempenham um papel importante na indústria alimentícia, pois hidrolisam os polissacarídeos presentes na farinha de trigo e ajudam no cozimento de bolos, pães, biscoitos e outros alimentos (Godfrey & West, 1996). A utilização de xilanases na indústria de panificação melhora a textura e o volume do pão (Heinen, 2017). Xilanases podem ser usadas em sinergismo com outras enzimas como pectinases, celulases e amilases, que também são utilizados para a clarificação de sucos (Motta et al., 2013). Estas proteínas também são usadas na indústria cervejeira para melhorar a eficiência da filtração (Wang et al., 2016). As xilanases são usadas na conversão de xilitol a partir de resíduos de D-xilose, um valioso adoçante utilizado como substituto do açúcar para população diabética (Sena et al., 2016).

As xilanases são extensivamente usadas em ração animal de suínos, aves, peixes e outros. Dentre os alimentos que compõem a dieta animal, há cereais como trigo, centeio, cevada, milho, arroz e soja, que são ricos em biomassa composta por celulose, hemicelulose e lignina (Heinen, 2017). No entanto, as propriedades viscosas desses materiais lignocelulósicos dificultam sua digestão (Kalim et al., 2015). A adição de xilanases garante a utilização dos nutrientes retidos no interior das células vegetais, ao mesmo tempo que reduz a viscosidade criada por polissacarídeos não amiláceos no trato digestivo do animal (Pirgozliev et al., 2015). Logo, a utilização de xilanase facilita a digestibilidade em rações e aumenta o conteúdo nutricional (Damiano et al., 2003). A adição de xilanases exógenas às dietas dos animais tem demonstrado efeitos benéficos na eficiência na absorção de nutrientes, crescimento e ganho de peso em animais não-ruminantes (Yegin, 2017). Além disso, xilooligossacarídeos específicos podem ser produzidos através do uso de xilanases em dietas de suínos e aves para melhorar sua ação probiótica (Choct, 2015).

1.5.3.1 Xilana

A biomassa lignocelulósica é um material vegetal derivado de plantas como madeiras macias, maduras duras e gramíneas, é principalmente composto por três polímeros: lignina, celulose e hemicelulose (Lee, 1997). A celulose é o polímero mais abundante na biomassa lignocelulósica constituindo de 30-50%, dependendo da espécie de planta e da idade. A lignina compõe entre 10 e 20% da biomassa lignocelulósica dependendo da espécie. As hemiceluloses constituem entre 15 e 35% da biomassa lignocelulósica das plantas. A hemicelulose é uma classe de polímeros baseado em açúcares pentose e hexose, ou combinações de ambos (Polizeli,

2009), na qual a xilana é o componente mais abundante, embora sua composição varie entre as espécies (Limayem & Ricke, 2012).

A xilana geralmente consiste em uma espinha dorsal D-xilosil ligado em β -(1 \rightarrow 4), que ainda possui ramificações de diferentes resíduos, como α -L-arabinose, ácido α -D-glicurônico, ácido 4-O-metil-glicurônico (MeGlcA) e ácido acético (Ebringerová & Heinze, 2000). Além disso, xilana com unidades mistas de D-xilosil ligadas a β -(1 \rightarrow 3) (1 \rightarrow 4) como estrutura principal também foram encontrados em espécies de *Plantago* (Deniaud et al., 2003). Embora o conteúdo de xilana, o tipo e o grau de substituintes de xilana variem entre diferentes espécies e tipos de tecidos (Gírio et al., 2010), geralmente dois tipos principais são reconhecidos: glicuronoxilana (GX, O-acetil-4-O-metilglucuroxilana) e glicuronoarabinoxilana (GAX, (O-acetil-) arabino-4-O-metilglicuronoxilana) (Gírio et al., 2010; Vuong & Master, 2022).

As xilanas são ligadas covalentemente com a bainha sobreposta de lignina (Biely, 1985). As camadas de xilanas ligadas covalentemente e lignina, e a interação não covalente de xilanas com fibras de celulose são essenciais para a proteção das fibras contra a ação de enzimas, especialmente celulasas (Uffen, 1997). Desta maneira, o pré-tratamento do material lignocelulósico antes da hidrólise enzimática é uma etapa interessante devido à estrutura complexa da planta parede celular, aumentando a acessibilidade das xilanases e outras enzimas. Os procedimentos de pré-tratamento visam remover lignina e hemicelulose, aumentando a porosidade dos materiais lignocelulósicos (Heinen, 2017). Existem vários pré-tratamentos descritos na literatura, como extrusão mecânica, pré-tratamentos ácidos e alcalinos, líquidos iônicos, explosão de vapor, explosão de fibra de amônia e água quente, usando enzimas degradadoras de lignina e métodos integrados desses pré-tratamentos, a fim de melhorar a eficiência do fracionamento, diminuir a formação de inibidores e diminuir o tempo de processo (Polizeli et al., 2016).

1.6 Alimentação animal

A indústria de ração animal utiliza ingredientes de origem vegetal para a fabricação da dieta. A composição geral de um grão de cereal é farelo, germe e endosperma. O germe do cereal se desenvolve em uma nova planta e o amido é armazenado no endosperma. Os carboidratos não digeríveis são encontrados em todos os componentes, mas variam em tipo e características físico e químico. As fibras em cereais incluem os polissacarídeos não amiláceos (PNA), oligossacarídeos e polissacarídeos não carboidratos e outros (Adebowale et al., 2019).

Os PNA presentes nos grãos são carboidratos predominantemente ligados por ligação β -glicosídica, incluindo celulose, hemicelulose e polissacarídeos pécticos (Kumar et al., 2012).

Os cereais são a principal fonte de carboidratos e fibras vegetais nas dietas de animais não-ruminantes como aves e suínos e representam mais de dois terços a ingestão total de energia (Bach Knudsen et al., 2012). A indústria de ração animal utiliza grãos como arroz, trigo, sorgo, milho e a soja. O valor nutricional destes ingredientes varia com a quantidade de amido, óleos, proteínas, além de fatores antinutricionais como fitato, amido resistente, PNA e inibidores enzimáticos (Cowieson, 2005).

O milho é o ingrediente predominante em formulações de ração para aves. Os grãos de milho de maneira geral possuem em sua estrutura mais de 80% de carboidratos e deste total, 70 a 80% é amido, 10% a 30% são PNA e 1% a 3% são monos e oligossacarídeos (Bach Knudsen, 1997). A maioria dos PNA presentes no milho e no farelo de soja são encontrados na forma insolúvel o que, conseqüentemente, não aumenta a viscosidade intestinal, interferindo pouco na digestão quando comparados a outros alimentos vegetais mais fibrosos como arroz, trigo ou cevada (Gracia et al., 2003).

O mercado considera o farelo de soja como concentrado proteico padrão em razão de fornecer maior desempenho, mais aceitabilidade e boas quantidades de nutrientes para os animais (Syngenta Digital, 2021). O farelo de soja é uma fonte proteica extensivamente utilizada na formulação de rações para frangos de corte; entretanto, este ingrediente possui, aproximadamente, 24% de PNA totais, sendo 6% encontrados na forma solúvel e 16 a 18% na forma insolúvel, com 3,3% de arabinoxilanos (Back Knudsen, 1997). Além de milho e soja, o arroz é um dos cereais mais consumidos do mundo. A composição química dos grãos de arroz pode variar, possuindo em média 25% de PNA, sendo o grão constituído basicamente de casca (22%), endosperma (70%) e farelo (8%) (Dors et al., 2009). A maioria das rações comerciais formuladas para animais de corte são à base de milho, arroz e farelo de soja. Além da necessidade de conhecimento sobre os efeitos gerados pela presença de PNA nestes ingredientes, uma maior importância tem sido dada à presença do fitato considerado antinutricional (Zhang et al., 2013). Desta maneira, a utilização ineficiente de alimentos de origem vegetal por animais não-ruminantes (aves e suínos) devido a inacessibilidade estrutural do substrato ou insuficiência enzimática dos animais pode resultar em menos de 75% da utilização dos nutrientes alimentares disponíveis (Ugwuanyi, 2016).

Por isso, são adicionadas enzimas exógenas em ração animal para melhorar a digestibilidade dos alimentos e promover o crescimento, bem como por razões ambientais. O

mercado global de enzimas para alimentação animal ainda está crescendo e oferece um futuro promissor devido à crescente demanda por carne e produtos de origem animal, especialmente nas regiões de rápido crescimento econômico. Ao todo, as aplicações em alimentos e rações representam 55-60% do mercado global de enzimas (Guerrand, 2020). O mercado de enzimas alimentares é dominado por quatro classes principais de enzimas: enzimas de degradação de fibras (complexos de hemicelulases, xilanases, pectinases), proteases, amilases e enzimas fílicas. Estas enzimas são usadas sozinhas ou como preparações multienzimáticas para melhorar valor e utilização de diferentes alimentos (Ugwuanyi, 2016).

Apesar de haver disponibilidade de enzimas comerciais, há uma busca por novas enzimas produzidas por fungos filamentosos que devem ser de baixo custo e eficientes, para serem extensivamente usadas na fabricação de rações animais. Exemplos de fungos produtores de fitases para uso nas rações são *Aspergillus niger* NCIM 563 (Puppala et al., 2021), *Aspergillus awamori* NCIM 885, *Aspergillus foetidus* (Lalpanmawia et al., 2014), *Rhizopus oligosporus* MTCC 556 (Suresh et al., 2021). Exemplos de produtores de protease para uso em rações são *Fusarium equiseti* e *Trichoderma reesei* (Walk et al., 2019), *Aspergillus niger* (Abrunhosa et al., 2006; Novelli et al., 2017), *Aspergillus oryzae* (Novelli et al., 2017), *Aspergillus oryzae* SBS50 (Sapna, 2017), *Aspergillus tamaris* (Boer & Peralta, 2000), *Aspergillus versicolor* CJS-98 (Veerabhadrapa et al., 2014). Exemplos de produtores de xilanase para uso em ração animal são *Aspergillus nidulans* (Pereira et al., 2018), *Fusarium verticilloide*, *Aspergillus clavatas*, *Trichoderma reesei* (Ndou et al., 2015), *Penicillium chrysogenum* QML-S (Zhang & Sang, 2015), *Aspergillus sulphureus* (Liu et al., 2021).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O estudo foi realizado com o objetivo de selecionar e caracterizar o fungo com a melhor produção de fitase, protease e xilanase, aplicar estas enzimas em alimentos ingredientes de dietas para animais e compará-las com as enzimas comerciais.

2.2 Objetivos específicos

- i. Seleção dos melhores produtores de fitases, proteases e xilanases usando fontes de carbono alternativas;
- ii. Avaliação do tempo de crescimento para a produção das enzimas;
- iii. Caracterização bioquímica e comparação das atividades quanto a temperatura e pH das enzimas produzidas (fitase, protease e xilanase) com as enzimas comerciais;
- iv. Aplicação das enzimas produzidas nesse estudo e as enzimas comerciais em 11 alimentos para animais.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Microrganismos e manutenção de crescimento

Foram utilizados sete fungos, *A. flavus* Link, *A. japonicus* Saito, *A. niger* van Tieghem, *A. niveus* Blochwitz, *A. terreus* Thom, *Aspergillus sp.* (Maçã 2) e *Thermoascus aurantiacus* Miehe, disponíveis na micoteca da UFMS em Campo Grande – MS para a produção das enzimas. Para a manutenção das cepas foram feitos repiques em ágar inclinado (BDA – batata, dextrose, ágar), onde os fungos foram mantidos em estufa a 30° C para os fungos do gênero *Aspergillus* e 40 °C para *T. aurantiacus*, por um período de 5-8 dias. Posteriormente armazenados em geladeira, podendo ser utilizados em até 30 dias.

3.2 Produção de fitase, protease e xilanase em cultivo semi-sólido (FSS) usando fontes de carbono alternativas

Para a produção das enzimas foram realizados cultivos em estado semi-sólido (FSS) em frascos Erlenmeyer de 125 mL suplementado com 2,5 % (p/v) de 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. As fontes de carbono foram esterilizadas e posteriormente inoculadas com uma suspensão de esporos (10^6 esporos/mL) usando 5 mL da solução de sais para o inóculo em pH 6 (Khanna et al., 1995; Martins et al., 2012).

Posteriormente, as culturas em meio semi-sólido foram incubadas sob condição estacionária por 120 h a 30 °C para os fungos *Aspergillus* e *T. aurantiacus* a 40 °C. Após o crescimento as culturas foram ressuspendidas com 20 mL de água destilada autoclavada, agitadas por 30 minutos e filtradas com auxílio de peneiras para extração das enzimas extracelulares. Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 4 °C a 8.609 g, sendo o sobrenadante usado como fonte de enzimas nos ensaios enzimáticos e quantificação de proteínas.

3.3 Efeito do tempo de crescimento e produção das enzimas

Para análise do efeito do tempo de crescimento, foram realizados cultivos em meio semi-sólido (FSS) em frascos Erlenmeyer de 125 mL suplementado com 2,5 % (p/v) de fontes de carbono alternativas: farelo de arroz integral e palha de arroz. As fontes de carbono foram

esterilizadas e posteriormente inoculadas com uma suspensão de esporos (10^6 esporos/mL) usando 5 mL da solução de sais para o inóculo em pH 6 (Khanna et al., 1995; Martins et al., 2012).

Posteriormente, as culturas em meio semi-sólido foram incubadas em estufa por um período variando de 48 a 168 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. As amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 4°C a 8.609 g, sendo o sobrenadante usado como fonte de enzimas nos ensaios enzimáticos e quantificação de proteínas.

3.4 Ensaio de atividade enzimática e protéica

A atividade da fitase foi determinada de acordo com o método de Heinonen & Lahti (1981). Foi preparado o seguinte reagente, usado como solução de parada da reação: molibdato de amônio $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \times 4 \text{H}_2\text{O}$ (10mM) dissolvido em água destilada, H_2SO_4 (5 N) dissolvido em água destilada e acetona, misturados 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. A leitura ocorreu em espectrofotômetro a 355 nm.

A atividade enzimática de protease foi realizada usando caseína 1% como substrato (Sarath et al., 1989). O meio reacional foi constituído por 1000 μL de tampão fosfato de sódio monobásico 50 mM, pH 6,5 usando caseína a 1% como substrato e 100 μL do extrato enzimático. Uma solução com tirosina a 0,02 g/mL foi usada como padrão. A mistura foi colocada em banho-maria por 10 minutos a 50 °C, a reação foi interrompida com ácido tricloroacético (TCA) a 10 %. Após centrifugação por 15 minutos a 8.609 g, a leitura ocorreu em espectrofotômetro a 280 nm. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima liberando 1 μmol de produto por minuto.

A dosagem de xilanase foi realizada com tampão de reação citrato-fosfato 0,2 M (McIlvaine, 1921) com 500 μL , pH 5, contendo 1,0 % (w/v) de xilana e 500 μL de extrato 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. A leitura ocorreu em espectrofotômetro a 540 nm. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima liberando 1 μ mol de açúcar redutor por minuto.

A dosagem de proteína foi realizada segundo o método de Lowry (Lowry et al., 1951) utilizando-se soroalbumina bovina (200 μ g/mL) como padrão. A atividade específica foi definida em unidades por miligrama de proteína (U/mg).

3.5 Enzimas comerciais

As enzimas utilizadas foram: fitase comercial foi diluída a 1% (w/v); protease comercial e a xilanase comercial foram diluídas a 0,1% (w/v). As diluições das enzimas comerciais foram feitas a fim de padronizar o mesmo número de unidades, para comparação com as enzimas produzidas pelos fungos, com substrato padrão conforme a metodologia descrita no item 3.4. As soluções foram armazenadas em geladeira até o momento do uso. Todas as enzimas foram padronizadas com o mesmo número de unidades para posterior aplicação nos alimentos para fins de comparação. Para essa padronização, foram usadas inicialmente ácido fítico, caseína e xilana como substrato para as dosagens de fitase, protease e xilanase, respectivamente. Após a padronização as soluções enzimáticas foram testadas nos alimentos.

