



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José do Rio Preto

Isabela Belei Delmaschio

Produção de fitases por fermentação em estado sólido e imobilização
das enzimas por *spray drying*

São José do Rio Preto
2014

Isabela Belei Delmaschio

Produção de fitases por fermentação em estado sólido e imobilização das
enzimas por *spray drying*

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência da Microbiologia, junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Área de Concentração – Microbiologia Industrial e Aplicada, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Orientador: Prof. Dr. João Cláudio Thoméo

São José do Rio Preto
2014

Delmaschio, Isabela Belei.

Produção de fitases por fermentação em estado sólido e imobilização das enzimas por spray drying / Isabela Belei Delmaschio. -- São José do Rio Preto, 2014

113 f. : il., tabs.

Orientador: João Cláudio Thoméo

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Tecnologia de alimentos. 2. Enzimas de fungos – Aplicações industriais. 3. Enzimas de fungos – Armazenamento. 4. Fungos termofílicos. 5. Fitases. 6. Xilanases. 7. Secagem em spray. I. Thoméo, João Cláudio. II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU – 663.15

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca
do IBILCE UNESP - Câmpus de São José
do Rio Preto

Isabela Belei Delmaschio

Produção de fitases por fermentação em estado sólido e imobilização das
enzimas por *spray drying*

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Microbiologia, junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Área de Concentração – Microbiologia Industrial e Aplicada, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Comissão Examinadora

Prof. Dr. João Cláudio Thoméo
UNESP – São José do Rio Preto
Orientador

Prof. Dr. Gustavo Orlando Bonilla Rodriguez
UNESP – São José do Rio Preto

Prof^ª. Dr^ª. Izabela Dutra Alvin
ITAL – Campinas

São José do Rio Preto
03 de dezembro de 2014

**“Põe no Senhor tuas
delícias e ele te dará o que
teu coração pede. Entrega
ao Senhor o teu futuro,
espera nele, que ele vai
agir”**

Salmos 3

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida e pelas infinitas graças derramadas no meu caminho.

Ao meu orientador João Cláudio Thoméo pela confiança, paciência, sabedoria e compreensão durante todos os momentos.

Aos meus pais Edmar e Marlene por todo apoio, incentivo, amor, dedicação e orgulho que têm por mim.

Ao meu irmão Gustavo por ser meu companheiro e amigo.

Ao meu namorado José Neto, por simplesmente existir na minha vida e pela cadeira emprestada para uma confortável elaboração dessa tese.

À minha sobrinha Lara, que chegou num dia e momento muito esperado por mim, me ajudando e acalmando.

Ao meu afilhado Nicolas, que me encanta e alegra.

À minha avó amada Donira, por ser minha luz.

A toda minha família Belei (Tios Marli e Adilson, Maureli e Célia, Márcio, Célia e Dito; primos: Nicolly, Polyani, Carlinho, Guilherme, Davi, Arthur, Murilo, Muriel, Vinícius, Amanda e Laurinha) e Delmaschio (Avós Maria e João, Tios Edson e Preta; primos: Leonardo e Uliana, Guilherme, Carol, Ana Júlia e Lorenzo), sem vocês eu não conseguiria! Obrigada por todos os momentos de amor, compreensão, risadas, lembranças e incentivos. Eu amo vocês infinitamente!

À minha querida aluna de iniciação científica Renata, obrigada pela disposição, sem você esse trabalho se tornaria muito difícil.

Aos meus companheiros de trabalho “Filhos do João Cláudio”: Priscila, Fernanda, Viviane, Eduardo, Caroli, Giuliana, Teresa, Juliana, Camila, Fabrício e Lina. Obrigada pelos momentos de auxílio, ajuda, solicitude e carinho! E também por todas as risadas, festas e comilanças.

Aos meus companheiros de trabalho LBMA: Isabel, Gisele, Josiani, Rafaela, Fernando, Cissa e especialmente ao Diego e Pedro. Muito obrigada pelos auxílios, conselhos, companhia e partilhas.

Às melhores amigas que existe, Lívia, Loyane, Tássia, Didi, Larissa e Gabriela pela convivência deliciosa, por me apontarem a melhor direção e por todos os momentos vividos e compartilhados.

À FAPESP, pela oportunidade e suporte financeiro.

A todos os professores do grupo da Pós-Graduação da Microbiologia, pela atenção e sabedoria concedidas.

A todos que de alguma forma contribuíram para a elaboração desse trabalho.

MUITO OBRIGADA!

RESUMO

Este trabalho visou à produção de fitases por fungos termofílicos em cultivo em estado sólido (CES), utilizando resíduos agroindustriais como substratos, e secá-las, juntamente com xilanases, por *spray drying*. Após a secagem, os pós foram armazenados e a redução da atividade enzimática com o tempo de armazenamento foi avaliada. Para a produção das fitases foram testados 13 fungos pertencentes do Laboratório de Bioquímica dos Processos e Microbiologia Aplicada do IBILCE/UNESP, sendo o termotolerante *Lichtheimia ramosa* escolhido para seguir com os experimentos. A xilanase foi metabolizada pelo fungo *Myceliophthora thermophila* I-1D3b. O fungo *L. ramosa* foi cultivado em bagaço de cana de açúcar, bagaço de laranja e farelo de trigo, enquanto que *M. thermophila* foi cultivado em bagaço de cana de açúcar e farelo de trigo, ambos a 45 °C. Os ensaios de secagem foram divididos entre discriminação do adjuvante que proporcionasse maior proteção às enzimas, otimização das condições de secagem e armazenamento dos pós secos. Para os ensaios de discriminação de adjuvante, foram escolhidas como variáveis o adjuvante e a temperatura de saída do ar do *spray dryer*, Os adjuvantes empregados foram farelo de trigo, farelo de milho e farelo de soja, sendo que este último forneceu os melhores resultados. A temperatura não foi um fator significativo na análise de variância. Para os ensaios de otimização das condições de secagem foi empregada a técnica de superfície de resposta, sendo usadas variáveis preditoras a temperatura de saída do ar, a vazão de alimentação de suspensão e a concentração de sólidos. Os resultados indicaram a vazão e concentração de sólidos como variáveis significativas. A suspensão na condição ótima de secagem continha 7,5% e a vazão foi de 3 mL/min, sendo a temperatura escolhida de 83 °C. O ensaio realizado nestas condições proporcionou retenção 83% de atividade de fitase e de 85% xilanase. Os pós produzidos na condição ótima de secagem foram armazenados à temperatura ambiente e sob refrigeração, juntamente com amostras de extrato enzimático bruto misturadas a farelo de soja e liofilizadas e com extrato enzimático bruto líquido. Para as amostras em pó houve boa retenção da atividade enzimática, sendo as amostras obtidas por *spray dryer* mais ativas. As enzimas do extrato líquido perderam rapidamente a atividade.

Palavras-chave: *Spray drying*. CES. Fitase. Xilanase. Adjuvantes. Armazenamento.

ABSTRACT

This work aimed to produce phytases by thermophilic molds in solid state cultivation, using solid agro-industrial by-products as substrates, and dry the enzymes, along with xylanases, by spray-drying. Following the drying, the powders were storage and the reduction of the enzyme activities was evaluated. For the phytase production, 13 fungi were tested, and Lichthemia ramosa was chosen. Xylanase was metabolized by Myceliophthora thermophila I-1D3b. All tested microorganisms belonged to the Laboratório de Bioquímica dos Processos e Microbiologia Aplicada. L. ramosa was cultivated in sugar cane bagasse, Orange pulp and peel and wheat bran, while M. thermophila was cultivated in sugar cane bagasse and wheat bran, both at 45 °C. Drying experiments were done to discriminate the adjuvant able to provide the best protection to the enzymes. The tested variables were the adjuvants (brans of wheat, corn and soybean) and the air temperature at the spray dryer outlet. The temperature was not a statistically significant factor and soybean bran provided the best protection. Experiments to optimize the drying conditions for soybean bran were carried out following a response surface approach, having the outlet air temperature, the suspension flow rate and the total solid concentration as the controlled variables. The results showed that the flow rate and the solid concentration were the significant variables. The estimated optimum condition had 7,5% of solids and the flow rate was 3 mL/min. The experiment carried at this condition, at 83 °C showed 83% of retention for phytase and 85% xylanase. The powders obtained at the optimum condition were storage at room temperature and under refrigeration, along with freeze-dried samples of raw enzymatic extract mixed with soybean bran and with liquid samples of raw enzymatic extract. The powder samples retained high enzymatic activities, being the spray-dried samples more active than the freeze-dried ones. The liquid samples retained little activities after 15 days of storage.