3.6 Caracterização bioquímica de fitase, protease e xilanase

3.6.1 Avaliação da temperatura na atividade enzimática

Para a determinação do efeito da temperatura na atividade enzimática, foram seguidas as metodologias de dosagem enzimática descritas anteriormente. As misturas de reação foram incubadas em diferentes temperaturas, com intervalos de 5 °C variando de 35 a 60 °C. Os resultados foram expressos em percentagem (%), considerando a maior atividade como 100%.

3.6.2 Avaliação do pH na atividade enzimática

Para a determinação do efeito do pH na atividade enzimática, foram seguidas as metodologias de dosagem enzimática descritas anteriormente. Para determinar o pH ótimo de

fitase foram utilizados os tampões ácido cítrico 50 mM (3 – 3,5), tampão acetato de sódio 0,2 M (4 – 5,5) e citrato de sódio 0,2 M (6 - 6,5). Com a finalidade de estabelecer o pH ótimo para protease foram usados tampões acetato de sódio 0,2 M (4 – 5,5) e fosfato de sódio (6 – 8). A determinação do pH ótimo para xilanase foi realizada com tampão citrato-fosfato (3 – 8), de acordo com a descrição de McIlvaine (1921). Os resultados foram expressos em porcentagem (%), considerando a maior atividade como 100%.

3.7 Avaliação das atividades enzimáticas produzidas nesse estudo e das enzimas comerciais em diferentes alimentos para animais

Foram utilizados 11 alimentos para animais (obtidos pela FAMEZ-UFMS) para o teste de atividade enzimática *in vitro*. Os ensaios enzimáticos foram feitos de acordo com o item 3.4, adicionando 1% de alimento como substrato nas reações. A fitase de *A. niveus* e a enzima comercial, assim como a protease de *A. niveus* e a enzima comercial, foram incubadas por 30 minutos em 50 °C e pH 5 junto aos alimentos. Já a xilanase de *A. niveus* e a comercial foram incubadas junto aos alimentos a 50 °C, pH 5 em três tempos distintos (4, 8 e 24 horas). Os alimentos usados 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) (Tabelas 1 e 2).

Tabela 1. Constituição dos componentes presentes nos alimentos para animais

Alimento	PB (%)	Fósforo total (%)	Fósforo fítico (%)
Milho	6,92	0,29	0,21
Milheto	12,4	0,29	0,21
Sorgo	8,75	0,23	0,16
Farelo de soja	46,5	0,59	0,38
Farelo de trigo	15,1	0,94	0,45
Farelo de arroz	13,3	1,71	1,37
Casca de soja	14,4	0,15	0,03
DDGS-Etanol	29,5	0,56	0,37
DDGS-Sabugo	-	-	-
Dieta M+FS	12,73	*	*
Dieta alternativa	12,73	*	*

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

Tabela 2. Composição nutricional dos alimentos (PNA's)

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.

3.8 Teste estatístico

Para a análise estatística foram realizados os testes ANOVA e 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).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Efeito de diferentes fontes de carbono na produção enzimática

O extrato bruto rico em enzimas extracelulares foi produzido através do cultivo em estado semi-sólido e extraído de acordo com a metodologia descrita no item 3.2. Os resultados mostraram que a melhor fonte de carbono para produção de fitase foi o arroz integral com o fungo *A. niveus* ($0,43 \pm 0,05$ U/mg), seguido por *Aspergillus* sp. M2 ($0,42 \pm 0,03$ U/mg), *A. niger* (0,3 U/mg) e *A. japonicus* ($0,28 \pm 0,01$ U/mg) em palha de arroz (Tabela 3). Estudos realizados por Neira-Vielma et al. (2018), observaram a potencial produção de fitase usando *A. niger* em triticale (1,13 U/mg) como fonte de carbono. Similar ao presente estudo, *A. fumigatus* demonstrou capacidade de produção de fitase, com uma atividade ótima de 0,23 U/mg, porém, a produção de fitase mostrou diminuição da atividade após 24 horas (Sanni et al., 2018).

Espécies de outros gêneros já foram reportados como produtores de fitase, o *Trichoderma asperellum* Q1 crescido em meio líquido mostrou produção de até 0,17 U/mL (1,7 U/g) de fitase (Zhao & Zhan, 2015). Crescido em meio sólido, *Acremonium zeae* obteve atividade de fitase superior a 0,10 U/mL (1,00 U/g) em farelo de milho após 120 h de fermentação (Pires, 2016). A utilização de farelo de arroz também foi reportada por Suresh et al. (2021), que mostrou em *Rhizopus* sp. a produção de fitase com atividade de $4,9 \pm 0,1$ U/g. Comparando os resultados obtidos no presente trabalho a estudos anteriores, é possível afirmar que fontes de carbono agro residuais ricas em fósforo fítico, como a palha de arroz e o arroz integral, são eficazes para a indução da produção de fitase.

Tabela 3. Avaliação de diferentes fontes de carbono na produção de fitase

Fontes de carbono	Fitase (U/mg)						
	AF	AJ	ANI	AN	AT	TA	M2
FT	0,09 ^c	0,06 ^c	0,05 ^d	0,04 ^{bc}	0,04 ^{bc}	0,05 ^c	0,07 ^c
AI	0,15 ^b	0,19±0,03 ^b	0,15 ^c	0,43±0,05 ^a	0,06 ^{abc}	0,27±0,01 ^a	0,23±0,01 ^b
FM	0,02 ^e	0,04 ^c	0,05 ^d	0,02 ^c	0,02 ^c	0,03 ^c	0,1 ^c
PA	0,22 ^a	0,28±0,01 ^a	0,3 ^a	0,11 ^b	0,08 ^a	0,21±0,02 ^{ab}	0,42±0,03 ^a
BC	0,02 ^e	0,03 ^c	0,05 ^d	0,03 ^c	0,02 ^c	0,03 ^c	0,04 ^c
PM	0,06 ^d	0,05 ^c	0,05 ^d	0,04 ^{bc}	0,02 ^c	0,09 ^c	0,05 ^c
FS	0,1 ^c	0,11±0,03 ^c	0,24 ^b	0,08 ^{bc}	0,07±0,01 ^{ab}	0,2±0,02 ^b	0,19±0,04 ^b

Os fungos cresceram em meio semi-sólido 2,5% por 120h a 30°C e 40°C em *T. aurantiacus*. Fungos filamentosos: AF (*A. flavus*), AJ (*A. japonicus*), ANI (*A. niger*), AN (*A. niveus*), AT (*A. terreus*), TA (*T. aurantiacus*), M2 (*Aspergillus* sp. Maçã 2). 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, realizado 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.

De acordo com os resultados obtidos, os melhores produtores de protease foram *Aspergillus* sp. M2 com 3,32 U/mg em palha de arroz, seguido por *A. flavus* ($2,44 \pm 0,02$ U/mg) em farelo de trigo e *Aspergillus* sp. M2 em palha de milho ($1,72 \pm 0,01$ U/mg) (Tabela 4). Em estudo semelhante de Javed et al. (2010), *Sporotrichum thermophile* mostrou produção com 0,32 U/mL (3,2 U/g) em farelo de arroz. Uma cepa de *Aspergillus* spp foi capaz de produzir enzima protease com 0,277 U/mL (2,77 U/g) em melaço de cana como meio de fermentação (Radha et al., 2011). Essas produções foram semelhantes quando comparadas as obtidas para fungos testados no presente estudo, sendo possível inferir que os fungos utilizados são melhores produtores de protease nas condições testadas.

Muitos gêneros fungicos são reportados como bons produtores de proteases. *Graphium putredinis* e *Trichoderma harzianum* inoculados em grãos de soja, demonstraram potencial para produção de protease, com atividade de 0,38 IU/mL (3,8 IU/g) e 0,32 IU/mL (3,2 IU/g), respectivamente (Savitha et al., 2011). Com resultados semelhantes aos encontrados no presente estudo, Ikasari & Mitchell (2014), relataram que o fungo *Rhizopus oligosporus* obteve atividade de 3,9 U/mg tendo como fonte de carbono a casca de arroz.

Tabela 4. Avaliação de diferentes fontes de carbono na produção de protease

Fontes de carbono	Protease (U/mg)						
	AF	AJ	ANI	AN	AT	TA	M2
FT	2,44±0,02 ^a	0,6 ^c	0,29±0,01 ^c	0,56±0,01 ^{ab}	1,3±0,05 ^a	0,77±0,01	0,59±0,02 ^e
AI	0,69±0,11 ^c	0,54±0,06 ^c	0,34±0,02 ^c	0,75±0,03 ^a	0,25±0,05 ^e	0,82±0,25	0,93 ^d
FM	1,08±0,1 ^b	0,63 ^c	0,37±0,08 ^c	0,4±0,01 ^{ab}	0,51 ^d	0,52	0,68±0,07 ^{de}
PA	1,08±0,11 ^b	0,77 ^b	0,72±0,01 ^b	0,65±0,18 ^{ab}	0,57±0,08 ^{cd}	0,54±0,03	3,32 ^a
BC	0,7±0,02 ^c	0,62 ^c	0,73±0,03 ^b	0,42 ^{ab}	0,78±0,03 ^b	0,91	1,27±0,03 ^c
PM	1,04±0,06 ^b	1 ^a	1 ^a	0,5 ^{ab}	0,71±0,02 ^{bc}	0,7±0,16	1,72±0,01 ^b
FS	0,83 ^{bc}	0,34±0,01 ^d	0,69±0,03 ^b	0,44±0,07 ^b	0,42±0,07 ^{de}	0,55±0,08	0,94±0,08 ^d

Os fungos cresceram em meio semi-sólido 2,5% por 120h a 30°C e 40°C em *T. aurantiacus*. Fungos filamentosos: AF (*A. flavus*), AJ (*A. japonicus*), ANI (*A. niger*), AN (*A. niveus*), AT (*A. terreus*), TA (*T. aurantiacus*), M2 (*Aspergillus* sp. Maçã 2). 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, realizado 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.

A melhor produção de xilanase foi observada em *A. niveus* (59,09 U/mg) com arroz integral, seguido por *Aspergillus* sp. M2 (57,4 U/mg), *A. flavus* (39,95 ± 12,55 U/mg) e *A. japonicus* (22,55 ± 4,88 U/mg) em palha de arroz, mostrando potencial para produção da enzima de interesse (Tabela 5). Muitos fungos filamentosos foram reportados como produtores de xilanase em resíduos agroindustriais, em um estudo realizado com *Aspergillus casei* verificaram a produção de xilanase em fermentação semi-sólida, obtendo com bagaço de cevada atividade específica de 9,22 U/mg, e em casca de amendoim 4,55 U/mg, sendo possível dizer que *A. niveus*, *Aspergillus* sp. M2 e *A. flavus* geraram maior produção de xilanase quando comparado aos resultados obtidos por Kronbauer (2007). Ensaio realizado com *A. fumigatus* UR01 mostraram que não houve crescimento em bagaço de cana, palha de milho, coco ou espiga de milho, obtendo a maior atividade de xilanase em palha de arroz com 161,2 U/g (Singhajutha et al., 2020).

Por outro lado, há estudos de produção de xilanase envolvendo fungos de outros gêneros. Em Rajoka et al. (2005), foi relatado que o fungo *Humicola lanuginosa* que registrou atividade de 171 IU/mg de proteína em farelo de arroz, além de possível produção em farinha de canola, farinha de girassol e palha de trigo. Testado em diferentes fontes de carbono alternativas, *Fusarium graminearum* Ec220 apresentou a maior produção de xilanase com 1,79 U/mL (17,9 U/g) em farelo de girassol (Cruz-Davila et al., 2022). As produções obtidas pelo presente estudo nos fungos do gênero *Aspergillus* mostram que estes microrganismos são potenciais produtores de xilanase ao utilizarem fontes de carbono alternativas e agro residuais, como o arroz integral e a palha de arroz. Sendo assim, sabendo que a palha de arroz é rica em

hemiceluloses (20-40%), esta deve ser, portanto, considerada uma fonte de carbono adequada para a produção de xilanase.

Tabela 5. Avaliação de diferentes fontes de carbono na produção de xilanase

Fontes de carbono	Xilanase (U/mg)						
	AF	AJ	ANI	AN	AT	TA	M2
FT	3,91±0,63 ^b	3,23±0,66 ^b	4,69±1,42 ^b	4,66±1,38 ^b	1,16±0,07 ^b	7,74±2,62 ^{bc}	3,16±1,04 ^b
AI	7 ^b	1,71±1,12 ^b	3,91±0,21 ^c	59,09 ^a	1,16±0,19 ^b	1,07 ^c	10,87±2,65 ^b
FM	-	5,67±1,56 ^b	2,86±0,24 ^c	1,7±0,23 ^b	0,74±0,35 ^b	2,32±0,17 ^{bc}	9,29±4,13 ^b
PA	39,95±12,5 ^a	22,55±4,88 ^a	21,31±2,51 ^a	1,1±0,15 ^b	17,83±4,28 ^a	18,75±2 ^a	57,4±9,62 ^a
BC	5,7±2,13 ^b	5,74±1,65 ^b	5,84±2,27 ^{bc}	2±0,39 ^b	4,52±1,54 ^b	0,14 ^c	8,79±3,15 ^b
PM	9,75±4,43 ^{ab}	5,62±1,97 ^b	4,45±1,15 ^c	1,71±0,08 ^d	3,69±0,08 ^b	9,94±2,59 ^b	6,8±2,4 ^b
FS	-	1,64±0,03 ^b	-	0,35±0,24 ^d	0,65±0,28 ^b	0,83 ^c	7,7±0,99 ^b

Os fungos cresceram em meio semi-sólido 2,5% por 120h a 30°C e 40°C em *T. aurantiacus*. Fungos filamentosos: AF (*A. flavus*), AJ (*A. japonicus*), ANI (*A. niger*), AN (*A. niveus*), AT (*A. terreus*), TA (*T. aurantiacus*), M2 (*Aspergillus* sp. Maçã 2). 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 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

Para estudo do tempo de crescimento para produção enzimática, foram selecionados os fungos *A. niveus*, *A. japonicus* e *Aspergillus* sp. M2, com as melhores fontes de carbono (palha de arroz e arroz integral) indutoras de produção das três enzimas de interesse. Na produção de fitase, *A. niveus* (3,14 U/mg) mostrou um pico em 144 horas de incubação, seguido por *A. niveus* ($3 \pm 0,11$ U/mg) em 48 horas e *Aspergillus* sp. M2 em 144 horas ($2,79 \pm 0,1$ U/mg) (Figura 4).

A produção de fitase também foi observado em *A. niger* com 52 horas de incubação usando soja como fonte de carbono mostrou 1,2 U/g de atividade (Saithi & Tongta 2016). *A. oryzae* AK9 cultivado em soja, mostrou tempo ótimo de produção em 96 horas com atividade de 15 U/g (Chantasartramee, 2005). Por outro lado, *A. niger* NCIM 563, em farelo de trigo, mostrou maior produção em 168 horas de incubação (50 IU/g) (Bhavsar et al., 2013). Segundo Tanruean et al. (2021), *Thermoascus aurantiacus* SL16W mostrou pico de produção de fitase após 288 horas de incubação. Similar aos nossos resultados, *A. niger* CFR 335 e *A. ficuum* SGA 01 mostraram pico de produção de fitase em 144 horas de incubação em estado solido com atividade de 60,2 U/g e 39,4 U/g, respectivamente (Shivanna & Venkateswaran, 2014).