Keywords: Spray drying. SSF. Phytase. Xylanase. Adjuvants. Storage.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1. Estrutura do mio-inositol, pertence à família dos inositolis e é o estereoisômero mais abundante na natureza.	21
Figura 1.2. Ácido fítico na conformação de cadeira (energeticamente mais estável) mostrando um grupo fosfato em posição axial (C2) e cinco grupos fosfatos equatoriais.	21
Figura 1.3. Exemplos de possíveis ligações entre o ácido fítico e alguns nutrientes em diferentes pH.	22
Figura 1.4. Representação do fitato complexado com proteína, cálcio e aminoácido.	23
Figura 1.5. pH do alimento (ração farelada) nos diferentes segmentos do trato digestório do frango de corte alimentado, <i>ad libitum</i> , durante 6 semanas.	24
Figura 1.6. Esquema do ácido fítico complexado com vários minerais bivalentes.	25
Figura 1.7. Hidrólise do fitato pela fitase em inositol, fosfato, e outros elementos divalentes. O fitato é mio-inositol-1,2,3,4,5,6-di-hexaquis fosfato que contém aproximadamente de 14 a 28% de fósforo e 12-20% de cálcio.	32
Figura 1.8. Reação de hidrólise do fitato pela fitase.	35
Figura 1.9. Representação esquemática da estrutura da xilana vegetal e enzimas atuantes.	38
Figura 1.10. Representação esquemática de alguns processos de micro-escala que ocorre durante a CES.	42
Figura 1.11. Diagrama esquemático da secagem por atomização em mini <i>spray dryer</i> .	46
Figura 3.1. Embalagem de polipropileno para CES antes do cultivo (A) e após o período de incubação de 96 h a 45°C.	52
Figura 3.2. Equipamento <i>spray dryer</i> MSD 0,5.	60
Figura 3.3. Equipamento liofilizador modelo ThermoScientific RVT4104.	61
Figura 4.1. Atividade das fitases por CES após 96 horas, utilizando proporção 1:2:2 para bagaço de cana de açúcar, farelo de trigo e bagaço de laranja, respectivamente.	66
Figura 4.2. Atividade das fitases produzidas pelo fungo <i>Lichtheimia ramosa</i> , por CES pelo período de 96 horas e variação da proporção dos substratos bagaço de cana de açúcar, farelo de trigo e bagaço de laranja, respectivamente.	67
Figura 4.3. Atividade das fitases produzidas pelo fungo <i>Lichtheimia ramosa</i> , por CES, na proporção de substrato de 1:2:2 para bagaço de cana de açúcar, farelo de trigo e bagaço de laranja, respectivamente, com variação do período de cultivo.	68
Figura 4.4. Atividade das fitases produzidas pelo fungo <i>Lichtheimia ramosa</i> , por CES, por 96 horas, na proporção de substrato de 1:2:2 para bagaço de cana de açúcar, bagaço de laranja e farelo de trigo (FT)/farelo de soja (FS); em diferentes pH da solução nutriente de cultivo.	68

Figura 4.5. Atividade de fitases para os fatores analisados nos ensaios de otimização do CES.	72
Figura 4.6. Atividade relativa (AR) das atividades de fitases dos extratos brutos armazenados por um mês sob refrigeração, congelamento e congelamento intermitente.	73
Figura 4.7. Atividade de fitases dos extratos brutos armazenados com glicerol e PMSF, por um mês sob congelamento.	75
Figura 4.8. Dependência da atividade enzimática da fitase com o pH (A) e temperatura (B) de reação.	76
Figura 4.9. Dependência da atividade enzimática da xilanase com o pH (A) e temperatura (B) de reação.	78
Figura 4.10. Média das atividades residuais de fitases para os fatores adjuvantes (Adj) e temperatura de saída do gás ($T_{saída}$) nos ensaios de discriminação dos adjuvantes.	84
Figura 4.11. Média das atividades residuais de xilanasas para os fatores adjuvantes (Adj) e temperatura de saída do gás ($T_{saída}$) nos ensaios de discriminação dos adjuvantes.	85
Figura 4.12. Agregação de proteínas em superfície sólida em alta temperatura.	89
Figura 4.13. Superfície de resposta para atividade enzimática de xilanase para o pós obtidos em <i>spray dryer</i> nos ensaios de otimização das condições de secagem, empregando o adjuvante farelo de soja.	92
Figura 4.14. Retenção da atividade xilanase (A) e fitase (B) dos pós obtidos por <i>spray drying</i> e liofilização na condição ótima, armazenados sob refrigeração (4°) e no ambiente (25°).	94

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1. Teor de fósforo dos principais alimentos utilizados nas rações de aves.	18
Tabela 1.2. Teor de polissacarídeo não amiláceos dos principais alimentos utilizados nas rações de aves.	20
Tabela 1.3. Duração média do tempo de trânsito da ingesta nos diferentes compartimentos do trato gastrointestinal do frango.	33
Tabela 1.4. Fitases comerciais encontradas no mercado mundial.	36
Tabela 1.5a. Exemplos na literatura de produção de fitases fúngica por CES.	40
Tabela 1.5b. Exemplos na literatura de produção de xilanases fúngica por CES.	41
Tabela 1.6. Composição química do farelo de trigo (FT), farelo de soja (FS) e farelo de milho (FM), expressos na matéria natural.	48
Tabela 3.1. Planejamento estatístico fatorial multiníveis para a otimização do cultivo em estado sólido que proporcione melhor produção de fitases.	53
Tabela 3.2. Planejamento estatístico fatorial multiníveis para a discriminação do adjuvante que proporcione maior retenção da atividade enzimática.	63
Tabela 3.3. Planejamento estatístico fatorial multiníveis para os ensaios de otimização das condições de secagem.	63
Tabela 4.1. Planejamento estatístico para otimização da produção de fitases.	69
Tabela 4.2. Análise de variância para a atividade enzimática de fitases. Apenas os fatores principais e os termos de interação de primeira ordem foram incluídos na análise.	70
Tabela 4.3. Valores codificados (P_{sub} e T_{cult}) e respostas da atividade enzimática da fitase nos ensaios de otimização das condições de cultivo em estado sólido.	71
Tabela 4.4. Análise de variância para resposta de atividade de fitases nos ensaios de otimização de CES.	71
Tabela 4.5. Quantidade de proteína, fitases e proteases no EEB e atividade de fitase e protease.	74
Tabela 4.6. Exemplos na literatura de pH e temperatura ótimos de fitases.	76
Tabela 4.7. Exemplos na literatura de pH e temperatura ótimos de xilanases.	78
Tabela 4.8. Atividades relativas das suspensões de secagem em relação ao EEB.	79
Tabela 4.9. Quantificação enzimática de fitases e xilanases dos farelos de soja, trigo e milho, e do extrato enzimático bruto.	80
Tabela 4.10. Avaliação do melhor tempo de extração dos pós obtidos em secagem por <i>spray dryer</i> .	81
Tabela 4.11. Parâmetros operacionais e resultados obtidos nos ensaios discriminativos de secagem em <i>spray dryer</i> de extrato enzimático bruto acrescido de adjuvante.	83

Tabela 4.12. Análise de variância para resposta da atividade de fitase, nos ensaios de discriminação dos adjuvantes.	8
Tabela 4.13. Análise de variância para resposta da atividade de xilanase, nos ensaios de discriminação dos adjuvantes.	85
Tabela 4.14. Valores codificados e respostas da atividade residual da fitase e xilanase e umidade final dos pós nos ensaios de otimização das condições de secagem.	87
Tabela 4.15. ANOVA para atividade enzimática de fitase para os ensaios de otimização das condições de secagem empregando-se o adjuvante farelo de soja.	90
Tabela 4.16. ANOVA para atividade enzimática de xilanase para os ensaios de otimização das condições de secagem empregando-se o adjuvante farelo de soja.	91

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

PNA	polissacarídeos não amiláceos
P	fósforo
PB	proteína bruta
HFA	histidina fosfatase ácida
FBH	fitase β -hélice
FAP=	fosfatase ácida “purple”
PTP=	proteína tirosina fosfatase
CES=	cultivo em estado sólido
BDA	batata dextrose ágar
P _{sub}	proporção de substrato
T _{cult}	tempo de cultivo
T	temperatura de cultivo
Umid	umidade
Adj	adjuvante
T _{saída}	temperatura de saída
Q _{alim}	vazão de alimentação
ST	sólidos totais
EEB	extrato enzimático bruto
BC	bagaço de cana de açúcar
FT	farelo de trigo
BL	bagaço de laranja
FS	farelo de soja
FM	farelo de milho
U/gss	unidade/grama de sólido seco
PMSF	fluoreto de fenilmetilsulfonila
AR	atividade relativa
A.Re	atividade residual
Mist	mistura líquida dos adjuvantes com extrato enzimático bruto