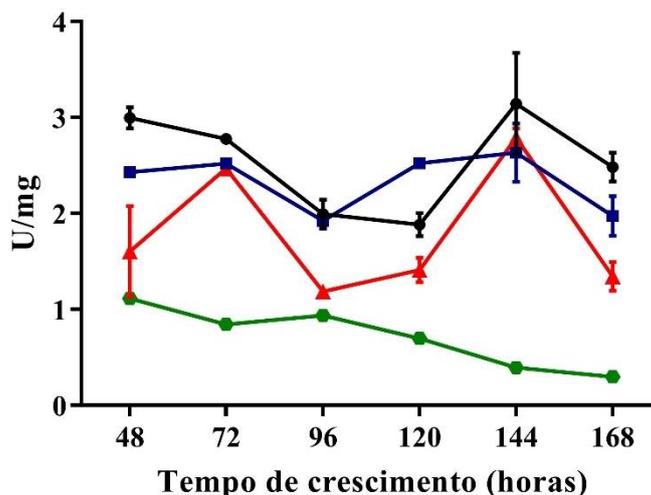


Figura 4. Avaliação do tempo de crescimento para a produção de fitase. Foram utilizados os fungos: (●) *A. niveus*, (■) *Aspergillus* sp (Maçã 2), (▲) *A. japonicus* em palha de arroz, e (●) *A. niveus* em arroz integral. Os fungos cresceram em FSS usando as melhores fontes de carbono para cada fungo por um período variando de 48 a 168 h a 30 °C. Os testes foram feitos em duplicata, realizado média e desvio padrão.

Os picos de produção para protease foram obtidos de forma sinérgica com 96 horas de incubação em palha de arroz, em *A. niveus* ($2,67 \pm 0,35$ U/mg), seguido por *A. japonicus* ($2,55 \pm 0,1$ U/mg) e *Aspergillus* sp. M2 ($2,22 \pm 0,13$ U/mg) (Figura 5). Estudos com *A. niger* mostraram pico de produção de protease após 48 horas de fermentação em estado sólido usando soja e farelo de trigo como fonte de carbono (de Castro et al., 2015). Por outro lado, *Trichoderma reesei* e *Rhizopus oryzae* mostram picos de produção mais tardios, apenas em 168 e 144 horas de incubação, respectivamente (Sun et al., 2021; Ornela & Guimarães, 2019).

Em *A. oryzae* LBA 01 a maior produção de protease foi observada entre 48 e 72 horas, com queda após 72 horas de incubação usando farelo de trigo ($22,38 \pm 1,27$ U/g), algodão ($12,66 \pm 1,33$ U/g) e soja ($4,68 \pm 0,66$ U/g) como fonte de carbono (de Castro et al., 2013). Estudos preliminares com *A. brasiliensis* BCW2 e uma cepa de *A. niger* mostraram pico de atividade em 72 horas de incubação com queda acentuada conforme o tempo de incubação aumenta (Chimbekujwo et al., 2020). Desta maneira, é possível sugerir que a enzima possui um papel importante, sendo produzido na fase de crescimento do fungo para aproveitamento dos nutrientes (proteínas) presentes no substrato sólido (Arunachalam & Saritha, 2009).

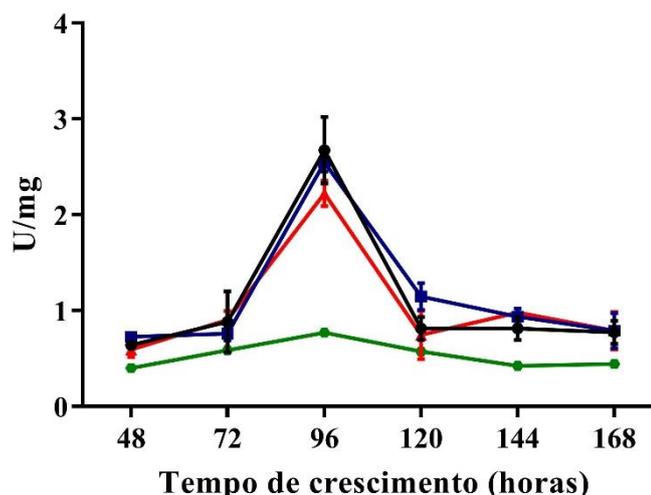


Figura 5. Avaliação do tempo de crescimento para a produção de protease. Foram utilizados os fungos: (●) *A. niveus*, (■) *Aspergillus* sp (Maçã 2), (▲) *A. japonicus* em palha de arroz, e (■) *A. niveus* em arroz integral. Os fungos cresceram em FSS usando as melhores fontes de carbono para cada fungo por um período variando de 48 a 168 h a 30 °C. Os testes foram feitos em duplicata, realizado média e desvio padrão.

Em xilanase, observou-se pico de produção em *A. niveus* usando palha de arroz com 144 horas (11,53 U/mg) de incubação (Figura 6). De acordo com o estudo de Kumar et al. (2018), *A. niger* NFCCI 4113 obteve pico de produção de xilanase em 120 horas de fermentação. Concomitante a este estudo, foi reportado que a atividade de xilanase de *A. niger* KK2 com de palha de arroz em meio sólido como fonte de carbono, obteve como pico de produção em 120 horas de fermentação (Kang et al., 2004). No trabalho de Souza et al. (2020), a produção de xilanase por *Aspergillus* sp. foi induzida pelo uso de talos de girassol, obtendo pico de produção (17,48 U/mL) em 120 horas incubação.

Trichoderma longibrachiatum apresentou maior produção de xilanase após de 96 horas de fermentação, cerca de 2,7 vezes mais enzimas produzidas em relação aos primeiros dias de incubação (Azin et al., 2007). Além disso, em *Aspergillus awamori* IOC-3914 foi observado tempo ótimo de 168 horas de crescimento, com atividade de cerca 250 U/g (Castro et al., 2010). *Schizophyllum commune* ARC-11 mostrou produção máxima de xilanase em 192 horas de incubação (Gautam et al., 2018). Na literatura são reportadas diferentes tempos de incubação para o pico de produção de xilanase, sugerindo que estas enzimas são essenciais para a

promoção do crescimento fúngico, sendo necessária em diferentes tempos para o aproveitamento dos nutrientes.

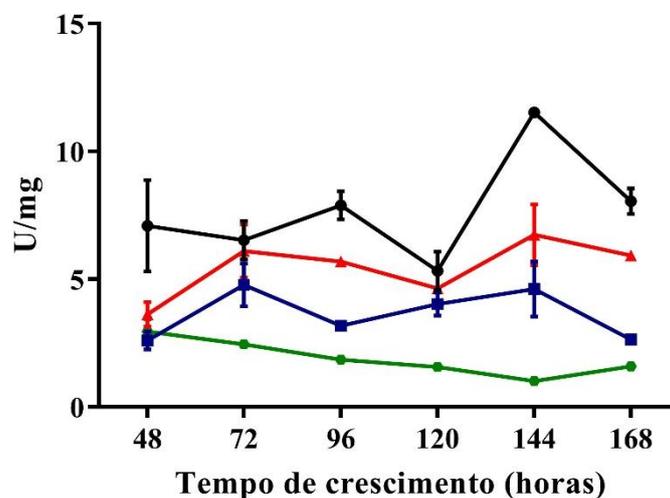


Figura 6. Avaliação do tempo de crescimento para a produção de xilanase. Foram utilizados os fungos: (●) *A. niveus*, (■) *Aspergillus* sp (Maçã 2), (▲) *A. japonicus* em palha de arroz, e (●) *A. niveus* em arroz integral. Os fungos cresceram em FSS usando as melhores fontes de carbono para cada fungo por um período variando de 48 a 168 h a 30 °C. Os testes foram feitos em duplicata, realizado média e desvio padrão.

4.3 Efeito da temperatura na atividade de fitase, protease e xilanase de *A. niveus* comparando com enzimas comerciais

O efeito da temperatura na atividade enzimática da fitase de *A. niveus* foi comparada com uma fitase comercial conforme descrito no item 3.6.1. A fitase de *A. niveus* mostrou temperatura ótima a 45°C (100%), enquanto 71,94% da atividade relativa foi mantida a 40°C. Foi observada uma queda da atividade da enzima entre 50°C e 60°C para 48,77% e 62,19%, respectivamente. A fitase comercial obteve temperatura ótima de atividade a 55°C, com queda de atividade enzimática entre 35°C e 45°C para 45,46% e 32,6%, respectivamente (Figura 7). Em temperaturas superiores como em 60°C, foi observado o decréscimo de atividade para ambas as enzimas.

Em *A. fumigatus* a temperatura ótima de atividade foi obtida a 40 °C, mantendo 69 % da atividade a 30 °C. Já em Naves et al. (2012), *A. oryzae* obteve melhor atividade a 40 °C, enquanto em *A. niger* foi entre 50 e 60 °C. No extrato bruto de *Acremonium zeae* B a

temperatura ideal para atividade de fitase foi de 50 °C (Pires et al., 2019). Em um estudo 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 purificada de *A. oryzae* SBS50 mostrou atividade ótima a 50 °C, mantendo 50 % de atividade em 55 °C e 60 °C (Sapna, 2017).

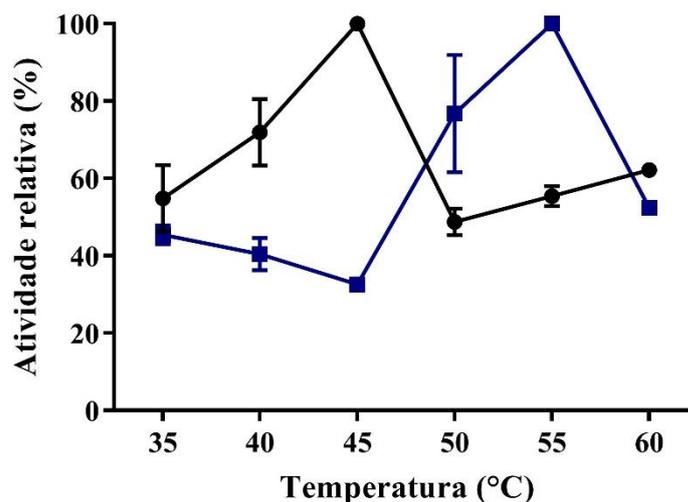


Figura 7. Efeito da temperatura na atividade da fitase de *A. niveus* e da fitase comercial. A atividade enzimática da fitase de (—●—) *A. niveus* e (—■—) comercial foi determinada em temperaturas com variações entre 35 e 60 °C, nas condições ótimas já pré-estabelecidas. As atividades relativas foram calculadas como uma percentagem da atividade máxima. Os testes foram feitos em duplicata, realizado média e desvio padrão.

A temperatura ótima de atividade para protease foi de 50 °C (100 %), seguido por 60 °C (73,11 %) e 55 °C (71,23 %). Já a protease comercial obteve um pico de atividade a 55 °C, com queda de 22,5 % a 60 °C, e entre 35 °C e 50 °C houve queda de mais de 50 % da atividade enzimática (Figura 8). Foram reportados resultados similares aos obtidos no presente estudo, em *A. ochraceus* BT21 e *A. oryzae* KSK-3, nos quais obtiveram temperatura ótima de 50 °C e queda acentuada em temperaturas mais elevadas (Mohamed et al., 2021; Shirasaka et al., 2012). Por outro lado, *A. terreus* mostrou temperatura ótima a 50 °C e manteve atividade de 60 a 80 °C (Niyonzima & More, 2015).

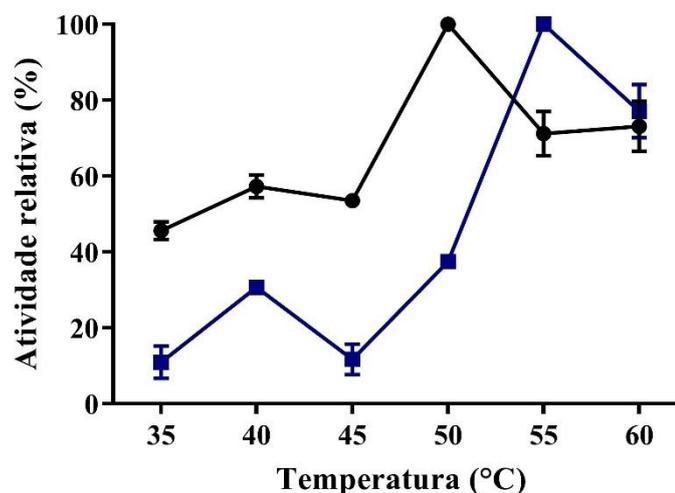


Figura 8. Efeito da temperatura na atividade da protease de *A. niveus* e protease comercial. A atividade enzimática da protease de (—●—) *A. niveus* e (—■—) comercial foi determinada em temperaturas com variações entre 35 e 60 °C, nas condições ótimas já pré-estabelecidas. As atividades relativas foram calculadas como uma porcentagem da atividade máxima. Os testes foram feitos em duplicata, realizado média e desvio padrão.

O pico ótimo na atividade da xilanase foi de 45 °C (100 %), seguido por 50 °C (82,17 %) e 40 °C (81,18 %). Por outro lado, a xilanase comercial mostrou um pico de atividade a 60 °C (Figura 9). Em *A. foetidus* MTCC 4898 a temperatura ótima de xilanase foi 50 °C, sendo mantida entre 48 °C e 55 °C (Shah et al., 2006). Com *A. terreus* FSS129 e uma cepa de *A. niger* foram reportadas temperaturas ótimas a 65°C e 70°C, respectivamente (Bakri et al., 2010).

Outros gêneros produtores de xilanases já mostraram diferentes temperaturas ótimas para a atividade enzimática. Em fungos com atividade termofílicas como *Thermomyces lanuginosus* a atividade ótima de xilanase ocorre a 60 °C (Corrêa et al., 2016). *Trichoderma koningii* e *T. pseudokoningii* mostraram atividade máxima a 50°C e 55°C, respectivamente (Sanguine et al., 2022). Em *S. commune* ARC-11 a atividade máxima de xilanase se mostrou na temperatura de 55°C (Gautam et al., 2018).

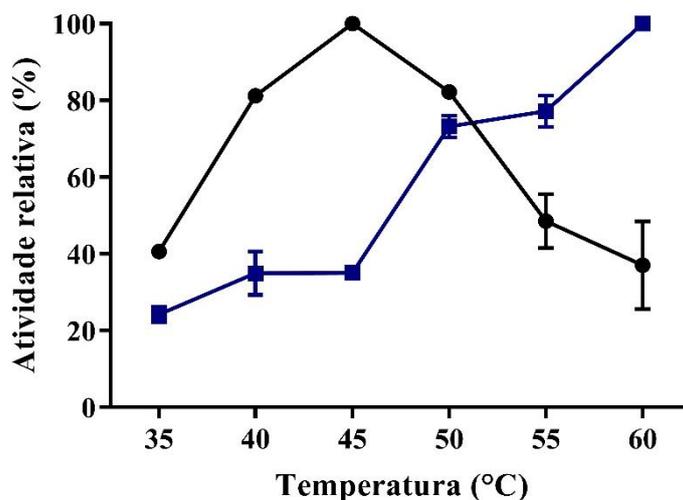


Figura 9. Efeito da temperatura na atividade da xilanase de *A. niveus* e da xilanase comercial. A atividade enzimática de (●) *A. niveus* e da (■) comercial foram determinadas em temperaturas com variações entre 35 e 60 °C, nas condições ótimas já pré-estabelecidas. As atividades relativas foram calculadas como uma porcentagem da atividade máxima. Os testes foram feitos em duplicata, realizado média e desvio padrão.

4.4 Efeito do pH na atividade enzimática de fitase, protease e xilanase de *A. niveus* e comparação com enzimas comerciais

O efeito do pH na atividade enzimática fitase de *A. niveus* foi comparada com uma fitase comercial conforme descrito na metodologia. O pH ótimo para atividade da fitase de *A. niveus* foi entre 4 e 5 (100%), com queda entre o pH 6 e 6,5 para 82,5%. A fitase comercial obteve pico de atividade no pH 5,5 e queda brusca de atividade a partir do pH 6 (Figura 10), coincidindo com as informações dadas pelo fabricante, mostrando funcionamento entre os pH 4 a 5,5 e em valores acima do pH ótimo, foi observado decréscimo da atividade.