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	14
1 REVISÃO BILIOGRÁFICA	17
1.1 Alimentação Animal	17
1.2 Fitato	21
1.3 Aditivos Alimentares	25
1.3.1 <i>Enzimas exógenas utilizadas na alimentação dos animal</i>	28
- Carboidrases	30
- Proteases	31
- Lipases	31
1.3.1.1 Fitases	32
1.3.1.2 Xilanases	36
1.4 Cultivo em Estado Sólido na Produção de Enzimas	40
1.5 Aporte Tecnológico às Enzimas	44
2 OBJETIVOS	49
3 MATERIAIS E MÉTODOS	50
3.1 Materiais	50
3.2 Produção de Fitases	51
3.2.1 <i>Seleção de fungos</i>	51
3.2.2 <i>Cultivo em estado sólido (CES)</i>	51
3.2.2.1 Ensaio de análises	51
3.2.2.2 Otimização de cultivo	53
3.2.2.3 Obtenção de EEB para processo de secagem	53
3.2.3 <i>Determinação de atividade enzimática</i>	54
3.2.4 <i>Caracterização físico-química das enzimas</i>	55
3.2.5 <i>Ensaio de armazenamento do EEB</i>	55
3.2.5.1 Determinação de atividade enzimática de proteases	56
3.2.5.2 Quantificação do teor de proteína no EEB	56
3.3 Produção de Xilanases	57
3.3.1 <i>Seleção de fungos</i>	57
3.3.2 <i>Cultivo em estado sólido (CES)</i>	57
3.3.3 <i>Determinação das atividades enzimáticas</i>	58
3.4 Ensaio de Secagem	59
3.4.1 <i>Determinação do teor de sólidos</i>	59
3.4.2 <i>Secagem das enzimas por spray drying</i>	59
3.4.3 <i>Secagem das enzimas por liofilização</i>	61
3.4.4 <i>Extração enzimática dos pós</i>	61

3.5	Planejamento Estatístico	62
3.5.1	<i>Discriminação dos adjuvantes</i>	62
3.5.2	<i>Ensaio de otimização das condições de secagem</i>	63
3.6	Ensaio de Armazenamento	63
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES	65
4.1	Seleção dos Microrganismos Produtores de Fitases	65
4.2	Otimização da Produção de Fitases	65
4.3	Ensaio de Armazenamento do Extrato Enzimático Aquoso Bruto	72
4.4	Caracterização Físico-química das Enzimas	76
4.4.1	<i>Fitases</i>	76
4.4.2	<i>Xilanases</i>	77
4.5	Ensaio de Secagem	79
4.5.1	<i>Ensaio preliminares</i>	79
4.5.2	<i>Ensaio de discriminação dos adjuvantes</i>	82
4.5.3	<i>Ensaio de otimização das condições de secagem</i>	86
4.6	Ensaio de Armazenamento dos Pós	93
5	CONCLUSÕES	97
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	99

INTRODUÇÃO

A necessidade de melhoria na produtividade e a crescente preocupação ambiental tem incentivado o uso de enzimas na alimentação de animais voltados para produção em larga escala. Segundo pesquisas de empresas como *Companies and Markets* em 2012, e *The Freedonia Group* (2014), o mercado mundial de enzimas movimentará em torno de US\$3,74 bilhões até 2015, e crescerá 6,4% ao ano até 2017, resultado da soma de diversos setores econômicos, como de detergentes, alimentos, farmacêuticos, biocombustíveis, rações para animais e têxtil, dentre outros (PANDEY *et al.* 2011). As hidrolases, enzimas que catalisam a quebra dos substratos na presença de moléculas de água, representam 75% das enzimas industriais, sendo uma parcela de 20% representada pelas celulases (SHINGHANIA *et al.* 2010). Espera-se que até 2019, o mercado de carboidrases, entre elas as xilanases, mobilize US\$3,8 milhões (COMPANIES AND MARKETS, 2014). Deste total, as enzimas usadas como aditivos de ração animal são responsáveis por quase 16% do total (THAKORE, 2008). Haifeng *et al.* (2007), afirmaram que a venda anual de fitases, especialmente as produzidas por *Aspergillus niger* e *Escherichia coli*, foi estimada em US\$ 500 milhões, compreendendo cerca de um terço do mercado total de enzimas alimentares.

Alimentos de origem vegetal contêm polissacarídeos não amiláceos (PNA) que além de serem açúcares simples de baixa digestibilidade, causam transtornos no trânsito intestinal dos animais monogástricos. Os PNA além de aumentarem a viscosidade da ingesta, dificultam a ação de enzimas endógenas, pois atuam como barreira física, reduzindo o aproveitamento dos nutrientes dos grãos (CONTE *et al.* 2003). Outro fator antinutricional é o ácido fítico, principal forma de armazenamento de fósforo nos alimentos vegetais. Este composto tem capacidade de complexar com outros nutrientes,

causando perdas endógenas e prejudicando o desempenho zootécnico dos animais (LEI e PORRES, 2003; COSTA *et al.* 2007).

As enzimas são adicionadas na alimentação animal com a finalidade de melhorar o seu desempenho metabólico. As aves não sintetizam ou produzem em quantidades insuficientes certas enzimas endógenas, utilizadas para a digestão dos vários componentes químicos encontrados nos alimentos de origem vegetal ou para atuarem em alguns processos antinutricionais (COSTA *et al.* 2007).

No entanto, as enzimas apresentam especificidade quanto à sua ação catalítica. Sendo assim, pesquisas mostram que a utilização de mais de uma enzima, como fitases e xilanases surge como alternativa para que animais monogástricos possam melhorar seu desempenho e digestibilidade alimentar (TEIXEIRA, 2013).

Uma alternativa para a redução dos custos da produção das enzimas está na possibilidade de usar resíduos agroindustriais por cultivo em estado sólido. O Brasil devido as suas características climáticas dispõe de grande variedade de resíduos agroindustriais e agrícolas utilizados nos cultivos microbianos para a produção de enzimas (PALMA, 2003).

Apesar dos avanços alcançados nos processos de obtenção de enzimas, a consolidação de sua aplicação em processos tecnológicos depende dos produtos apresentarem-se ativos e estáveis por longos períodos, mesmo quando não armazenadas nas condições ideais (SAMBORSKA *et al.* 2005). Soluções de proteínas são facilmente desnaturadas em decorrência de efeitos adversos como aquecimento, agitação, mudanças de pH, exposição a agentes desnaturantes, além das degradações por reações químicas como hidrólise ou deamidação, mediadas pela água. Com isso, se a estabilidade da enzima não for mantida durante o acondicionamento e transporte, esta não será de grande aplicabilidade.

Frente a estas dificuldades intrínsecas às formulações líquidas, a secagem por *spray drying* representa uma alternativa satisfatória, visto que esta técnica já foi aplicada à desidratação de materiais termosensíveis e resulta em grande redução de volume, facilitando transporte e armazenamento (CARPENTER *et al.* 1997).

Diante disso, o presente trabalho objetivou-se na produção das enzimas fitases e xilanases produzidas por fungos termofílicos através do cultivo em estado sólido de resíduos agroindustriais, com posterior aplicação da técnica de *spray drying*.

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 Alimentação Animal

A nutrição animal adequada visa atender todos os nutrientes que os animais exigem para que expressem todo o seu potencial produtivo. O mercado nacional de alimentação animal movimentava R\$ 16 bilhões e mobiliza quase 2.500 empresas para produzir 70 milhões de toneladas. Dentre essa quantidade fabricada, 70% correspondem à produção de ração para suínos e aves (MATSUDA, 2013).

A produção industrial de aves e suínos assumiu caráter de importância fundamental para a economia de nosso país nos últimos anos. Grande parte deste crescimento está associada ao conhecimento do valor nutricional dos ingredientes das rações e das exigências nutricionais dos animais nas diferentes fases produtivas. Na elaboração de rações para animais monogástricos é de fundamental importância o conhecimento do valor nutricional dos alimentos, deste modo a otimizar o aproveitamento dos nutrientes pelos animais, evitando deficiências ou excesso destes, o que tanto auxilia na diminuição de custos, quanto na excreção de nutrientes no ambiente (ARAÚJO, 2005; ROSTAGNO *et al.* 2007). Na criação de animais monogástricos a alimentação representa cerca de 70% do custo de produção (ARAÚJO, 2005, FERREIRA *et al.* 2013).

Os alimentos comumente utilizados na nutrição dos animais monogástricos são legumes, sementes e grãos, dentre os quais destacam-se o milho e farelo de soja. O fitato é a principal forma de armazenamento de fósforo (P) nesses alimentos. Segundo Ravindran *et al.* (1995), as dietas das aves contêm de 2 a 4 g de fósforo fítico/kg de ração, como pode ser visto na Tabela 1.1 A variabilidade no teor de fósforo fítico (P fítico) da ração é devida a variações no clima, solo/adubação, idade e estágio de

maturação do vegetal, cultivar, grau de processamento, melhoramento genético, dentre outros fatores.

Tabela 1.1. Teor de fósforo dos principais alimentos utilizados nas rações de aves.

Alimentos	% de fósforo (P)*		
	P total	P disponível ¹	P fítico
Farelo de arroz	1,67	0,24	1,43
Farelo de amendoim	0,63	0,21	0,42
Polpa cítrica	0,20	0,07	0,13
Milho	0,25	0,06	0,19
Farelo de soja (45% de PB ²)	0,56	0,22	0,34
Soja integral tostada	0,52	0,19	0,33
Sorgo baixo tanino	0,26	0,08	0,18
Farelo de trigo	0,97	0,33	0,64
Farinha de vísceras de aves	2,54	2,54	-
Fosfato bicálcico	18,5	18,5	-
Farinha de carne e ossos (41% de PB ²)	6,53	5,88	-
Farinha de carne e ossos (46% de PB ²)	5,97	5,37	-

*Em matéria natural. ¹Valores calculados ou estimados. ²PB=proteína bruta. Extraído e modificado de Rostagno *et al.* (2011).

Conforme a Tabela 1.1, o ingrediente vegetal com a maior quantidade de P disponível é o farelo de soja com 39,28%, e o que contem a menor quantidade é o farelo de arroz com somente 14,37%, seguido pelo milho com apenas 24%. Estes dados corroboram os do *National Research Council - NRC* (1994), para quem apenas 30% do P de origem vegetal está na forma disponível, sendo os 70% restantes correspondentes

ao fósforo fítico. Já as farinhas de carne e ossos e a farinha de vísceras de aves contribuem com, respectivamente, 90% e 100% de P disponível. No entanto, há limitações para o seu uso em rações, sendo que determinados países, em destaque os europeus, não importam carnes provenientes de animais alimentados com fontes de P de origem animal (BELLAVÉR, 2002, LIMA *et al.* 2007). Já o fosfato bicálcico é considerado uma fonte inorgânica de P 100% disponível, embora sua digestibilidade para aves seja de apenas 70% (ROSTAGNO *et al.* 2011). No entanto, é importante considerar que trata-se de um ingrediente caro, além de ser um recurso mineral não renovável o que tem provocado a preocupação de uma crise futura no seu suprimento.

Como a molécula de ácido fítico tem alto conteúdo de fósforo (282 g de fósforo/kg de ácido fítico), justifica-se a necessidade de um maior aproveitamento deste elemento pelos animais monogástricos, com a adição de fitases exógenas, diminuindo o preço das rações, melhorando o aproveitamento dos nutrientes pelos animais, além da produção animal de forma mais responsável devido a redução da excreção de fósforo (NAVES, 2012).

Outro fator antinutricional presente nos alimentos vegetais são os polissacarídeos não amiláceos (PNA). Os PNA são componentes da parede celular vegetal e são geralmente a celulose, hemicelulose, quitina e pectinas, os quais podem interferir no desempenho zootécnico. Por não poderem ser degradados por enzimas endógenas, estes elementos ocasionam problemas como a modificação no tempo de permanência e viscosidade do alimento no trato digestivo dos animais monogástricos (CAMPESTRINI *et al.* 2005).

Os PNA são divididos em fração solúvel e insolúvel. A fração solúvel em água, composta principalmente pela hemicelulose, aumenta a viscosidade do alimento ingerido, o que diminui a digestibilidade dos nutrientes (CARRÉ *et al.* 2004). A fração

insolúvel, devido ao caráter indigestível, atua como barreira entre a enzima e o nutriente (WYATT *et al.* 2008). A Tabela 1.2 apresenta o teor de PNA de ingredientes utilizados na nutrição animal. O milho, principal elemento utilizado nas formulações de rações para animais monogástricos no Brasil, não apresenta alta quantidade de PNA, portanto, não apresenta muitos problemas com digestibilidade causados por esses compostos. Já o farelo de soja, principal fonte proteica dessas dietas, pode conter quantidades consideráveis de PNA (CHOCT, 1997; SORBARA, 2008).

Tabela 1.2. Teor de polissacarídeo não amiláceos dos principais alimentos utilizados nas rações de aves.

Alimentos	Polissacarídeos não amiláceos (%)		
	Solúvel	Insolúvel	Total
Milho	0,1	8,0	8,1
Trigo	2,4	9,0	11,4
Soja	2,7	16,5	19,2
Sorgo	0,2	4,6	4,8
Centeio	4,6	8,6	13,2
Cevada	4,5	12,2	16,7
Farelo de arroz	0,5	21,3	21,8

Extraído e modificado de Choct *et al.* (1997).

Smith e Annison (1996) citam que o milho possui aproximadamente 8% de PNA, sendo que 6% na forma insolúvel. O farelo de soja possui em torno de 27% de PNA, sendo esses compostos em sua maioria encontrados na forma de pectinas, hemiceluloses e oligossacarídeos (rafinose e estaquiose) (CHARLTON, 1996). Essa quantidade de compostos é suficiente para causar efeitos adversos nos animais que ingerirem rações formuladas com esses ingredientes. Diante disso, a utilização de enzimas exógenas, como as xilanases, tem sido adotada para reduzir os efeitos negativos dos polissacarídeos não amiláceos.

1.2 Fitato

Há vários nomes e símbolos usados na literatura para referir-se à molécula de fitato, tais como: ácido fítico, hexafosfato de mio-inositol, IP6, InsP6 ou Ins(1,2,3,4,5,6)P6 (ALMEIDA *et al.* 2003). Para Selle e Ravindran (2007), o termo fitato refere-se quimicamente ao sal do ácido fítico, que é uma estrutura de baixo peso molecular, formada por seis grupos fosfatos ligados a uma molécula com seis carbonos. Segundo Almeida *et al.* (2003), o fitato é sintetizado a partir da fosforilação completa do mio-inositol, visto na Figura 1, que, por sua vez, tem a glicose como precursora.

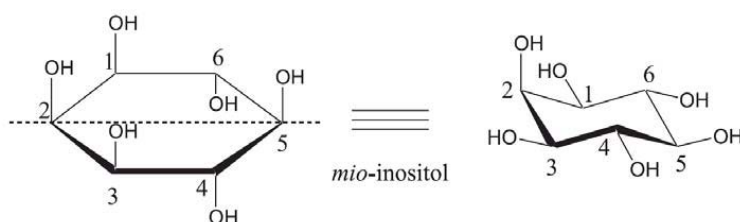


Figura 1.1. Estrutura do mio-inositol, pertence à família dos inositóis e é o estereoisômero mais abundante na natureza (ALMEIDA *et al.* 2003).

Segundo a nomenclatura oficial, o único grupo hidroxila axial do mio-inositol ocupa a posição C2 na estrutura (Figura 1.1), conseqüentemente, o único grupo fosfato do fitato disposto axialmente será aquele ligado ao C2, demonstrado na Figura 1.2.

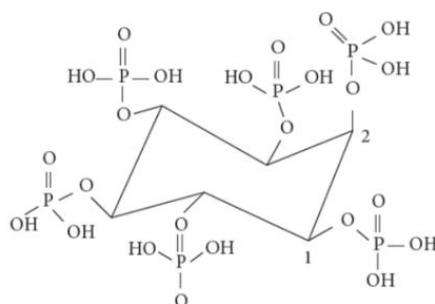


Figura 1.2. Ácido fítico na conformação de cadeira (energeticamente mais estável) mostrando um grupo fosfato em posição axial (C2) e cinco grupos fosfatos equatoriais (QUIRRENBACH *et al.* 2009).

A posição C2 no fitato tem função particular, pois as fitases são estereoespecíficas e apresentam forte preferência pelos grupos fosfatos ligados equatorialmente ao anel de mio-inositol, sendo o grupo fosfato disposto axialmente no C2 resistente à hidrólise enzimática (LEI e PORRES, 2003).