Foram reportados resultados semelhantes em *A. niger* (Neira-Vielma et al., 2018), *A. flavus* ITCC (Gaiind & Singh, 2015) e *A. fumigatus* (Sanni et al., 2018) com pH 5,3, 5,5 e 5, respectivamente. Onibokun et al. (2022), mostrou que a fitase de *Aspergillus flavus* MT899184 tem pH ótimo a 6. Por outro lado, Ornela & Guimarães (2019) a fitase de *Rhizopus microsporus* var. *microsporus* se mostrou alcalina obtendo pH ótimo a 9,5. Os grupos fosfatos presentes no ácido fítico são protonados em pH baixo, permitindo sua hidrólise por fitases (Maenz, 2001). Logo, uma maior atividade *in vitro* em pH inferior a 5, pode indicar maior atividade da fitase no trato digestivo dos animais (Naves et al., 2012).

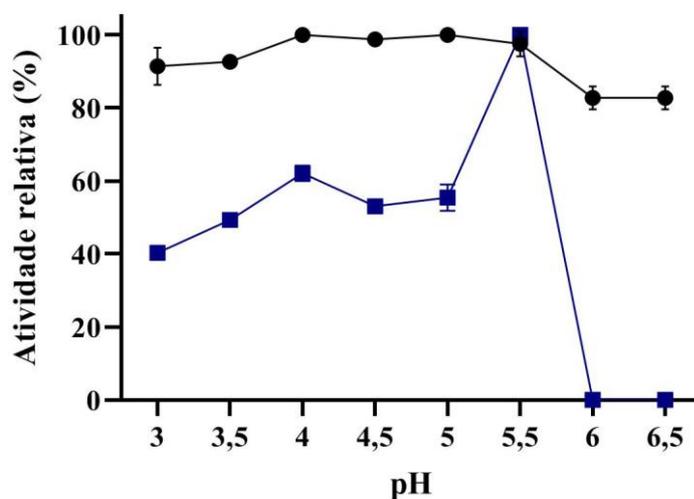


Figura 10. Efeito do pH na atividade da fitase de *A. niveus* e da fitase comercial. A atividade enzimática da fitase de (●) *A. niveus* e (■) fitase comercial foi determinada com variações de pH em 3 – 3,5 com tampão ácido cítrico, 4 – 5,5 com tampão acetato de sódio e 6 – 6,5 com tampão citrato de sódio, nas condições ótimas já pré-estabelecidas. As atividades relativas foram calculadas como uma porcentagem da atividade máxima. Os testes foram feitos em duplicata, realizado média e desvio padrão.

Para o efeito de pH na atividade de protease foram comparadas as enzimas de *A. niveus* e uma protease comercial. A protease de *A. niveus* mostrou 100% de atividade em pH 4,5, obtendo uma pequena queda de 4,37% no pH 6. A protease comercial mostrou maior atividade em pH 4,5, com pequena queda de 8,58 % no pH 6 (Figura 11). A maior atividade *in vitro* em pH ácidos, pode indicar maior atividade enzimática no trato digestivo dos animais.

Em estudos preliminares já foram relatados diferentes pH ótimos para proteases expressas por fungos do gênero *Aspergillus*. O pH ótimo para *A. ochraceus* BT21 foi 8 (Mohamed et al., 2021), indicando atividade ótima obtida de protease alcalina, parecido com o resultado encontrado no presente estudo, mostrando 82,3 % de atividade na protease de *A. niveus* em pH 8. Além disso, foi reportado que *A. oryzae* KSK-3 mostrou atividade ótima em pH 6 (Shirasaka et al., 2012). A atividade de proteases neutras também foi registrada em Ao et al. (2018), usando *A. oryzae* Y1 com pico de atividade em pH 7.

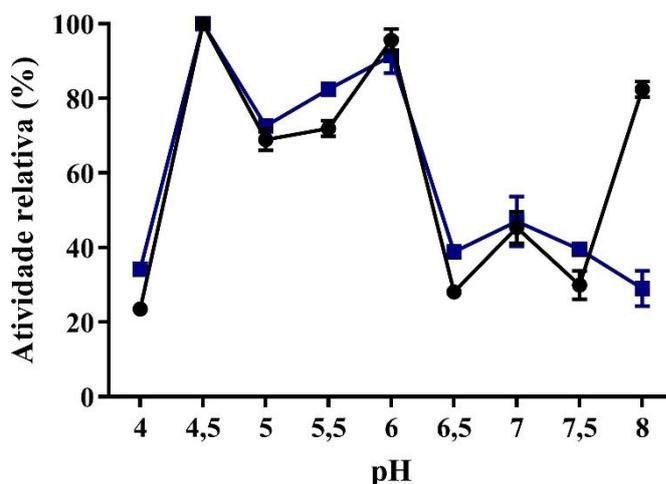


Figura 11. Efeito do pH na atividade da protease de *A. niveus* e da protease comercial. A atividade enzimática da protease de (●) *A. niveus* e da (■) enzima comercial foi determinada com variações de pH entre 4 e 8, nas condições ótimas já pré-estabelecidas. As atividades relativas foram calculadas como uma percentagem da atividade máxima. Os testes foram feitos em duplicata, realizado média e desvio padrão.

A xilanase de *A. niveus* mostrou atividade ótima em pH 5 (100%), com pequena queda de 5,89 % em pH 6. A enzima comercial mostrou pico de atividade em pH 4, coincidindo com as informações fornecidas pelo fabricante e manteve 86,53 % de atividade em pH 5 (Figura 12). Com a alcalinidade do valor de pH as enzimas mostraram decréscimo gradativo na atividade. O pH ótimo encontrado no presente estudo é similar ao que foi descrito para a xilanase de *A. niger* DFR-5 que obteve pico de atividade em pH 5, mostrando 50 % de atividade entre os pH 2 e 8 (Pal & Khanun, 2011).

Além disso, a xilanase produzida por *A. casielus* apresentou pico da atividade enzimática no pH 6,5 e mantendo sua atividade em pH 4,5 (Kronbauer et al., 2007). Em estudos realizados por Qiu et al. (2016), foi verificado o pH ótimo da xilanase mutante XynC-C em pH 3,8 similares ao encontrado em *A. niger* com pH 3, ambos mostrando atividade de 40 % entre os pH 2 e 6. Em estudos com outros gêneros, já foram reportados que *Trichoderma koningii* e *Trichoderma pseudokoningii* mostraram atividade ótima em pH 4,5 (Sanguine et al., 2022). Em *S. commune* ARC-11 foi observado atividade máxima no pH, mostrando 50 % de atividade entre pH de 4 a 7 (Gautam et al., 2018).

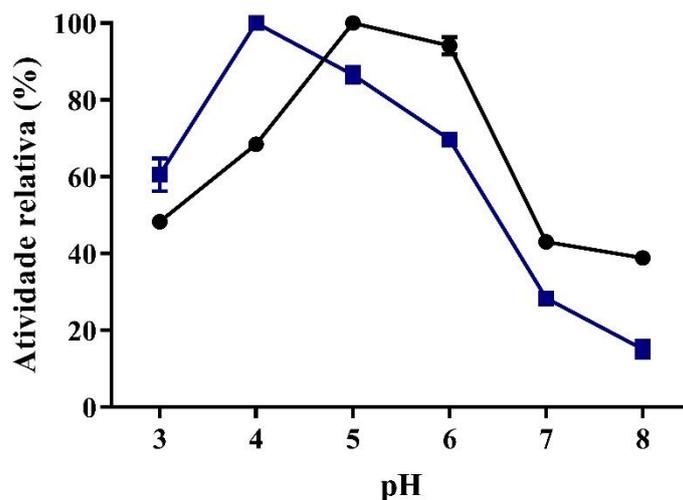


Figura 12. Efeito do pH na atividade da xilanase de *A. niveus* e da xilanase comercial. A atividade enzimática de (—●—) *A. niveus* e da (—■—) comercial foram determinadas com variações de pH entre 3 e 8 em tampão citrato-fosfato, nas condições ótimas já pré-estabelecidas. As atividades relativas foram calculadas como uma porcentagem da atividade máxima. Os testes foram feitos em duplicata, realizado média e desvio padrão.

4.5 Aplicação *in vitro* das enzimas produzidas por *A. niveus* e das enzimas comerciais nos alimentos para animais

Considerando que o *A. niveus* foi o melhor produtor das enzimas de interesse, utilizou-se este fungo para aplicação nos alimentos crus usados nas rações para animais. Todas as enzimas utilizadas nos testes foram padronizadas, possibilitando a comparação de hidrólise dos alimentos crus pela ação enzimática. A fitase de *A. niveus* e a fitase comercial foram padronizadas em 0,83-0,86 $\mu\text{moles/mL}$, aproximadamente. A protease de *A. niveus* e a protease comercial foram padronizadas em 2,12-2,27 $\mu\text{moles/mL}$, aproximadamente. A xilanase de *A. niveus* e a xilanase comercial foram padronizadas em 3,59 - 4,19 $\mu\text{moles/mL}$, respectivamente, antes de serem aplicados nos alimentos.

A fitase de *A. niveus* apresentou atividade nos alimentos de FT ($2,21 \pm 0,15$ $\mu\text{moles/mL}$), seguido por FA ($2,12 \pm 0,37$ $\mu\text{moles/mL}$) e DAF ($1,66 \pm 0,15$ $\mu\text{moles/mL}$). Já a fitase comercial mostrou melhor atividade em FA, FT e FS, com $1,86 \pm 0,04$ $\mu\text{moles/mL}$, $1,78 \pm 0,1$ $\mu\text{moles/mL}$ e $1,41 \pm 0,24$ $\mu\text{moles/mL}$, respectivamente, sendo inferior ao obtida com *A. niveus* nesse estudo. Em comparação com a fitase comercial, a enzima produzida por *A. niveus* obteve atividades 4 vezes maiores em CS e DDGS-E (Tabela 6).

Monteiro et al. (2012), mostraram que a fitase de *Rhizopus stolonifer* foi efetiva na hidrólise de fitato em ração de porco comercial, após 5 horas de tratamento das amostras, sendo liberados 5,14 μmol de PO_4^{3-} mL^{-1} . Similar a este estudo, Vats et al. (2009) utilizaram uma 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 h de incubação a 55 °C.

Tabela 6. Avaliação da atividade de fitase de *A. niveus* e fitase comercial aplicadas em alimentos para animais

Alimentos	Fitase de <i>A. niveus</i>	Fitase comercial
MI	1,15±0,12 ^{de}	0,52±0,03 ^{cd}
SMV	1,3±0,07 ^{cd}	0,76±0,03 ^c
ML	1,38±0,06 ^{cd}	0,43±0,01 ^{de}
FS	1,44±0,11 ^{cd}	1,41±0,24 ^b
FT	2,21±0,15 ^a	1,78±0,1 ^a
FA	2,12±0,37 ^{ab}	1,86±0,04 ^a
CS	0,81±0,07 ^e	0,19±0,05 ^e
DDGS-E	1,14±0,07 ^{de}	0,25±0,02 ^{de}
DDGS-S	1,52±0,21 ^{cd}	0,51±0,03 ^{cd}
MIFS	1,23±0,07 ^{cd}	0,38±0,05 ^{de}
DAF	1,66±0,15 ^{bc}	1,21±0,17 ^b

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. Alimentos: 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, realizado média e desvio padrão. Análise estatística foi realizada através do Teste Tukey ($P < 0,05$).

A enzima protease de *A. niveus* mostrou maiores atividades em 30 minutos de incubação, comparado a enzima comercial. A protease do fungo filamentosos obteve melhores atividades nos alimentos de FA ($8,34 \pm 0,76$ $\mu\text{moles/mL}$), DDGS-S ($5,62 \pm 1$ $\mu\text{moles/mL}$) e DAF ($5,36 \pm 1,26$ $\mu\text{moles/mL}$) de proteína liberada. A protease comercial mostrou melhor resultado nos alimentos de DAF com $5,57 \pm 0,14$ $\mu\text{moles/mL}$, seguido pela de DDGS-E com $5,55 \pm 0,27$ $\mu\text{moles/mL}$ e MIFS $4,85 \pm 0,7$ $\mu\text{moles/mL}$ de proteína liberada. A protease de *A. niveus* mostrou resultados 4 vezes maiores em FA, e 2,2 vezes maior em CS do que a comercial (Tabela 7).

Khon & Allen (1995) mostraram degradação de proteínas do farelo de soja 15 mg/ml e do feno de alfafa obteve 6 mg/ml de proteína liberada, respectivamente em 2 horas de

incubação. Novelli et al. (2017), mostraram a atividade da protease de *A. niveus* em reações compostas por soja e glúten de milho de $97,36 \text{ mol/L}^{-1}$ e $91,96 \text{ mol/L}^{-1}$.

Tabela 7. Avaliação da atividade de protease de *A. niveus* e protease comercial aplicadas em alimentos para animais

Alimentos	Protease de <i>A. niveus</i>	Protease comercial
MI	$4,25 \pm 1,01^b$	$4,67 \pm 0,13^{abc}$
SMV	$4,1 \pm 0,1^b$	$3,38 \pm 0,59^{def}$
ML	$4,47 \pm 0,18^b$	$4,59 \pm 0,13^{bc}$
FS	$4,44 \pm 0,39^b$	$3,55 \pm 0,11^{de}$
FT	$4,2 \pm 0,57^b$	$2,67 \pm 0,17^{efg}$
FA	$8,34 \pm 0,76^a$	$2,47 \pm 0,25^{fg}$
CS	$4,67 \pm 0,89^b$	$2,13 \pm 0,08^g$
DDGS-E	$4,31 \pm 0,57^b$	$5,55 \pm 0,27^a$
DDGS-S	$5,62 \pm 1^b$	$3,74 \pm 0,25^{cd}$
MIFS	$4,31 \pm 0,45^b$	$4,85 \pm 0,7^{ab}$
DAF	$5,36 \pm 1,26^b$	$5,57 \pm 0,14^a$

Os ensaios foram realizados em pH 5 a 50°C , por 30 minutos. A atividade enzimática foi definida em $\mu\text{moles/mL}$ de proteína liberada. Alimentos: 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, realizado média e desvio padrão. Análise estatística foi realizada através do Teste Tukey ($P < 0,05$).

Os ensaios com as xilanases de *A. niveus* e a comercial foram realizados em três tempos de incubação (4, 8 e 24 horas). No período de 4 horas de reação, a xilanase de *A. niveus* mostrou atividades em quase todas os alimentos testados, sendo os maiores resultados obtidos em FA ($21,72 \pm 4,02 \mu\text{moles/mL}$), seguido por MIFS ($19,91 \pm 2,23 \mu\text{moles/mL}$) e DDGS-S ($16,82 \pm 3,68 \mu\text{moles/mL}$). Por outro lado, em 4 horas de reação a xilanase comercial mostrou atividade apenas em DAF ($17,09 \pm 2,44 \mu\text{moles/mL}$). A incubação por 8 horas da xilanase de *A. niveus* nos alimentos, mostrou aumento significativo dos resultados em MI ($38,63 \pm 5,22 \mu\text{moles/mL}$), seguido pela MIFS ($36,65 \pm 9,06 \mu\text{moles/mL}$) e SMV ($34,68 \pm 3,57 \mu\text{moles/mL}$). Já a enzima comercial mostrou atividade nos alimentos DAF ($9,81 \pm 1,75 \mu\text{moles/mL}$), FT ($6,92 \pm 0,64 \mu\text{moles/mL}$) e SM ($6,38 \pm 1 \mu\text{moles/mL}$), baixas em comparação com a atividade da xilanase de *A. niveus*. Com 24 horas de incubação a xilanase de *A. niveus* mostrou altos níveis de atividade enzimática, destacando-se nos alimentos de MI ($96,55 \pm 6,79 \mu\text{moles/mL}$), MIFS ($95,47 \pm 3,66 \mu\text{moles/mL}$) e DAF ($78,18 \pm 10 \mu\text{moles/mL}$). A xilanase comercial se destacou

na degradação de FT sendo a xilanase com $31,05 \pm 3,85$ $\mu\text{moles/mL}$ de açúcar liberado. A xilanase de *A. niveus* se mostrou superior a comercial nos três tempos testados, obtendo em 24 horas suas maiores atividades, com atividades até 5,6 vezes maior do que a xilanase comercial em MI, 4,6 vezes maior em SMV e 5 vezes maior em DAF (Tabelas 8 e 9).