O ácido fítico pode complexar-se com nutrientes da dieta, durante a digestão, diminuindo a biodisponibilidade desses e podendo comprometer o desempenho zootécnico dos animais. O fitato pode ter até 12 cargas negativas, sendo 2 cargas localizadas em cada um dos 6 grupos fosfatos da molécula (QUIRRENBACH *et al.* 2009). O número de cargas iônicas no fosfato de mio-inositol influencia sua habilidade complexante e a desprotonação dos grupos fosfatos depende do pH no qual a molécula se encontra. Tais complexos são formados principalmente em pH neutro e básico, pois em pH ácido a protonação parcial ou total do ácido fítico diminui sua capacidade de ligar-se a nutrientes catiônicos. Em contrapartida, o fitato carregado negativamente pode complexar-se com minerais catiônicos sendo que os divalentes (Ca^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{2+} , Cu^{2+}) são mais susceptíveis (MAGA, 1982; KORNEGAY, 2001).

Há também a possibilidade da ligação do fitato com moléculas de amido e proteína como demonstra a Figura 1.3.

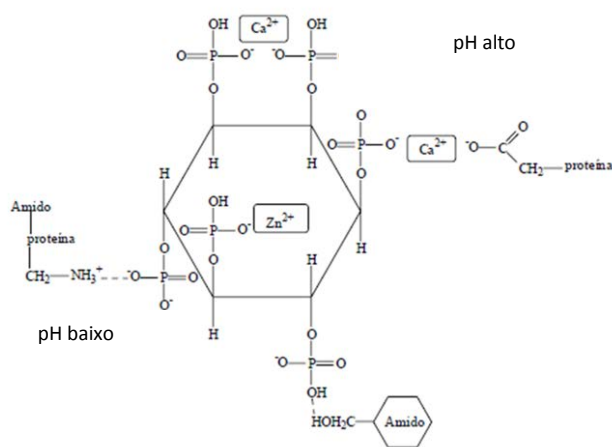


Figura 1.3. Exemplos de possíveis ligações entre o ácido fítico e alguns nutrientes em diferentes pH (THOMPSON, 1988).

Para Cousins (1999), a interação com a proteína é dependente das condições de pH, pois esta se dá por ligação iônica. Essa informação deve ser levada em consideração na formulação de rações, pois há mudanças de pH ao longo do trato gastrointestinal dos animais. Complexos fitato-mineral-proteína, Figura 1.4, são de difícil digestão o que dificulta a assimilação da proteína. Vários estudos demonstraram que proteínas da soja, milho, trigo, farelo de girassol e de arroz formam complexos com ácido fítico (RAVINDRAN *et al.* 1999).

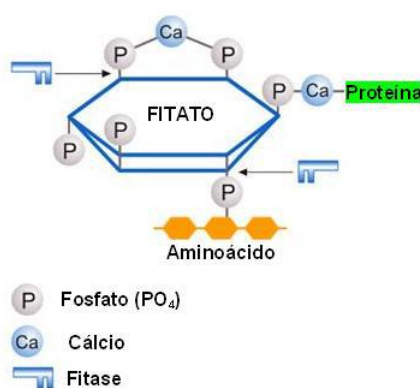


Figura 1.4. Representação do fitato complexado com proteína, cálcio e aminoácido (SALMON, 2011).

Quanto maior o grau de fosforilação do mio-inositol, maior é o seu poder de complexar. É essencial citar que o cálcio dietético pode ligar-se ao fitato formando complexos ou ligar-se ao P inorgânico formando fosfatos de cálcio como o $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (TAMIM *et al.* 2004). As concentrações molares relativas de fósforo inorgânico e fitato podem influenciar a espécie química que vai ser formada, entretanto, sabe-se que o Ca^{2+} tem maior afinidade pelo fitato do que pelo ortofosfato (NAVES, 2012). Segundo Selle *et al.* (2009), é provável que o cálcio não esteja complexado com o fitato nos ingredientes que compõem a ração porque eles possuem baixa concentração desse mineral. Sendo assim, a maior taxa de formação dos complexos se dá no trato digestório das aves e é de relevância nutricional, pois estima-se que aproximadamente um terço do

cálcio dietético forme complexos com o fitato durante a passagem da ração pelo intestino.

O pH do trato gastrointestinal do frango, ilustrado na Figura 1.5, é alterado ao longo do seu comprimento, o que irá influenciar diretamente na contribuição de formação dos complexos fitato-nutrientes.

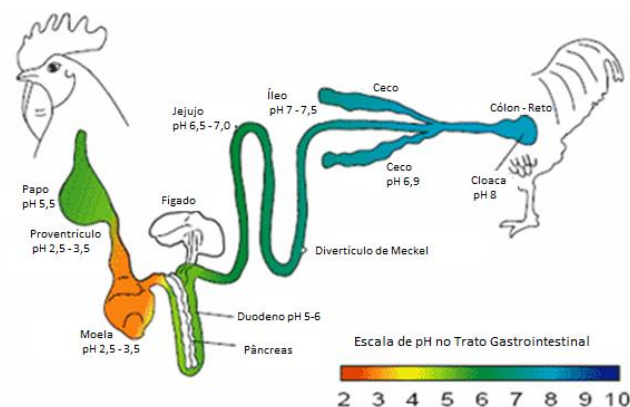


Figura 1.5. pH do alimento (ração farelada) nos diferentes segmentos do trato digestório do frango de corte alimentado, ad libitum, durante 6 semanas (GAUTHIER, 2002).

Em pH neutro ou básico, a desprotonação dos grupos fosfatos do fitato aumenta sua afinidade por cátions metálicos divalentes (ex: Ca^{2+} e Mg^{2+}), causando a formação de complexos fitato-metal, demonstrados na Figura 1.6. Oh *et al.* (2001) relatam que o complexo fitato- Ca é formado principalmente em pH de 5,0 a 8,5 sendo que a afinidade do fitato pelo Ca^{2+} aumenta com o aumento do pH. Portanto, teoricamente, esse tipo de complexo pode ser formado apenas no proventrículo e moela devido ao forte caráter ácido desses segmentos. Até o momento, as fitases comercializadas atuam de modo eficiente apenas sobre o “fitato não complexado”, portanto, são suplementadas na ração no sentido de reduzir a formação de complexos pelo fitato, consequentemente aumentando a biodisponibilidade de nutrientes da dieta. Diante disso, tem-se ressaltado as fitases que atuam em baixo pH.

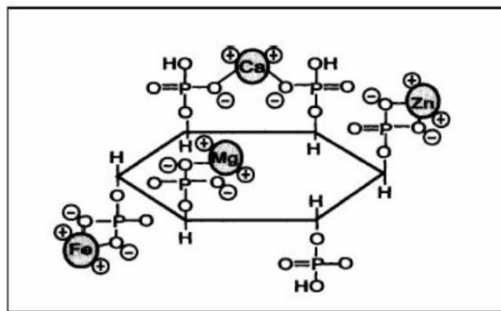


Figura 1.6. Esquema do ácido fítico complexado com vários minerais bivalentes (COUSINS,1999).

O fósforo é um nutriente que desempenha várias funções fisiológicas incluindo aquelas responsáveis pelo crescimento e manutenção metabólica dos animais (ASSUENA *et al.* 2009). Vários são os parâmetros empregados para avaliar sua utilização no organismo dos animais, destacando-se: ganho de peso, resistência à quebra dos ossos, fósforo no soro, atividade da fosfatase alcalina, fósforo e cinza nos ossos, anormalidades no esqueleto, densidade dos ossos, distribuição do fósforo em tecidos, digestibilidade aparente e verdadeira (VITTI, 1989; BARBOSA *et al.* 1992; GOMES *et al.* 1992).

1.3 Aditivos Alimentares

Segundo o comitê de Especialistas em Aditivos Alimentares da Organização Mundial da Saúde (OMS)/Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO) [*The Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives – JECFA*], aditivo alimentar é definido como qualquer substância que não se consome normalmente na nutrição, nem se utiliza como ingrediente básico desta, tendo ou não valor nutritivo, e cuja adição intencional ao alimento, com fins tecnológicos em sua fase de fabricação, resulte ou possa resultar em produtos ou subprodutos, que melhorem as características nutritivas e/ou sensoriais do alimento.

Os aditivos são utilizados na produção animal com os objetivos de aumentar as taxas de crescimento e sobrevivência, melhorar a saúde e a eficiência alimentar, reduzir as cargas patogênicas e a transmissão de patógenos via alimentos, reduzir a produção de dejetos, minimizando o impacto ambiental (GODOI *et al.* 2008).

Um dos fatores que contribuíram para a obtenção da alta produtividade apresentada pela indústria avícola foi a utilização de aditivos nas dietas, aliando a capacidade de melhorar o desempenho animal com as características físicas dos alimentos. O uso de aditivos é, hoje, motivo de discussão devido à pressão do público consumidor exacerbado por matérias sensacionalistas veiculados pela imprensa por demanda de produtos naturais. Sugerem, ainda, novas regulamentações sobre a alimentação animal, como a proibição do uso de subprodutos da mesma espécie e de restos de cozinha, e a obrigatoriedade de identificação de origem dos componentes do alimento. Com isso, é cada dia mais comum a utilização de aditivos na dieta dos animais monogástricos, entre eles, probióticos, prebióticos, simbióticos, antibióticos e enzimas exógenas, que podem auxiliar de forma direta e/ou indiretamente a utilização eficaz dos nutrientes pelo animal (SCHWARZ, 2002).

No Brasil, desde janeiro de 2006 existem restrições ao uso de antibióticos nas rações, pois esses são acusados de deixar resíduos na carne e proporcionar resistência aos microrganismos, prejudicando a saúde humana. Com isso, o uso de probióticos, prebióticos e simbióticos se tornam uma alternativa na para que os índices de produção sejam alcançados.

Probióticos são microrganismos vivos podendo conter bactérias totalmente conhecidas e quantificadas ou culturas bacterianas não conhecidas. Os principais microrganismos bacterianos considerados probióticos são aqueles dos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, além de *Escherichia*, *Enterococcus* e *Bacillus*

(MORAIS e JACOB, 2006). Os probióticos promovem o equilíbrio da microbiota intestinal e melhoram o ganho de peso e a eficiência alimentar dos animais, justamente por competirem com os patógenos no intestino, minimizando infecções intestinais e lesões do vilão, permitindo a regeneração da mucosa intestinal (SATO *et al.* 2002).

Os prebióticos proporcionam efeito benéfico ao hospedeiro por estimular seletivamente o crescimento e/ou metabolismo de um limitado grupo de bactérias no cólon, como os probióticos (GIBSON *et al.* 1995). Eles atuam estimulando o crescimento da microbiota benéfica, propiciando o desenvolvimento de uma flora e mucosa intestinal saudáveis. Os prebióticos mais estudados como aditivos na alimentação animal são os oligossacarídeos, especialmente os mananoligossacarídeos, os frutoligossacarídeos e os glucoligossacarídeos (GODOI *et al.* 2008).

Simbiótico é o termo utilizado para a associação de probiótico e prebiótico, ou seja, componentes da microbiota intestinal e substâncias prebióticas específicas fornecidos em um só produto, estimulando o desenvolvimento e a atividade desta mesma microbiota, permitindo potencializar o efeito de ambos os componentes (PELÍCIA *et al.* 2004).

Para Lima *et al.* (2007), o uso de enzimas exógenas para reduzir os custos das rações, representa, sem dúvida, uma das alternativas mais versáteis para auxiliar na melhoria da rentabilidade da produção. As pesquisas com enzimas têm demonstrado a importância dessas substâncias para reduzir o efeito negativo dos fatores antinutricionais e melhorar a eficiência alimentar. Durante o processo de conversão dos nutrientes da dieta em produtos animais ocorrem perdas consideráveis, mesmo os animais estando em condições ideais de produção, com alimentação de qualidade e manejo adequado. É possível lançar mão de diversas manipulações nutricionais no sentido de reduzir a excreção de nutrientes, sendo que as medidas mais eficientes

incluem o balanceamento das rações de maneira que atenda mais precisamente às exigências do animal, a adição de aminoácidos puros, reduzindo simultaneamente o nível de proteína bruta da dieta e, por fim, a adição de enzimas à dieta. Em trabalho, Garcia (2003) cita que em torno de 25% das necessidades diárias de nitrogênio podem ser utilizadas para a síntese de enzimas endógenas.

1.3.1 *Enzimas exógenas utilizadas na alimentação animal*

Enzimas são proteínas com capacidade catalítica de alta especificidade, podendo ser obtidas através de várias fontes, sendo a mais utilizada industrialmente as produzidas por microrganismos (HANNAS e PUPA, 2007). Com o auxílio de bactérias e fungos, é produzida uma grande quantidade de enzimas que degradam várias formas de amido, açúcares, proteínas, fósforo e celulose para uma absorção mais eficiente no trato digestivo (CAMPESTRINI *et al.* 2005)

Segundo Zanella (2001), no mercado de nutrição animal existem três tipos de enzimas:

1. Enzimas para alimentos com baixa viscosidade (milho, sorgo e soja), como as amilases, α -galactosidases, pentosanases e pectinases (EMBRAPA, 1999);
2. Enzimas para alimentos de alta viscosidade (trigo, centeio, cevada, aveia, triticales e farelo de arroz) como as xilanases e arabinoxilanases (EMBRAPA, 1999; CAMPESTRINI *et al.* 2005; OLIVEIRA e MORAES, 2007; TAVERNARI *et al.* 2008);
3. Enzimas para degradar o ácido fítico dos grãos vegetais, como as fitases (EMBRAPA, 1999; PANDEY *et al.* 2001).

Quanto ao mecanismo de ação das enzimas exógenas, Soto-Salanova *et al.* (1996) relatam através de estudos quatro modos principais:

1. Provocando a ruptura das paredes celulares das fibras, exemplo: arabinoxilanases, xilanases e outras hemicelulases (OLIVEIRA e MORAES, 2007; TAVERNARI *et al.* 2008; PALOHEIMO *et al.* 2011);

2. Reduzindo a viscosidade, devido à fibra solúvel, na digesta do intestino proximal, exemplo: xilanases, β -glucanases e pectinases (COWIESON, 2005; OLIVEIRA e MORAES, 2007; TAVERNARI *et al.* 2008);

3. Degradando proteínas e reduzindo os efeitos dos fatores antinutricionais, tais como proteases e fitases (EMBRAPA, 1999; PANDEY *et al.* 2001);

4. Suplementando a produção de enzimas endógenas do animal, cuja ação é mais importante em animais jovens, exemplo: amilases (EMBRAPA, 1999; PANDEY *et al.* 2001).

É importante ressaltar que, independente de qual seja o mecanismo catalítico, depois de ocorrida a reação do substrato com a enzima, esta se separa do alvo, tornando-a livre para novas reações.

Todas as enzimas aplicadas na nutrição animal são hidrolases, que são usadas diretamente como aditivos alimentares, com o objetivo de suplementar a atividade digestiva endógena do animal hospedeiro (CAMPESTRINI *et al.* 2005). As hidrolases utilizam água para fragmentar a molécula alvo em outras duas (UENOJO e PASTORE, 2007), sendo que um dos fragmentos resultantes da reação receberá um grupo OH⁻ enquanto o outro receberá um próton de hidrogênio (H⁺) que serão agregados a suas estruturas químicas.

Para Slominski (2011), entre os benefícios para utilização de enzimas nas formulações de rações estão: a liberação de fósforo disponível a partir da hidrólise do fitato, visto que o fósforo é um mineral não renovável e que vincula custos à alimentação; a degradação da parede celular e dos PNA com consequente

aproveitamento de energia; bem como a eliminação de fatores antinutricionais dos componentes da dieta.

- Carboidrases

Os polissacarídeos não amiláceos, ou simplesmente fibras, principais constituintes da parede celular dos alimentos de origem vegetal, não podem ser digeridos ou são com baixa eficiência pelos monogástricos, devido à natureza de suas ligações, sendo resistentes à hidrólise no trato digestivo. A dificuldade na digestão da fibra, além de reduzir a energia do alimento, pode prejudicar a utilização de todos os outros nutrientes. Isto ocorre principalmente quando o tipo de fibra do alimento é solúvel, ou seja, tem grande capacidade de absorver água e formar substância gelatinosa no trato intestinal. A fibra solúvel é composta pela hemicelulose, a qual é feita, principalmente, pelos β -glucanos na cevada e aveia e arabinosilanos no trigo, centeio e farelo de arroz, e pela pectina nas frutas e hortaliças (EMBRAPA, 1999; COWIESON, 2005; BERNAUD e RODRIGUES, 2013).