Dayiha et al. (2020), 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 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* indicou a liberação de 115 mg/g de açúcares redutores em milho incubado por 12 horas. A xilanase de *Trichoderma piluliferum* aumentou a digestibilidade *in vitro* do feno Tifton 185, silagem de cana-de-açúcar e silagem de milho em aproximadamente 7 %, 12 % e 9 %, respectivamente, em comparação com a digestibilidade dos controles do estudo Costa et al. (2018). As enzimas produzidas neste estudo mostraram ser uma alternativa eficiente em relação as enzimas comerciais. No caso das enzimas xilanases, a enzima de *A. niveus* obteve cerca de 5,7 vezes mais atividade no alimento de milho (MI) se comparado a enzima comercial. Estes resultados são importantes uma vez que é visado a inclusão das enzimas obtidas em processos nas indústrias de ração animal.

Tabela 8. Avaliação da atividade de xilanase de *A. niveus* aplicada em alimentos para animais

Alimentos	Xilanase de <i>A. niveus</i>		
	4 horas	8 horas	24 horas
MI	9,16 \pm 2,3 ^{bc}	38,63 \pm 5,22 ^a	96,55 \pm 6,79 ^a
SMV	12,53 \pm 2,12 ^{abc}	34,68 \pm 3,57 ^a	58,54 \pm 4,67 ^c
ML	12,99 \pm 1,96 ^{abc}	27,57 \pm 1,84 ^{ab}	55,56 \pm 2,74 ^{cd}
FS	-	-	8,52 \pm 1,23 ^f
FT	15,31 \pm 5,24 ^{abc}	23,7 \pm 1,84 ^{abc}	39,75 \pm 6,07 ^{de}
FA	21,72 \pm 4,02 ^a	29,11 \pm 5,89 ^{ab}	65,81 \pm 3,38 ^{bc}
CS	-	11,71 \pm 0,16 ^c	12,83 \pm 1,99 ^f
DDGS-E	6,67 \pm 0,41 ^c	10,13 \pm 1,64 ^c	38,45 \pm 0,24 ^e
DDGS-S	16,82 \pm 3,68 ^{ab}	16,66 \pm 1,23 ^{bc}	17,4 \pm 8,2 ^f
MIFS	19,91 \pm 2,23 ^a	36,65 \pm 9,06 ^a	95,47 \pm 3,66 ^a
DAF	12,47 \pm 2,05 ^{abc}	27 \pm 6,75 ^{ab}	78,18 \pm 10 ^b

Os ensaios foram realizados em pH 5 a 50 °C, por 4, 8 e 24 horas. A atividade enzimática foi definida em $\mu\text{moles/mL}$ de açúcar liberado. Alimentos: 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, realizado média e desvio padrão. Análise estatística foi realizada através do Teste Tukey ($P < 0,05$).

Tabela 9. Avaliação da atividade da xilanase comercial aplicada em alimentos para animais

Alimentos	Xilanase comercial		
	4 horas	8 horas	24 horas
MI	-	-	16,18±6,47 ^{ab}
SMV	-	6,38±1 ^b	12,76±4,92 ^b
ML	-	-	-
FS	-	-	-
FT	-	6,92±0,64 ^{ab}	31,05±3,85 ^a
FA	-	-	-
CS	-	-	-
DDGS-E	-	-	-
DDGS-S	-	-	-
MIFS	-	-	-
DAF	17,09±2,44	9,81±1,75 ^a	15,66±5,74 ^{ab}

Os ensaios foram realizados em pH 5 a 50 °C, por 4, 8 e 24 horas. A atividade enzimática foi definida em $\mu\text{moles/mL}$ de açúcar liberado. Alimentos: 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, realizado média e desvio padrão. Análise estatística foi realizado através do Teste Tukey ($P < 0,05$).

5 CONCLUSÃO

O fungo *A. niveus* incubado em palha de arroz mostrou ser o melhor produtor das enzimas de interesse nas condições estudadas. O pico de produção da fitase e xilanase de *A. niveus* foi de 144 horas, enquanto a protease obteve pico após 96 horas de incubação. A enzima fitase de *A. niveus* obteve pico de temperatura de 45 °C e apresentaram ápice de atividade entre pH 4,5 – 5. Já a protease produzida pelo fungo filamentososo mostrou temperatura ótima de 50 °C e pH ótimo de 4,5. A xilanase de *A. niveus* mostrou temperatura ótima de 45 °C e pH ótimo de 5.

Comparando-se os resultados obtidos com a aplicação da fitase, protease e xilanase comerciais com as enzimas presentes no extrato bruto enzimático de *A. niveus*, é visto que as enzimas produzidas no presente estudo possuem capacidade de hidrólise dos alimentos maior do que as enzimas comerciais, sendo superiores na degradação dos alimentos. Assim, estes resultados são importantes uma vez que se pretende incluir as enzimas obtidas em processos nas indústrias de ração animal *in vivo*.

6 REFERÊNCIAS

- ABDEL-SATER, MA.; EL-SAID, AHM. Xylan-decomposing fungi and xylanolytic activity in agricultural and industrial wastes. *Int. Biodeter. Biodegr.*, v. 47, p. 15–21, 2001.
- ABRUNHOSA, L.; SANTOS, L.; VENÂNCIO, A. Degradation of ochratoxin A by proteases and by a crude enzyme of *Aspergillus niger*. *Food Biotechnology.* v. 20, n. 3, p. 231-242, 2006.
- ADEBOWALE, TO.; YAO, K.; OSO, AO. Major cereal carbohydrates in relation to intestinal health of monogastrics animals: A review. *Animal Nutrition Journal.* 2019.
- ADSUL, MG.; HULE, JE.; SHAIKH, H.; SINGH, R.; BASTAWDE, KB.; GOKHALE, DV. Enzymatic hydrolysis of delignified bagasse polysaccharides. *Carbohydr. Polym.* v. 62, 6–10, 2005.
- AFIFY, AEMMR.; EL-BELTAGI, HS.; EL-SALAM, SMA.; OMRAN, AA. Bioavailability of Iron, Zinc, Phytate and phytase activity during soaking and germination of white sorghum varieties. *PLOS ONE*, v. 6, n. 10, e25512, 2011.
- AFROZ, QM.; KHAN, KA.; AHMED, P.; UPRIT, S. Enzymes used in dairy industries. *Int. J. Appl. Res.* v. 1, n. 10, p. 523–527, 2015.
- AHMED, S.; RIAZ, S.; JAMIL, A. Molecular cloning of fungal xylanases: an overview. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* v. 84, p. 1935, 2009.
- AIKAT, K.; BHATTACHARYYA, BC. Protease production in solid state fermentation with liquid medium recycling in a stacked plate reactor and in a packed bed reactor by a local strain of *Rhizopus oryzae*. *Process Biochem.* v. 36, p. 1059-1068, 2001.
- AO, X.; YU, X.; WU, D.; LI, C.; ZHANG, T.; LIU, S.; CHEN, S.; HE, L.; ZHOU, K.; ZOU, L. Purification and characterization of neutral protease from *Aspergillus oryzae* Y1 isolated from naturally fermented broad beans. *AMB Express.* v. 8, n. 1, p. 96–, 2018.
- ARASTEHFAR, A.; CARVALHO, A.; HOUBRAKEN, J.; LOMBARDI, L.; GARCIA-RUBIO, R.; JENKS, JD.; RIVERO-MENENDEZ, O.; ALIJOHANI, R.; JACOBSEN, ID.; BERNAM, J.; OSHEROV, N.; HEDAYATI, MT.; ILKIT, M.; ARMSTRONG-JAMES, D.; GABALDÓN, T.; MELETIADIS, J.; KOSTRZEWA, M.; PAN, W.; LASS-FLÖRL, C.; PERLIN, DS.; HOENIG, M. *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis: From basics to clinics. *Studies In Mycology.* v. 100, 2021.
- ARUNACHALAM, C.; SARITHA, K. Protease Enzyme: an eco-friendly Alternative for Leather Industry. *Indian Journal of Science and Technology.* v. 2, n. 12, 2009.

- 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.; HEDEMANN, MS.; LAERKE, HN. The role of carbohydrates in intestinal health of pigs. *Anim Fedd Sci Technol*. v. 173, n. 1, p. 41-53, 2012.
- BAKRI, Y.; MASSON, M.; THONART, P. Isolation and identification of two new fungal strains for xylanase production. *Appl. Biochem. Biotechnol*. v. 162, p. 1626–1634, 2010.
- BASU, BR.; BANIK, AK.; DAS, M. Production and characterization of extracellular protease of mutant *Aspergillus niger* AB100 grown on fish scale. *World J. Microbiol. Biotechnol*. v. 24, p. 449-455, 2008.
- BEDFORD, MR.; PARTRIDGE, GG. *Enzymes in farm animal nutrition*. 2nd edition. London, UK. p. 319, 2010.
- BEZERRA, VHS.; CARDOSO, SL.; FONSECA-BAZZO, Y.; SILVEIRA, D.; MAGALHÃES, PO.; SOUZA, PM. Protease Produced by Endophytic Fungi: A Systematic Review. *Molecules*. v. 26, n. 22, p. 7062, 2021.
- BHAVSAR, K.; BUDDHIWANT, P.; SONI, SK.; SARKAR, S.; KHIRE, JM. Phytase isozymes from *Aspergillus niger* NCIM 563 under solid state fermentation: Biochemical characterization and their correlation with submerged phytases. *Process Biochem*. v. 48, n. 11, p. 1618-1625, 2013.
- BIELY, P. Diversity of microbial endo-b-1,4-xylanases In: *Applications of Enzymes to Lignocellulosics* (Mansfield, S.D. & Saddler, J.N., Eds.). American Chemical Society, Washington. p. 361–380, 2003.
- BIELY, P. Microbial xylanolytic systems. *Trends Biotechnol*. v. 3, p. 286, 1985.
- BIELY, P.; SINGH, S.; PUCHART, V. Towards enzymatic breakdown of complex plant xylan structures: state of the art. *Biotechnol. Adv*. v. 34, n. 7, p. 1260-1274, 2016.
- BOER, CG.; PERALTA, RM. Production of extracellular protease by *Aspergillus tamarii*. *J. Basic Microbiol*. v. 40, p. 75-81, 2000.
- 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.
- BURLACU, A.; CORNEA, CP.; ISRAEL-ROMING, F. Microbial Xylanase: a review. *Scientific Bulletin Series F Biotechnologies*. 2016.
- 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.
- CASEY, A.; WALSH, G. Identification and characterization of a phytase of potential commercial interest. *J. Biotechnol.* v. 110, p. 313–322, 2004.
- 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.
- CHADHA, BS.; KAUR, B.; BASOTRA, N.; TSANG, A.; PANDEY, A. Thermostable xylanases from thermophilic fungi and bacteria: current perspective. *Bioresource Technology*. 2019.
- CHANTASARTRASAMEE, K.; AYUTHAYA, DI.; INTARAREUGSORN, S.; DHARMSTHITI, S. Phytase activity from *Aspergillus oryzae* AK9 cultivated on solid state soybean meal medium. *Process Biochem.* v. 40, p. 2285–2289, 2005.
- CHEN, KI.; CHIANG, CY.; KO, CY.; HUANG, HY.; CHENG, KC. Reduction of phytic acid in soymilk by immobilized phytase system. *Journal of Food Science*. v. 83, n. 12, p. 2963-2969, 2018.
- CHIMBEKUJWO, KI.; JA'AFARU, MI.; ADEYEMO, OM. Purification, characterization and optimization conditions of protease produced by *Aspergillus brasiliensis* strain BCW2. *Scientific African*. 2020.
- CHOCT, M. Feed non-starch polysaccharides for monogastric animals: classification and function. *Animal Production Science*. v. 55, n. 12, p. 1360-1366, 2015.

- COLLINS, T.; GERDAY, C.; FELLER, G. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 29, n. 1, p. 3-23, 2005.
- CONTE, AJ.; TEIXEIRA, AS.; BERTECHINI, AG.; FIALHO, ET.; MUNIZ, JA. Efeito da fitase e xilanase sobre a energia metabolizável do farelo de arroz integral em frangos de corte. *Revista Ciência e Agrotecnologia*, v. 26, n. 6, p. 1289-1296, 2002.
- 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.
- 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.
- 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, 2014.
- CORREA, TLR.; DE QUEIROZ, MV.; DE ARAUJO, EF. Cloning, recombinant expression and characterization of a new phytase from *Penicillium chrysogenum*. *Microbiol. Res.* v. 170, p. 205–212, 2015.
- COSTA, AC.; CAVALHEIRO, GF.; VIEIRA, ERQ.; GANDRA, JR.; GOES, RHTB.; PAZ, MF.; FONSECA, GG.; LEITE, RSR. Catalytic properties of xylanases produced by *Trichoderma piluliferum* and *Trichoderma viride* and their application as additives in bovine feeding, *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 2019.
- COSTA, FGP.; BRANDÃO, PA.; BRANDÃO, JS.; SILVA, JHV. Efeito da enzima fitase nas rações de frangos de corte, durante as fases pré-inicial e inicial. *Ciênc. agrotec. Lavras*. v. 31, n. 3, p. 865-870, 2007.
- COUSI, S.; DAMASO, MCT. 2021. Enzimáticos. Embrapa. Disponível em: <https://www.embrapa.br/agencia-de-informacao-tecnologica/tematicas/tecnologia-de-alimentos/processos/tipos-de-processos/enzimaticos>. Acesso em 20 de julho de 2022.
- COWIESON, AJ., ADEOLA, O. Carbohydrase, protease and phytase have an additive beneficial effect in nutritionally marginal diets for broiler chicks. *Poultry Science*. v. 84, p. 1860-1867, 2005.
- 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.

- CRUZ-DAVILA, J.; PEREZ, JV.; CASTILLO, DS.; DIEZ, N. *Fusarium graminearum* as a producer of xylanases with low cellulases when grown on wheat bran. *Biotechnology Reports*. v. 35, 2022.
- CURRIE, JN. The citric acid fermentation of *Aspergillus niger*. *J Biol Chem*. v. 31, p. 15–37, 1917.
- 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.
- DAILIN, DJ.; HANAPI, SZ.; ELSAVED, E.; SUKMAWATI, D.; WAN AZELEE, NI, EVAHMALAY, J.; SIWAPIRAGAM, V.; EL ENSHASY, H. “Fungal phytases: biotechnological applications in food and feed industries,” cap 2, 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.
- DAMIANO, VB.; BOCCHINI, DA.; GOMES, E.; DA SILVA, R. Application of crude xylanase from *Bacillus licheniformis* 77-2 to the bleaching of eucalyptus Kraft pulp. *World J. Microbiol. Biotechnol*. v. 19, 139144, 2003.
- DAYIHA, S.; KUMAR, A.; SINGH, B. Enhanced endoxylanase production by *Myceliophthora thermophila* using rice straw and its synergism with phytase in improving nutrition. *Process Biochemistry*. v. 94, p. 235-242, 2020.
- DE CASTRO, RJS.; OHARA, A.; NISHIDE, TG.; BAGAGLI, MP.; DIAS, FFG.; SATO, HH. A versatile system based on substrate formulation using agroindustrial wastes for protease production by *Aspergillus niger* under solid state fermentation. 2015.
- DE CASTRO, RJS.; SATO, HH. Production and biochemical characterization of protease from *Aspergillus oryzae*: An evaluation. *Biocatal. Agric. Biotechnol*. 2013.
- DE SOUZA, R.; AMBROSINI, A.; PASSAGLIA, LMP. Plant growth-promoting bacteria as inoculants in agricultural soils. *Genet Mol Biol*. v. 38, p. 401–419, 2016.
- DENIAUD, E.; QUEMENER, B.; FLEURENCE, J.; LAHAYE, M. Structural studies of the mix-linked β -(1→3)/ β -(1→4)-D-xylans from the cell wall of *Palmaria palmata* (Rhodophyta) *Int. J. Biol. Macromol*. v. 33, p. 9-18, 2003.
- DERSJANT-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, 2014.