As carboidrases, principalmente as xilanases, têm sido utilizadas na alimentação animal para hidrolisar os polissacarídeos não amiláceos, aumentando a digestibilidade de alimentos como a cevada, o trigo, o centeio, a aveia e o triticale (CONTE *et al.* 2003). Bactérias, fungos e algumas leveduras são capazes de sintetizar enzimas para a hidrólise de materiais lignocelulósicos, podendo estes ser aeróbios ou anaeróbios, mesófilos ou termófilos (HÖLKER e LENZ, 2005). Trabalhos recentes têm demonstrado respostas positivas quanto à digestibilidade de nutrientes e ao desempenho de suínos e aves alimentados com rações à base de milho e soja, quando estas foram suplementadas com enzimas pectinases e α -galactosidases.

A produção de amilases pelo pâncreas nas primeiras fases dos animais monogástricos é baixa, dificultando o desenvolvimento satisfatório destes, que tem a digestão do amido prejudicada. Essa informação deve ser levada em consideração já que a base da alimentação desses animais de produção em qualquer idade é o milho e este possui alto teor de amido (LIMA *et al.* 2007; PIOVESAN *et al.* 2011).

- Proteases

Nos últimos anos, com o aumento constante do preço do farelo de soja, utilizado como fonte proteica na alimentação das aves, houve a necessidade de alternativas que melhorem seu valor nutricional. Além do mais, a proteína é considerada o ingrediente mais caro da ração. Com isso, a adição de proteases exógenas na dieta pode melhorar o valor nutricional através da hidrólise de certos tipos de proteínas que resistem ao processo digestivo (TORRES *et al.* 2003). Com isso, há a melhora no desempenho e rendimento da carcaça, sendo seus efeitos mais evidentes quando as dietas são formuladas com baixas taxas de aminoácidos essenciais ou de proteína total, de forma a minimizar as excreções de nitrogênio (WANG *et al.* 2006). Os alimentos alvos dessas enzimas são os subprodutos da soja e glúten.

- Lipases

As lipases, igualmente chamadas de triacilglicerol lipase, são enzimas que fazem parte do grupo das serina hidrolases, tendo como substrato, triglicerídeos. Essas enzimas agem na hidrólise das ligações ésteres-carboxílicas de acilgliceróis, formando ácidos graxos e glicerol. Estas enzimas são produzidas em quantidades satisfatórias pelo pâncreas dos animais, porém a inclusão de enzimas exógenas em dietas para animais

monogástricos reduz a síntese de enzimas endógenas, conseqüentemente, o organismo teria uma maior quantidade de aminoácidos para a síntese tecidual (LIMA *et al.* 2007).

1.3.1.1 Fitases

Como já mencionado anteriormente, os alimentos vegetais, que constituem a base da ração dos animais monogástricos, contém baixa quantidade de P disponível para a absorção, estando grande parte desse elemento na forma de fitato, que é eliminado nas fezes. Sendo assim, se faz necessária a suplementação de fósforo inorgânico na dieta dos animais, aumentando o custo da ração. Diante disso, a adição de fitases exógenas na alimentação animal surge como alternativa para esses percalços.

As fitases (hexafosfato de mio-inositol fosfohidrolases) são amplamente difundidas na natureza podendo ser derivadas de animais, plantas e microrganismos. No entanto, a maioria dos trabalhos científicos tem sido focados em fitases microbianas, especialmente as produzidas por fungos filamentosos (SHIEH e WARE, 1968; PAIK, 2003; VATS e BANERJEE, 2004; BHAVSAR *et al.* 2011). As fitases catalisam a reação de desfosforilação do ácido fítico (fitato) em ésteres de fosfato de mio-inositol menores e fósforo inorgânico, como mostra a Figura 1.7 (LEI e PORRES, 2003).

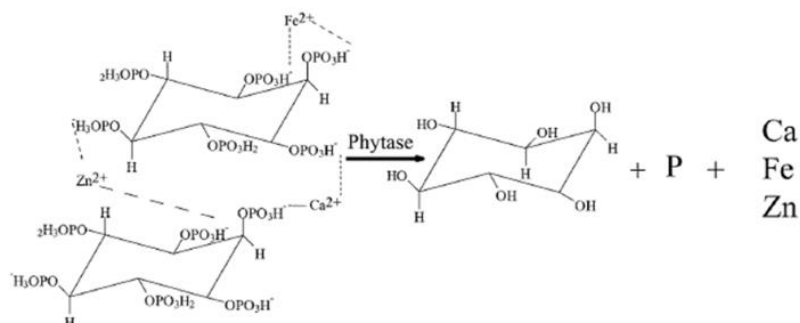


Figura 1.7. Hidrólise do fitato pela fitase em inositol, fosfato, e outros elementos divalentes. O fitato é mio-inositol-1,2,3,4,5,6-di-hexaquis fosfato que contém aproximadamente de 14 a 28% de fósforo e 12-20% de cálcio (LEI e PORRES, 2003).

A teoria mais aceita atualmente é que as fitases exógenas hidrolisam o fitato em segmentos anteriores ao duodeno, resultando em fosfatos de mio-inositol menores, os quais têm uma capacidade reduzida (em relação ao IP6) para quelar e indisponibilizar o Ca^{2+} . Esse mecanismo, então, permitiria que maiores concentrações de Ca e P estejam possivelmente disponíveis para serem absorvidas ao passar pelo intestino delgado (LUTTRELL, 1993).

Partindo das informações demonstradas na Tabela 1.3 e que as fitases ácidas agem com máxima eficiência catalítica no papo, proventrículo e moela, essas dispõem de em torno de 55% do tempo total de permanência da digesta no trato digestório para atuar no fitato proveniente da dieta.

Tabela 1.3. Duração média do tempo de trânsito da ingesta nos diferentes compartimentos do trato gastrointestinal do frango.

Segmento do trato digestório	Tempo* de permanência da digesta
Papo	50
Proventrículo e moela	90
Duodeno	5 a 8
Jejuno	20 a 30
Íleo	50 a 70
Reto	25

*Tempo em minutos, Extraído de GAUTHIER, (2002).

No entanto, não se pode ignorar a possibilidade de formação de complexos durante a passagem da ingesta pelo papo, pois é provável que o pH 5,5 admita certa condição de ação antinutricional do fitato, podendo diminuir, no proventrículo e moela, a eficiência das fitases ácidas suplementadas na ração.

Segundo o site *Brenda* (2014) as fitases são classificadas em 3-fitases (EC 3.1.3.8), 5-fitases (EC 3.1.3.72) e 6-fitases (EC 3.1.3.26), baseadas na posição específica da hidrólise inicial do fitato (KONIETZNY e GREINER, 2002).

As fitases podem ser divididas em ácidas (com pH ótimo entre 2,5 e 6,0) e alcalinas (com pH ótimo entre 6,0 e 8,0) (GREINER *et al.* 2001).

Baseado nas suas diferenças estruturais e catalíticas, as fitases foram subdivididas em classes: histidina fosfatase ácida (HFA), fitase β -hélice (FBH), fosfatase ácida “purple” (FAP) e proteína tirosina fosfatase (PTP) (LEI e PORRES, 2003; MULLANEY e ULLAH, 2003).

A classe HFA é a que possui maior número de representantes, sendo caracterizada pela presença de uma sequência conservada de aminoácidos no sítio ativo (RHG_XR_XP) e dois resíduos cataliticamente ativos (His³⁶¹Asp³⁶²). As demais classes (FBH, FAP e PTP) não possuem a sequência conservada no sítio ativo e/ou o dipeptídeo cataliticamente ativo (LEI e PORRES, 2003).

A FBH tem sido isolada principalmente de microrganismos do gênero *Bacillus* e tem sua atividade máxima em pH de 6,0 a 8,0 (FU *et al.* 2008). Esse tipo de fitase tem substrato o complexo fitato de cálcio, ou seja, são capazes de hidrolisar o Ca ligado ao fitato (SHIN *et al.* 2001).

Greiner *et al.* (2002), citam que a hidrólise do fitato pela fitase é um processo em série, portanto, cada intermediário fosfatado do mio-inositol é liberado do sítio ativo da enzima mas pode ser substrato para a hidrólise seguinte.

Teoricamente, a hidrólise enzimática completa do fitato gera uma série de fosfatos de mio-inositol menores (IP6 \rightarrow IP5 \rightarrow IP4 \rightarrow IP3 \rightarrow IP2 \rightarrow IP1), por meio de uma cadeia de reações de desfosforilação, para produzir o mio-inositol e seis P inorgânicos, demonstrada na Figura 1.8. Entretanto, o mecanismo de catálise e o grau de

desfosforilação do ácido fítico são variáveis, pois dependem de tipos de fitases diferentes (GREINER *et al.* 2002).