DETTMER, A.; CAVALLI, É.; MARCO, AZA.; GUTTERRES, M. Environmentally friendly hide unhairing: enzymatic hide processing for the replacement of sodium sulfide and delimid. *Journal of Cleaner Production*. v. 47, p. 11-18, 2013.

DIPTA, B.; BHARDWAJ, S.; KAUSHAL, M.; KIRTI, S.; SHARMA, R. Obliteration of phosphorus deficiency in plants by microbial interceded approach. *Symbiosis*. 2019.

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.

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.

EBRINGEROVÁ, A.; HEINZE, T. Xylan and xylan derivatives—biopolymers with valuable properties, 1. Naturally occurring xylans structures, isolation procedures and properties. *Macromol. Rapid Commun*, v. 21, p. 542-556, 2000.

EL-KHONEZY, MI.; ELGAMMAL, EW.; EMAN, EFA.; ABD-ELAZIZ, AM. Detergent stable thiol-dependant alkaline protease produced from the endophytic fungus *Aspergillus ochraceus* BT21: Purification and kinetics. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. v. 35, 2021.

Enzymes Market Outlook To 2024: Key Product Categories (Carbohydrases, Lipases, Polymerases & Nucleases, Proteases), Application (Paper & Pulp, Textiles, Food & Beverages, Personal Care, Animal Feed, Nutraceutical, Biocatalyst), Regional Segmentation, Competitive Dynamics, Pricing Analysis (OPP, IPP, RAP) And Segment Forecast. Ameri Research Inc. 18 de março de 2017. Disponível em: <https://www.ameriresearch.com/product/global-enzymes-market-size/> . Acesso em 02 de agosto de 2022.

FEIZOLLAHI, E.; MIRMAHDI, RS.; ZOGHI, A.; ZIILSTRA, RT.; ROOPESH, MS.; VASANTHAN, T. 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*. ISSN 1983-0823. v. 37, n. 4, p. 529-535, 2019. Available at: <<http://www.biometria.ufla.br/index.php/BBJ/article/view/450>>.

FREEMAN, KR.; MARTIN, AP.; KARKI, D.; LYNCH, RC.; MITTER, MS.; MEYER, AF.; LONGCORE, JE.; SIMMON, DR.; SCHMIDT, SK. Evidence that chytrids dominate fungal

communities in high-elevation soils. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. v. 106, p. 18315–18320, 2009.

FRISVAD, J.C.; HUBKA, V.; EZEKIEL, C.N.; HONG, S.B.; NOVÁKOVÁ, A.; CHEN, A.J.; ARZANLOU, N.; LARSEN, T.O.; SKLENÁR, F.; MAHAKARNCHANAKUL, W.; SAMSON, R.A.; HOUBRAKEN, J. Taxonomy of *Aspergillus* section Flavi and their production of aflatoxins, ochratoxins and other mycotoxins. *Studies in Mycology*. v. 93, p 1–63, 2019.

FRISVAD, J.C.; MØLLER, L.L.H.; LARSEN, T.O.; 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.; SINGH, S. Production, purification and characterization of neutral phytase from thermotolerant *Aspergillus flavus* ITCC 6720. *International Biodeterioration & Biodegradation*. v. 99, p. 15-22, 2015.

GAUTAM, A.; KUMAR, A.; BHARTI, A.K.; DUTT, B. Rice straw fermentation by *Schizophyllum commune* ARC-11 to produce high level of xylanase for its application in pre-bleaching. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*. v. 16, n. 2, p. 693-701, 2018.

GERMANO, S.; PANDEY, A., OSAKU, C.; ROCHA, S. Characterization and stability of proteases from *Penicillium* sp. produced by solid-state fermentation. *Enzym. Microb. Technol.* v. 32, p. 246-251, 2003.

GESSLER, N.N.; SERDYUK, E.G.; ISAKOVA, E.P.; DERYABINA, Y.I. Phytases and the prospects for their application. *Appl Biochem Microbiol.* v. 54, p. 352–360, 2018.

GIMENES, N.C.; SILVEIRA, E.; TAMBOURGI, E.B. An overview of proteases: production, downstream processes and industrial applications. *Sep Purif Rev.* v. 50, n. 3, p. 223–243, 2019.

GÍRIO, F.M.; GÍRIO, C.; FONSECA, F.; CARVALHEIRO, L.C.; DUARTE, S.; MARQUES, R. Hemicelluloses for fuel ethanol: a review. *Bioresour. Technol.* v. 101, n. 13, p. 4775-4800, 2010.

GODFREY, T.; WEST, S. *Industrial Enzymology: The Application of Enzymes in Industry*. MacMillan, New York. 1996.

GOLOVAN, S.P.; HAYES, M.A.; PHILLIPS, J.P.; FORSBERG, C.W. Transgenic mice expressing bacterial phytase as a model for phosphorus pollution control. *Nature Biotechnology*. v. 19, p. 429–433, 2001.

GONÇALVES, VN.; CANTRELL, CL.; WEDGE, DE.; FERREIRA, MC.; SOARES, MA.; JACOB, MR.; OLIVEIRA, FS.; GALANTE, D.; RODRIGUES, F.; ALVES, TMA.; ZANI, CL.; JUNIOR, PAS.; MURTA, S.; ROMANHA, AJ.; BARBOSA, EC.; KROON, EG; OLIVEIRA, JG.; GOMEZ-SILVA, B.; GALETOVIC, A.; ROSA, CA.; ROSA, LH. Fungi associated with rocks of the Atacama Desert: taxonomy, distribution, diversity, ecology and bioprospection for bioactive compounds. *Environmental Microbiology*. v. 18, p. 232–245, 2016.

GONTIA-MISHRA, G; TIWARI, S. Molecular characterization and comparative phylogenetic analysis of phytases from fungi with their prospective applications. *Food Technol Biotechnol*. v. 51, p. 313–326, 2013.

GRACIA, MI.; ARANÍBAR, MJ.; LÁZARO, R.; MEDEL, P.; MATEOS, GG. Alpha-amylase supplementation of broiler diets based on corn. *Poultry Science*. v. 82, n. 3, 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.

GREINER, R.; KONIETZNY, U.; JANY, KLD. Purification and characterization of two phytases from *Escherichia coli*. *Arch. Biochem. Biophys*. v. 303, p. 107–113, 1993.

GREINER, R.; KONIETZNY, U. Phytase for food application. *Food Technol. Biotechnol*. v. 44, 125140, 2006.

GUADIX, A.; GUADIX, EM.; PÁEZ-DUEÑA, MP.; GONZÁLEZ-TELLO, PY.; CAMACHO, F. Technological processes and methods of control in the hydrolysis of proteins. *Ars Pharm*. v. 41, p. 79-89, 2000.

GUERRAND, D. Enzymes in Human and Animal Nutrition. *Economics of food and feed enzymes: status and perspectives*. p. 487-514, 2018.

GUPTA, R.; RAJPUT R.; SHARMA, R.; GUPTA, N. Biotechnological applications and prospective market of microbial keratinases. *Appl Microbiol Biotechnol*. v. 97, p. 9931–9940, 2013.

HAN, YW.; WILFRED, AG. Hydrolysis of phytate in soybean and cottonseed meals by *Aspergillus ficuum* phytase. *J. Agric. Food Chem*. v. 36, p. 259–262, 1988.

HAROS, M.; ROSELL, CM.; BENEDITO, C. Use of fungal phytase to improve breadmaking performance of whole wheat bread. *J. Agric. Food Chem*. v. 49, p. 5450–5454, 2001.

HARRIS, AD.; RAMALINGAM, C. Xylanases and its application in food industry: a review. *Journal of Experimental Sciences*. v. 1, n. 7, 2010.

HEINEN, PR.; PEREIRA, MG.; RECHIA, CGV.; ALMEIDA, PZ.; MONTEIRO, LMO.; PASIN, TM.; MESSIAS, JM.; CEREIA, M.; KADOWAKI, MK.; JORGE, JA.; POLIZELI, MLTM. Immobilized endo-xylanase of *Aspergillus tamarii* Kita: an interesting biological tool for production of xylooligosaccharides at high temperatures. *Process Biochemistry*. v. 53, p. 145-152, 2017.

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.

HEJDYSZ, M.; KACZMAREK, SA.; KUBIS, M.; WISNIEWSKA, Z.; PERIS, S.; BUDNIK, S.; RUTKOWSKI, A. The effect of protease and *Bacillus licheniformis* on nutritional value of pea, faba bean, yellow lupin and narrow-leaved lupin in broiler chicken diets. *Br Poultry Sci*. v. 61, p. 3, p. 287–293, 2020.

HORIMOTO, Y.; DEE D.; YADA, R. Multifunctional aspartic peptidase prosegments. *New Biotechnol*. v. 25, p. 318–324, 2009.

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.

HOSSAIN, M.; DAS, F.; MARZAN, L.; RAHMAN, M. Some properties of protease of the fungal strain *Aspergillus flavus*. *Int. J. Agric. Biol*. v. 8, p. 162-164, 2006.

HOUBRAKEN, J.; DE VRIES, RP.; SAMSON, RA. Modern taxonomy of biotechnologically important *Aspergillus* and *Penicillium* species. *Advances in Applied Microbiology*. v. 86, p. 199–249, 2014.

IKASARI, L.; MITCHELL, D. Protease Production by *Rhizopus oligosporus* in Solid State Fermentation. *World J. Microbiol. Biotechnol*. v. 10, p. 320- 324, 1994.

IRE, FS.; OKOLO, BN.; MONEKE, AN.; ODIBO, FJC. Influence of cultivation conditions on the production of a proteases from *Aspergillus carbonarius* using submerged fermentation. *African Journal of Food Science*. v. 6, n. 6, p. 353-365, 2011.

JATUWONG, K.; SUWANNARACH, N.; KUMLA, J.; PENKHRUE, W.; KAKUMYAN, P.; LUMYONG, S. Bioprocess for Production, Characteristics, and Biotechnological Applications of Fungal Phytases. *Frontiers in Microbiology*. v. 11, p. 1-18, 2020.

JAVED, MM.; AHMED, W.; ZAHOOR, S.; HAQ, IU. Solid state culturing of thermophilic fungi for phytase production. *Pak. J. Bot*. v. 42, n. 5, p. 3605-3611, 2010.

- JEGANNANTHAN, KR.; NIELSEN, PH. Environmental assessment of enzyme use in industrial production - a literature review. *Journal of Cleaner Production*, v. 42, p. 228-240, 2013.
- JISHA, VN.; SMITHA, RB.; PRADEEP, S.; SREEDEVI, S.; UNNI, KN.; SAJITH, S.; PRIJI, P.; JOSH, MS.; BENJAMIN, S. Versatility of microbial proteases. *Adv. Enzym. Res.* v. 1, n. 3, p. 39-51, 2013.
- KALIM, B.; BÖHRINGER, N.; ALI, N.; SCHÄBERLE, TF. Xylanases – from microbial origin to industrial application. *Br Biotechnol J.* v. 7, p. 1- 20, 2015.
- KANAGARAJ, J.; SENTHILVELAN, T.; PANDA, RC.; KAVITHA, S. Eco-friendly waste management strategies for greener environment towards sustainable development in leather industry: a comprehensive review. *J Clean Prod.* v. 89, p. 1–17, 2015.
- KANG, SW.; PARK, YS.; LEE, JS.; HONG, SI.; KIM, SW. Production of cellulases and hemicellulases by *Aspergillus niger* KK2 from lignocellulosic biomass. *Bioresource technology.* v. 91, n. 2, p. 153–156, 2004.
- KAUR, R.; SAXENA, A.; SANGWAN, P.; YADAV, NA.; KUMAR, V.; DHALIWAL, HS. Production and characterization of a neutral phytase of *Penicillium oxalicum* EUFR-3 isolated from Himalayan region. *Nusantara Biosci.* v. 9, p. 68–76, 2017.
- KEIJI, F.; HIDEYUKI, K.; HARUHIKO, M.; SHODO, H. Effect of cellular inositol content on ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* in sake brewing. *J. Biosci. Bioeng.* v. 98, p. 107–113, 2004.
- 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.
- KIRK, P.; CANNON, PF.; MINTER, DW.; STALPERS, JA. *Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi*, 10th edn. CAB International, Wallingford. 2008.
- KLICH, MA. Identification of Common *Aspergillus* species. Netherlands: Centraalbureau voor Schimmelauteurs. 116 p. 2002.
- KLICH, MA.; PITT, JI. Differentiation of *Aspergillus flavus* from *A. parasiticus* and other closely related species. *Trans Brit Mycol Soc.* v. 91, p. 99–108, 1988.
- 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, EL.; GOPINGER, E.; BEZERRA, NS.; COSTA, APGC.; GOMES, HA. Avaliação dos benefícios do uso de xilanase na digestibilidade de nutrientes em suínos. Embrapa. ISSN 0100-8862. 2019.

KRONBAUER, ELW.; PERALTA, RM.; OSAKU, CA.; KADOWAKI, MKM. Produção de xilanase por *Aspergillus casielus* com diferentes fontes de carbono. B. CEPPA. v. 25, p. 207-206, 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.

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.; BECKER, K. Dietary Roles of Phytate and Phytase in Human Nutrition: A Review. Food Chem. v. 120, n. 4, p. 945–959, 2010.

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

KURAKAKE, M.; FUJII, T.; YATA, M.; OKAZAKI, T.; KOMAKI, T. Characteristics of transxylosylation by beta-xylosidade from *Aspergillus awamori* K4. Biochim Biophys Acta. v. 1726, p. 272-279, 2005.

LALPANMAWIA, HL.; FLANGO VAN, AV.; SRIDHAR, M.; SHET, M.; AJITH, S.; PAL, DT. Efficacy of phytase on growth performance, nutrient utilization and bone mineralization in broiler chicken. Animal Feed Science and Technology. v. 192, p. 81-89, 2014.

LASSEN, SF.; BREINHOLT, J.; OSTERGAARD, PR.; BRUGGER, R.; BISCHOFF, A.; WYSS, M.; FUGLSANG, CC. Expression, gene cloning, and characterization of five novel phytases from four basidiomycete fungi: *Peniophora lycii*, *Agrocybe pediades*, *Ceriporia* sp., and *Trametes pubescens*. Applied and Environmental Microbiology. v. 67, n. 10, p. 4701-4707, 2001.

LEE, J. Biological conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. Journal of Botechnology. v. 56, n. 1, p. 1-24, 1997.

LEITE, RSR.; ALVES-PRADO, HF.; CABRAL, H.; PAGNOCCA, FC.; GOMES, E.; DA SILVA, R. Production and characteristics comparison of crude -glucosidases produced by

microorganisms *Thermoascus aurantiacus* and *Aureobasidium pullulans* in agricultural wastes. *Enzyme And Microbial Technology*. v. 43, p. 391-395, 2008.

LIMA, SLT.; JESUS, MB.; SOUZA, RRR.; OKAMOTO, AK.; LIMA, R.; FRACETO, LF. Estudo da atividade proteolítica de enzimas presentes em frutos. *Química nova na escola*. n. 28, p. 1-3, 2008.

LIMAYEM, A.; RICKE, SC. Lignocellulosic biomass for bioethanol production: Current perspectives, potential issues and future prospects. *Progress in Energy and Combustion Science*. v. 38, p. 449-467, 2012.

LIU, Y.; WANG, J.; BAO, C.; DONG, B.; CAO, Y. Characterization of a novel GH110 xylanase with a carbohydrate binding module from *Aspergillus sulphureus* and its synergistic hydrolysis activity with cellulase. *International Journal of Biological Macromolecules*. v. 182, p. 701-711, 2021.

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

LUCCA, P.; HURRELL, R.; POTRYKUS, I. Genetic engineering approaches to improve the bioavailability and the level of iron in rice grains. *Theor. Appl. Genet*. v. 102, p. 392-397, 2001.

MAENZ, DD. Enzymatic characteristics of phytases as they relate to their use in animal feeds. In: Bedford MR, Partridge GG. *Enzymes in Farm Animal Nutrition*. Wallingford: CABI. p. 61-84, 2001.

MANDAL, S.; BANERJEE, D. Proteases from endophytic fungi with potential industrial applications. In *Recent Advancement in White Biotechnology Through Fungi*; Springer: Cham, Switzerland. p. 319-359, 2019.

MARQUES, SFF. Biotecnologia enzimática: produção de complexo multienzimático de *Trichoderma harzianum* e sua aplicação na alimentação de frangos de corte. Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal junto à Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás - UFG. 2007.

MARTÍNEZ-MEDINA, G.; PRADO, LA.; RUIZ, H.; ILYINA, A; MARTÍNEZ-HERNÁNDEZ, J.; RODRIGUEZ-JASSO, R.; HOYOS-CONCHA, J.; AGUILAR, C. Fungal Proteases and Production of Bioactive Peptides for the Food Industry. In: *ENZYMES in Food Biotechnology*. p. 221-246, 2019.

- 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.
- MATSUZAWA, T.; ABLIZ, P.; YAGUCHI, T.; GONOI, T.; HORIE, Y. *Aspergillus takadae*, a novel heterothallic species of *Aspergillus* section Fumigati isolated from soil in China. *Mycoscience. The Mycological Society of Japan*. v. 60, n. 6, p. 354-360, 2019.
- MCLAUGHLIN, DJ.; SPATAFORA, JW. *The Mycota: A Comprehensive Treatise on Fungi as Experimental Systems for Basic and Applied Research*. 2^a ed. VII Systematics and Evolution Part B. 2015.
- MCILVAINE, TC. A Buffer Solution for Colorimetric Comparison. *Journal of Biological Chemistry*. v. 49, p. 183-186. 1921.
- MILLER, G. Modified DNS method for reducing sugars. *Analytical Chemistry*. v. 31, n. 3, p. 426-428. 1959.
- MITTAL, A.; GUPTA, V.; SINGH, G.; YADAV, A.; AGGARWAL, NK. Phytase: a boom in food industry. *Octa. J. Biosci*. v. 1, n. 2, p. 1158-1169, 2013.
- 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.
- MOHSIN, S.; MAQBOOL, A.; ASHRAF, M.; MALIK, KA. Extracellular secretion of phytase from transgenic wheat roots allows utilization of phytate for enhanced phosphorus uptake. *Mol. Biotechnol*. v. 59, p. 334–342, 2017.
- 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.
- MONEY, NP. *Fungi and Biotechnology. The Fungi (Third Edition)*, Academic Press. ISBN 9780123820341. p. 401-424, 2016.
- MONTEIRO, PS.; MELO, RR.; TAVARES, MP.; FALKOSKI, DL.; GUIMARÃES, VM.; PEREIRA, OL.; REZENDE, ST. 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.
- MOTTA, FL.; ANDRADE, CCP.; SANTANA, MHA. A Review of xylanase production by the fermentation of xylan: classification, characterization and applications. In: CHANDEL, A.

(ed.). Sustainable Degradation of Lignocellulosic Biomass - Techniques, Applications and Commercialization. 2013.

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

NAGAHAMA, T.; TAKAHASHI, E.; NAGANO, Y.; ABDEL-WAHAB, MA. MIYAZAKI, M. Molecular evidence that deep-branching fungi are major fungal components in deep-sea methane cold-seep sediments. *Environmental Microbiology.* v. 13, p. 2359–2370, 2011.

NAIDU, DS.; HLANGOTHI, SP.; JOHN, MJ. Bio-based products from xylan: A review. *Carbohydrate Polymers.* v. 179, p. 28–41, 2018.

NARANJO-ORTIZ, MA.; GABALDÓN, T. Fungal evolution: diversity, taxonomy and phylogeny of the fungi. *Biological Reviews.* v. 94, n. 6, p. 2101-2137, 2019.

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 production from sugarcane bagasse and probiotic bacterial growth, *Journal of Biotechnology.* ISSN 0168-1656. v. 347, p. 1-8, 2022.

NAVES, LP.; CORRÊA, AD.; BERTECHINI, AG.; GOMIDE, EM.; SANTOS, CD. Effect of pH and Temperature on the Activity of Phytase Products Used in Broiler Nutrition. *Brazilian Journal of Poultry.* ISSN 1516-635. v. 14, n. 3, p. 159-232, 2012.

NDOU, SP.; KIARIE, E.; AGYEKUM, AK.; HEO, JM.; ROMERO, JM.; ARENT, S.; LORENTSEN, R.; NYACHOTI, CM. Comparative efficacy of xylanases on growth performance and digestibility in growing pigs fed wheat and wheat bran – or corn and corn DDGS-based diets supplemented with phytase. v. 209, p. 230-239, 2015.

NEIRA-VIELMA, AA.; AGUILAR, CN.; ILYINA, A.; CONTRERAS-ESQUIVEL, JC.; CARNEIRO-DA-CUNHA, MG.; MICHELENA-ÁLVAREZ, G.; MARTÍNEZ-HERNÁNDEZ, 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.

NELSON, TS.; SHIEH, TR.; WODZINSKI, RJ.; WARE, JH. The availability of phytate phosphorus in soybean meal before and after treatment with a mold phytase. *Poult. Sci.* v. 47, p. 1842–1848, 1968.

- 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.
- NIYONZIMA, FN.; MORE, SS. Purification and characterization of detergent-compatible protease from *Aspergillus terreus*. *3 Biotech.* v. 5, n. 1, p. 61–70, 2015.
- NOVELLI, PK.; BARROS, MM.; FLEURI, LF. Novel inexpensive fungi proteases: Production by solid state fermentation and characterization. *Food Chemistry.* v. 198, p. 119-124, 2015.
- NOVELLI, PK.; BARROS, MM.; PEZZATO, LE.; ARAUJO, EP.; BOTELHO, RM.; FLEURI, LF. Enzymes produced by agro-industrial co-products enhance digestible values for *Nile tilapia (Oreochromis niloticus)*: A significant animal feeding alternative. *Aquaculture.* v. 481, p. 1-7, 2017.
- NURIZZO, D.; NAGY, T.; GILBERT, HJ.; DAVIES, GJ. The structural basis for catalysis and specificity of the *Pseudomonas cellulosa* alpha-glucuronidase, GlcA67A. 2002.
- O’GORMAN, CM.; FULLER, HT.; DYER, PS. Discovery of a sexual cycle in the opportunistic fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Nature.* v. 457, p. 471–474, 2009.
- OHJA, BK.; SINGH, PK.; SHRIVASTAVA, N. Enzymes in the Animal Feed Industry. In: *Enzymes in Food Biotechnology.* p. 93-109, 2019.
- OLIVEIRA, JC. Tópicos em micologia médica. 4. ed. Rio de Janeiro. 230 p. 2014.
- ONIBOKUN, EA.; ENI, AO.; ORANUSI, SU. Purification and Characterization of Phytase from a Local Poultry Isolate of *Aspergillus flavus* MT899184. In: Ayeni, AO., Sanni, SE., Oranusi, SU. (eds) *Bioenergy and Biochemical Processing Technologies. Green Energy and Technology.* Springer, Cham. 2022.
- ORLANDELLI, RC.; SPECIAN, V.; FELBER, AC.; PAMPHILLE, JA. Enzimas de interesse industrial: produção por fungos e aplicações. *SaBios: Rev Saúde e Biol.* v. 7, n. 3, p. 97-109, 2012.
- ORNELA, PHO.; GUIMARÃES, LHS. Purification and characterization of an alkalistable phytase produced by *Rhizopus microsporus var. microsporus* in submerged fermentation. v. 81, p.70-76, 2019.
- PAL, A.; KHANUN, F. Purification of xylanase from *Aspergillus niger* DFR-5: Individual and interactive effect of temperature and pH on its stability. v. 46, n. 4, p. 879–887, 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.
- PEN, J.; VENVOERD, TC.; VAN PARIDON, PA.; BEUDEKER, RF.; VANDENELZEN, PJM.; GEERSE, K.; KLIS, JVDV.; VERSTEEGH, H.; OUYEN, AV.; HOEKEMA, A. Phytase containing transgenic seeds as a novel feed additive for improved phosphorus utilization. *Biotechnology*. v. 11, p. 811–814, 1993.
- PEREIRA, GF.; BASTIANI, D.; GABARDO, S.; SQUINA, F.; AYUB, MAZ. Solid-state cultivation of recombinant *Aspergillus nidulans* to co-produce xylanase, arabinofuranosidase, and xylooligosaccharides from soybean fibre. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. v. 15, p. 78-85, 2018.
- PHILIPPS-WIEMANN, P. Enzymes in Human and Animal Nutrition. In: *Proteases—general aspects*. p. 257–266, 2018.
- 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*. ISSN 0141-8130. v. 109, p. 1270-1279, 2018.
- PIRES, EBE. Produção e caracterização parcial de fitases fúngicas utilizando resíduos agroindustriais. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 2016.
- PIRES, EBE.; FREITAS, AJ.; SOUZA, FF.; SALGADO, RL.; GUIMARÃES, VL.; PEREIRA, FA.; ELLER, MR. Production of Fungal Phytases from Agroindustrial Byproducts for Pig Diets. *Sci Rep*. v. 9, 2019.
- PIRGOZLIEV, V.; KARADAS, F.; ROSE, SP. BECCACCIA, A.; MIRZA, MW.; AMERAH, AM. Dietary xylanase increases hepatic vitamin E concentration of chickens fed wheat based diet. *J Anim Feed Sci*. v. 24, p. 80–84, 2015.
- POLIZELI, MLTM. Properties and commercial applications of xylanases from fungi. In: Rai, M.K. (Ed.), *Mycotechnology: Current Trends and Future Prospects*. New Delhi: I.K. International Publisher. p. 82–101, 2009.
- POLIZELI, MLTM., PERALTA, RM.; BRACHT, A.; MICHELINI, M.; SOMERA, AF. Enzymes prospection from fungi and biomass pretreatment for biorefinery application. In: Silva, R.N. (Ed.), *Mycology: Current and Future Developments: Fungal Biotechnology for Biofuel Production*. Emirate of Sharjah: Bentham Science Publishers. p. 57–81, 2016.

- POLIZELI, MLTM.; RIZZATTI, ACS.; MONTI, R.; TERENCE, HF.; JORGE, JA.; AMORIM, DS. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* v. 67, 577591, 2005.
- PUCHART, V.; ŠUCHOVÁ, K.; BIELY, P. Xylanases of glycoside hydrolase family 30 – An overview. *Biotechnology Advances*. 2021.
- PUHL, AA.; GREINER, R.; SELINGER, LB. A protein tyrosine phosphatase-like inositol polyphosphatase from *Selenomonas ruminantium* subsp. *lactilytica* has specificity for the 5-phosphate of myo-inositol hexakisphosphate. *Int J Biochem Cell Biol.* v. 40, p. 2053–2064, 2008.
- PUPPALA, KR.; BUDDHIWANT, PG.; AGAWANE, SB.; KADAM, AS.; MOTE, CS.; LONKAR, VD.; KHIRE, JM.; DHARNE, MS. Performance of *Aspergillus niger* (NCIM 563) phytase based feed supplement for broiler growth and phosphorus excretion. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology.* v. 31, 101887, 2021.
- QIU, J.; HAN, H.; SUN, B.; CHEN, L.; YU, C.; PENG, R.; YAO, Q. Residue mutations of xylanase in *Aspergillus kawachii* alter its optimum pH. *Microbiological Research.* v. 182, p. 1-7, 2016.
- RADHA, S.; NITHYA, VJ.; BABU, RH.; SRIDEVI, A.; PRASAD, NBL.; NARASIMHA, G. Production and optimization of acid protease by *Aspergillus* spp under submerged fermentation. *Archives of Applied Science Research.* v. 3, n. 2, p. 155-163, 2011.
- RAJOKA, MI.; TAYYABA HUMA, AM.; KHALID; FL. Kinetics of Enhanced Substrate Consumption and Endo- β -xylanase Production by a Mutant Derivative of *Humicola lanuginosain* Solid-state Fermentation. v. 21, n. 6-7, p. 869–876, 2005.
- RANA, NK., BHAT, TK. Effect of fermentation system on the production and properties of tannase of *Aspergillus niger* var *tieghem* MTCC 2425. *J. Gen. Appl. Microbiol.* v. 51, p. 203–212, 2005.
- RANI, K.; RANA, R.; DATT, S. Review on latest overview of proteases. *Int. J. Curr. Life Sci.* v. 2, p. 12-18, 2012.
- RAO, MB.; TANKSALE, AM.; GHATGE, MS.; DESHPANDE, VV. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and Biology Molecular Reviews.* v. 62, n. 3, p. 597-635, 1998.
- 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.
- RAZZAQ, A.; SHAMSI, S.; ALI, A.; ALI, Q.; SAJJAD, M.; MALIK, A.; ASHRAF, M. Microbial proteases applications. *Front Bioeng Biotechnol*. v. 7, p. 110, 2019.
- 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.
- ROSELL, CM.; SANTOS, E.; PENELLA, JMS.; HAROS, M. Wholemeal wheat bread: a comparison of different breadmaking processes and fungal phytase addition. *J. Cereal Sci*. v. 50, p. 272–277, 2009.
- ROSENFELDER-KUON, P.; SIEGERT, W.; RODEHUTSCORD, M. Effect of microbial phytase supplementation on P digestibility in pigs: a meta-analysis, *Archives of Animal Nutrition*. 2019.
- ROSTAGNO, HS.; HANNAS, MI.; DONZELE, JL.; SAKOMURA, NK.; PERAZZO, FG.; SARAIVA, AL.; TEIXEIRA, ML.; RODRIGUES, PB.; OLIVEIRA, RF.; BARRETO, SLT.; BRITO, CO. *Tabelas Brasileiras para Aves e Suínos*. 4^a 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. 25–30, 2016.
- SALMON, DNX.; PIVA, LC.; BINATI, RL.; RODRIGUES, C.; VANDERBERGHE, LPS.; SOCCOL, CR.; SPIER, MR. A bioprocess for the production of phytase from *Schizophyllum commune*: studies of its optimization, profile of fermentation parameters, characterization and stability. *Bioproc. Biosyst. Eng*. v. 35, p. 1067–1079, 2012.
- SANANGELANTONI, AM.; MALATRASI, M.; TRIVELLONI, E.; VISIOLI, G.; AGRIMONTI, C. A novel β -propeller phytase from the dioxin-degrading bacterium *Sphingomonas wittichii* RW-1. *Appl Microbiol Biotechnol*. v. 102, p. 8351–8358, 2018.
- SANDHYA, C.; SUMANTHA, A.; SZAKACS, G.; PANDEY, A. Comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid-state fermentation. *Proc Biochem*. v. 40, n. 8, p. 2689–2694, 2005.
- SANGUINE, IS.; CAVALHEIRO, GF.; GARCIA, NFL.; SANTOS, MV.; GANDRA, JR.; GOES, RHTB.; PAZ, MF.; FONSECA, GG.; LEITE, RSR. Xylanases of *Trichoderma*

koningii and *Trichoderma pseudokoningii*: Production, characterization and application as additives in the digestibility of forage for cattle. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. v. 44, 102482, 2022.

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.

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.

SAPNA, SB. Purification and characterization of a protease-resistant phytase of *Aspergillus oryzae* SBS50 whose properties make it exceptionally useful as a feed supplement. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2017.

SARATH, G.; DE LA MOTTE, RS.; WAGNER, FW. Protease assay methods. In: BEYNON, R. J.; BOND, J. S. *Proteolytic enzymes a practical approach*. New York: Oxford University. v. 275, n. 12, p. 25-55, 1989.

SARAVANABHAVAN, S.; THANIKAIVELAN, P.; RAO, JR.; NAIR, BU.; RAMASAMI, T. Natural leathers from natural materials: progressing toward a new arena in leather processing. *Environ Sci Technol*. v. 38, p. 871–879, 2004.

SARDJONO, YANG, Z., KNOL, W. Comparison of fermentation profiles between lupine and soybean by *Aspergillus oryzae* and *Aspergillus sojae* in solid-state culture systems. *J. Agric. Food Chem*. v. 46, n. 8, p. 3376-3380, 1998.

SAVITHA, S.; SADHASIVAM, S.; SWANMINATHAN, K.; LIN, FH. Fungal protease: Production, purification and compatibility with laundry detergents and their wash performance. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*. v. 42, p. 298–304, 2011.

SCHOCH, CL.; CIUFO, S.; DOMRACHEV, M.; HOTTON, CL.; KANNAN, S.; KHOVANSKAYA, R.; LEIPE, D.; MCVEIGH, R.; O'NEILL, K.; ROBERTSE, B.; SHARMA, S.; SOUSSOV, V.; SULLIVAN, JP.; SUN, L.; TURNER, S.; KARSCH-MIZRACHI, I. NCBI Taxonomy: a comprehensive update on curation, resources and tools. *Database (Oxford)*: [baaa062](#). PubMed: [32761142](#) PMC: [PMC7408187](#). 2020.

SCOTTÁ, BA.; ALBINO, LFT.; BRUSTOLINI, PC.; GOMIDE, APC.; CAMPOS, PF.; RODRIGUES, VV. Determinação da composição química e dos valores de energia metabolizável de alguns alimentos proteicos para frangos de corte. *Ciência Animal Brasileira*. v. 17, n. 4, p. 501-508, 2016.

- SELLE, PH.; RAVINDRAN, V. Microbial phytase in poultry nutrition. *Animal Feed Science and Technology*. v. 135, p.1-41, 2007.
- SELLE, PH.; RAVINDRAN, V. Phytate-degrading enzymes in pig nutrition. *Livestock Science*. v. 133, p. 9-122, 2008.
- SENA, LMF.; MORAIS, CG.; LOPES MR.; SANTOS, RO.; UETANABARO, APT.; MORAIS, PB.; VITAL, MJS.; MORAIS, MAM.; LACHANCE, MA.; ROSA, CA. D-Xylose fermentation, xylitol production and xylanase activities by seven new species of *Sugiyamaella*. *Antone van Leeuwenhoek*. v. 110, p. 53-67, 2016.
- SHAH, AR.; SHAH, RK.; MADAMWAR, D. Improvement of the quality of whole wheat bread by supplementation of xylanase from *Aspergillus foetidus*. *Bioresour Technol*. v. 97, n. 16, p. 2047-2053, 2006.
- SHETTY, JK.; PAULSON, B.; PEPSIN, M. CHOTANI, G.; DEAN, B.; HRUBY, M. Phytase in fuel ethanol production offers economical and environmental benefits. *Int. Sugar J*. v. 110, n. 1311, p. 160–174, 2008.
- SHIRASAKA, N.; NAITOU, M.; OKAMURA, K.; FUKUTA, Y.; TERASHITA, T.; KUSUDA, M. Purification and characterization of a fibrinolytic protease from *Aspergillus oryzae* KSK-3. *Mycoscience*. v. 53, n. 5, p. 354–364, 2012.
- 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.
- SILVA, CJA.; MALTA, DJN. A importância dos fungos na biotecnologia. *Ciências biológicas e da saúde*. Recife. v. 2, n. 3, p. 49-66, 2016.
- SILVA, LT.; MOREIRA, KA.; PORTO, TS.; PORTO, ALF. Produção de fitase a partir de resíduos agroindustriais em fermentação no estado sólido utilizando fungos do gênero *Aspergillus*. *Jepex 2010 – Universidade Federal Rural de Pernambuco*. 2010.
- SINGH, B.; BOUKHRIS, I.; PRAGYA; KUMAR, V.; YADAV, AN.; FARHAT-KHEMAKHEM, A.; KUMAR, A.; SINGH, D.; BLIBECH, M.; CHOUAYEKH, H.; ALGHAMDI, O. 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.
- SINGH, B.; SATYANARAYANA, T. Applications of phytase of thermophilic mould, *Sporotrichum thermophile*: A review. *Journal of Scientific & Industrial Research*. v. 69, p. 411-414, 2010.

- 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, P.; KUMAR, S. Microbial Enzyme in Food Biotechnology. *Enzymes in Food Biotechnology.* p. 19-28, 2019.
- SINGH, R.; KUMAR, M.; MITTAL, A.; MEHTA, PK. Microbial enzymes: industrial progress in 21st century. *3 Biotech.* v. 6, p. 174, 2016.
- SINGHAJUTHA, S.; BANGYEEKHUN, E.; ROMRUEN, U. Xylanase production by *Aspergillus fumigatus* UR01 by solid state fermentation of rice straw. *Asian J. Agric. Biol.* v. 8, n. 4, p. 422-427, 2020.
- SOLANKI, P.; PUTATUNDA, C.; KUMAR, A.; BHATIA, R.; WALIA, A. Microbial proteases: ubiquitous enzymes with innumerable uses. *3 Biotech.* v. 11, n. 10, p. 428, 2021.
- SOUZA, JB.; MICHELIN, M.; AMÂNCIO, FLR.; BRAZIL, OAV.; POLIZELI, MLTM.; RUZENE, DS.; SILVA, DP.; MENDONÇA, MC.; LÓPEZ, JA. Sunflower stalk as a carbon source inductive for fungal xylanase production. *Industrial Crops & Products.* v. 153, 2020.
- SOUZA, PMD.; BITTENCOURT, MLA.; CAPRARA, CC.; FREITAS, M.; ALMEIDA, RPC.; SILVEIRA, D.; FONSECA, YM.; FILHO, EXF.; JUNIOR, AP.; MAGALHÃES, PO. A biotechnology perspective of fungal proteases. *Brazilian Journal of Microbiology.* ISSN – 1517- 8382. v. 46, n. 2, p. 337-346, 2015.
- SRIVASTANA, N.; MISHRA, PK.; UPADHYAY, SN. Xylanases: For digestion of hemicellulose. *Industrial Enzymes for Biofuels Production.* p. 101–132, 2020.
- SU, G.; REN, JY.; YANG, B.; CUI, C.; ZHAO, MM. Comparison of hydrolysis characteristics on defatted peanut meal proteins between a protease extract from *Aspergillus oryzae* and commercial proteases. *Food Chemistry.* v. 126, p. 1306-1311, 2011.
- SULEIMANOVA, AD.; BEINHAUER, A.; VALEEVA, LR.; CHASTUKHINA, IB.; BALABAN, NP.; SHAKIROV, EV.; GREINER, R.; SHARIPOVA, MR. Novel glucose-1-phosphatase with high phytase activity and unusual metal ion activation from soil bacterium *Pantoea* sp. strain 3.5.1. *Appl Environ Microbiol.* v. 81, n. 19, p. 6790-6799, 2015.
- SUN, J.; WEN, F.; SI, T.; XU, JH.; ZHAO, H. Direct conversion of xylan to ethanol by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strains displaying an engineered minihemicellulosome. *Appl Environ Microbiol.* v. 78, p. 3837-3845, 2012.

- SUN, Y.; QIAN, Y.; ZHANG, J.; WANG, Y.; LI, X.; ZHANG, W.; WANG, L.; LIU, H.; ZHONG, Y. Extracellular protease production regulated by nitrogen and carbon sources in *Trichoderma reesei*. *Journal of Basic Microbiology*. v. 61. p. 122-132, 2021.
- SURESH, S.; SIVARAMAKRISHNAN, R.; RADHA, KV.; INCHAROENSAKDI, A.; PUGAZHENDHI, A. Ultrasound pretreated rice bran for *Rhizopus* sp. phytase production as a feed. *Food Bioscience*. v. 43, 101281, 2021.
- SUZUKI, U.; YOSHIMURA, K.; TAKAISHI, M. Über ein Enzyme “Phytase” das Anhydrooxy-methylendiphosphosäure spaltet. *Coll. Agric. Bull. Tokyo Imp. Univ.* v. 7, p. 503–505, 1907.
- SYNGENTA DIGITAL. Você Sabia? Para Onde Vai A Soja Produzida No Brasil. 2021. Disponível em: <https://blog.syngentadigital.ag/voce-sabia-para-onde-vai-sojaproduzida-no-brasil/>. Acesso em 28 de agosto de 2022.
- TANRUEAN, K.; PENKHRUE, W.; KULMA, J.; SUWANNARACH, N.; LUMYONG, S. Valorization of Lignocellulosic Wastes to Produce Phytase and Cellulolytic Enzymes from a Thermophilic Fungus, *Thermoascus aurantiacus* SL16W, under Semi-Solid State Fermentation. *J. Fungi*. v. 7, n. 286, 2021.
- TEKIN, A.; UZUNER, U.; SEZEN, K. Homology modeling and heterologous expression of highly alkaline subtilisin-like serine protease from *Bacillus halodurans* C-125. *Biotechnol Lett*. 2020.
- THOMAS, L. Current Developments in Biotechnology and Bioengineering. *Industrial Enzymes*. p. 127–148, 2017.
- 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.
- THOMPSON, LU.; YOON, JH. Starch digestibility as affected by polyphenols and phytic acid. *Journal of Food Science*. v. 49, n. 4, p. 1228-1229, 1984.
- UFFEN, RL. Xylan degradation: A glimpse at microbial diversity. *J Ind Microbiol Biotech*. v. 19, p. 1–16, 1997.
- UGWUANYI, JO. Agro-Industrial Wastes as Feedstock for Enzyme Production. *Enzymes for Nutritional Enrichment of Agro-Residues as Livestock Feed*. ISBN 978-0-12-802392-1. p. 233–260, 2016.
- VASUDEVAN, UM; JAISWAL, AK; KRISHNA, S; PANDEY, A. Thermostable phytase in feed and fuel industries. *Bioresource Technology*, v. 278, p. 400-407, 2019.

- 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.
- VEERABHADRAPPA, MB.; SHIVAKUMAR, SB.; DEVAPPA, S. Solid-state fermentation of *Jatropha* seed cake for optimization of lipase, protease and detoxification of anti-nutrients in *Jatropha* seed cake using *Aspergillus versicolor* CJS-98. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. v. 117, n. 2, p. 208-214, 2014.
- VIEIRA, BS.; CARAMORI JUNIOR, JG.; CORREA, GSS.; COLVARA, IG.; BRUSAMARELO, E.; PEREIRA, TVS.; BARBOSA, SAPV.; OLIVEIRA, CFS. Combination of phytase and citric acid, but not phytase alone, ensures regular rates of growth and bone mineralization in quails under severe phosphorus restriction. *J Anim Physiol Anim Nutr*. p. 1-9, 2019.
- VILLEGAS, E.; AUDAGUE, S.; ALCANTARA, L.; AURIA, R.; REVAH, S. Solid state fermentation: acid protease production in controlled CO₂ and O₂ environments. *Biotechnol. Adv.* v. 11, p. 387-397, 1993.
- VISHWANATHA, KS.; RAO, AG.; SINGH, S. Characterisation of acid protease expressed from *Aspergillus oryzae* MTCC 5341. *Food Chemistry*. v. 114, p. 402-407, 2009.
- VOHRA, A.; SATYANARAYANA, T. Phytases: microbial sources, production, purification, and potential biotechnological applications. *Crit. Rev. Biotechnol.* v. 23, p. 29–60, 2003.
- VUONG, TV.; MASTER, ER. Enzymatic upgrading of heteroxylans for added-value chemicals and polymers. *Curr. Opin. Biotechnol.* v. 73 p. 51-60, 2022.
- WALK, CL.; JUNTUNEN, K.; PALOHEIMO, M.; LEDOUX, DR. Evaluation of novel protease enzymes on growth performance and nutrient digestibility of poultry: enzyme dose response. *Poultry Science*. v. 98, n. 11, p. 5525-5532, 2019.
- WANG, S-L.; CHEN, Y-H.; WANG, C-L.; YEN, Y-H.; CHERN, M-K. Purification and characterization of a serine protease extracellularly produced by *Aspergillus fumigatus* in a shrimp and crab shell powder medium. *Enzym. Microb. Technol.* v. 36, p. 660-665, 2005.
- WANG, X.; LUO, H.; YU, W.; MA, R.; YOU, S.; LIU, W.; HOU, L.; ZHENG, F.; XIE, X.; YAO, B. A thermostable *Gloeophyllum trabeum* xylanase with potential for the brewing industry. *Food Chem.* v. 199, p. 516–523, 2016.
- WARD, OP. 3.49 - Proteases, Editor(s): Murray Moo-Young, *Comprehensive Biotechnology (Third Edition)*, Pergamon. ISBN 9780444640475. p. 604-615, 2011.

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.

WHITAKER, JR. Principles of enzymology for the food sciences. In: *Food Science and Technology*. Taylor & Francis, New York. 1993.

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.

YADAV, SK.; BISHT, D.; TIWARI, S.; DARMWAL, NS. Purification, biochemical characterization and performance evaluation of an alkaline serine protease from *Aspergillus flavus* MTCC 9952 mutant. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. v. 4, p. 667-677, 2015.

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.

ZANUTTO-ELGUI, MR.; VIEIRA, JCS.; PRADO, DZ.; BUZALAF, MAR.; PADILHA, PM.; OLIVEIRA, DEO.; FLEURI, LF. Production of milk peptides with antimicrobial and antioxidant properties through fungal proteases. *Food Chemistry*. v. 278, p. 823-831, 2019.

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*. p. 1-7, 2013.

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.

ZHANG, H.; SANG, Q. Production and extraction optimization of xylanase and β -mannanase by *Penicillium chrysogenum* QML2 and primary application in saccharification of corn cob. *Biochemical Engineering Journal*. v. 97, p. 101-110, 2015.

ZHANG, Z.; YANG, J.; XIE, P.; GAO, Y.; BAI, J.; ZHANG, C.; LIU, L.; WANG, Q.; GAO, X. Characterization of a thermostable phytase from *Bacillus licheniformis* WHU and further

stabilization of the enzyme through disulfide bond engineering, *Enzyme and Microbial Technology*. v. 142, 2020.

ZHAO, L.; ZHANG, Y. Effects of phosphate solubilization and phytohormone production of *Trichoderma asperellum* Q1 on promoting cucumber growth under salt stress. *Journal of Integrative Agriculture*. v. 14, n. 8, p. 1588-1597, 2015.

ZHU, J.; HONG, DD.; WAKISAKA, M. Phytic acid extracted from rice bran as a growth promoter for *Euglena gracilis*. *Open Chem*. v. 17, p. 57-63, 2019.