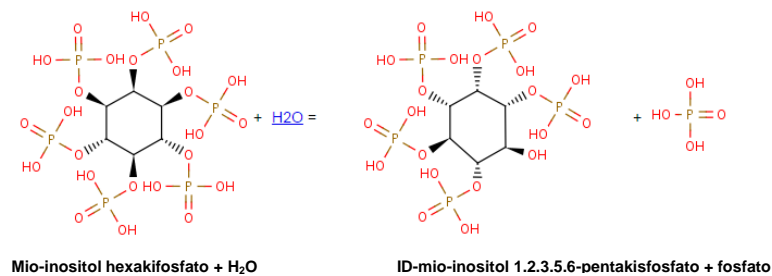


Figura 1.8. Reação de hidrólise do fitato pela fitase (Brenda Enzymes, 2014).

Greiner *et al.* (2002) relatam que a via de hidrólise completa do fitato foi elucidada apenas em casos raros, por fitases isoladas de vegetais como centeio, cevada, aveia, trigo, arroz, tremoço, broto de feijão, pólen de lírio e as produzidas pelos microrganismos *Saccharomyces cerevisiae*, *Pseudomonas*, *Paramecium*, *Escherichia coli* e *Bacillus subtilis*.

De acordo com Lei e Porres (2003), as fitases têm sido principalmente, se não exclusivamente, utilizadas como suplemento alimentar em dietas para aves, suínos e em certa medida, para os peixes. Vários experimentos laboratoriais e pesquisas de campo mostraram que 500 a 1000 unidades de fitases podem substituir aproximadamente 1 g de suplemento de fósforo inorgânico e reduzir a excreção de fósforo total em 30 a 50%. Os autores citam também relatos do potencial de fitases na melhora da nutrição mineral dos seres humanos. No entanto, há a necessidade de novas pesquisas para determinar a dose adequada de administração de fitases para nutrição humana. Além disso, Greiner e Konietzny (1996) citam que as fitases podem ser utilizadas para produzir novos derivados de ácido fítico e também melhorar a fertilidade do solo e absorção de nutrientes pelas plantas (LEI e PORRES, 2003).

A produção comercial de fitases, Tabela 1.4, para uso na alimentação animal é mais facilmente obtida através do uso de cultura de microrganismos, principalmente fungos do gênero *Aspergillus* (SEBASTIAN *et al.* 1998), através de técnicas de recombinação de DNA. Este processo envolve fermentação, extração, separação e purificação do produto. NELSON *et al.* (1968) foram os primeiros a adicionar fitases produzidas por uma cultura de *Aspergillus ficuum* a uma ração líquida à base de soja, em dietas de frango de corte, obtendo um aumento linear no ganho de peso e no conteúdo de cinzas nos ossos, concluindo que as aves conseguiram utilizar o fósforo fítico tão bem quanto o fósforo inorgânico. Apesar disso, somente no final da década de 80 a produção de fitases atingiu escala comercial, reduzindo seu custo e tornando viável sua utilização nas dietas de animais monogástricos (CONTE *et al.* 2002).

Tabela 1.4. Fitases comerciais encontradas no mercado mundial.

PRODUTO	MICROORGANISMO	CULTIVO	EMPRESA
Natuphos	<i>A.niger</i>	Líquido	BASF
Allzyme phytase	<i>A.niger</i>	Sólido	Alltech
Phyzyme	<i>A.oryzae</i>	Líquido	Fermic
Ronozyme	<i>A.oryzae</i>	Líquido	Novozymes
Amaferm	<i>A.oryzae</i>	Líquido	Biozyme
Finase	<i>A.awamori</i>	Líquido	AB Enzymes
Bio-Feed Phytase	<i>P.lycii</i>	Líquido	DSM

(STEFAN *et al.* 2005; CAO *et al.* 2007; SINGH *et al.* 2011)

1.3.1.2 Xilanases

As hemiceluloses são heteropolissacarídeos ramificados, formados principalmente por pentoses (xilose, raminose e arabinose), hexoses (glicose, manose e galactose), ácidos urônicos (ácidos 4-O-metilglucurônico e galacturônico) e radicais

acetila (DEMIRBAS *et al.* 2011). Representam de 15 a 35% da biomassa vegetal e tem como função unir quimicamente a celulose e a lignina, além de interagir covalentemente com a pectina, resultando em um material flexível, porém altamente resistente a espécies químicas (GIRIO *et al.* 2010). As hemiceluloses podem representar até 40% do peso seco de resíduos lignocelulósicos e estão presentes em todas as camadas da parede celular das plantas. Sua degradação é realizada por hemicelulases como as xilanases, que hidrolisam estes heteropolissacarídeos. As hemiceluloses são divididas em xilanas, mananas, galactanas e galacturonanas (AWAFO, 1997), que apresentam suas unidades monoméricas unidas por ligações do tipo 1,3, 1,4 e 1,6 (SZENGYEL, 2000). As maiores proporções ficam a cargo das xilanas, que consistem em moléculas de xilose unidas por ligação β -1,4 (DAMASO *et al.* 2004).

A xilana é o principal componente das hemiceluloses e o segundo mais abundante polissacarídeo natural existente, perdendo apenas para a celulose (WOODWARD, 1984; COLLINS *et al.* 2005; SARATALE *et al.* 2012). Encontra-se localizada entre a molécula de lignina e o conjunto de fibras de celulose e é um polímero linear com a cadeia principal composta por resíduos de β -xilopiranosose unidos através de ligação glicosídica do tipo β (1-4), podendo apresentar várias substituições. Assim, xilanas, galactomananas, arabino-xilanas, arabinoglucurono-xilanas, arabino-4-metil-glucurono-xilana, 4-metil-glucurono-xilanas, galactosanas, galacto-arabinoglucurono-xilana, são diferentes denominações das hemiceluloses em função da estrutura química que as compõem (BIELY, 1985; DA SILVA *et al.* 1997; POLIZELI *et al.* 2005).

A completa hidrólise requer a ação de um sistema de enzimas com diferentes especificidades e modos de ação denominado sistema xilanolítico. A heterogeneidade e complexidade da xilana resultam em uma abundância de xilanases, diferindo quanto as

A produção de xilanases por microrganismos é principalmente, por bactérias e fungos filamentosos, havendo poucos relatos sobre a utilização de leveduras. De uma forma geral, as xilanases de origem microbiana possuem uma composição proteica simples e massa molecular entre 8 e 145 kDa. A faixa ótima de temperatura para produção de endo-xilanases, por bactérias ou fungos, varia de 40 a 60°C, sendo as bactérias mais conhecidas por produzirem xilanases termoestáveis. Em geral, as xilanases, provenientes de diferentes microrganismos são estáveis na faixa de pH de 3 a 10, apresentando melhor produção enzimática obtida em pH entre pH 4 e 7 (KULKARNI *et al.* 1999).

Os fungos filamentosos destacam-se na secreção dessas enzimas no meio em que estão inseridos e seus níveis de secreção são elevados quando comparados aos de outros microrganismos (BISWAS *et al.* 2010; POLIZELI *et al.* 2005).

O interesse na produção de xilanases deve-se a sua grande potencialidade de aplicação industrial, com diversidade na indústria de alimentos, como no beneficiamento da qualidade de produtos de padaria como massas, pães, biscoitos e tortas; como espessantes, substituintes de gorduras e aditivos. Ainda participam na extração de café, pigmentos e óleos, assim como na fabricação de sucos, vinhos e cervejas. Xilanases também estão envolvidas produção de biocombustíveis, indústrias de celulose e papel, têxtil e na produção de fármacos (WOODWARD, 1984; WONG *et al.* 1988; DA SILVA *et al.* 1997; KULKARNI *et al.* 1999; COLLINS *et al.* 2005; FLANDER *et al.* 2008). Além disso, as xilanases são componentes de formulação de ração animal, juntamente com glucanases, pectinases, celulases, proteases, amilases, fitases, galactosidases e lipases (POLIZELI *et al.* 2005).

1.4 Cultivo em Estado Sólido na Produção de Enzimas

O cultivo em estado sólido (CES) envolve o crescimento de microrganismos, geralmente fungos filamentosos em meio sólido insolúvel, o qual age como suporte físico e/ou fonte de nutrientes. A quantidade de água no sistema é suficiente para garantir o desenvolvimento e as atividades metabólicas do microrganismo. Os espaços entre as partículas sólidas contêm uma fase gasosa contínua e um mínimo de água, podendo haver gotículas, e películas na superfície destas. Porém a fase aquosa entre as partículas é descontínua e a maior parte do inter-espaço é preenchido pela fase gasosa. A maior parte da água no sistema é absorvida no interior das partículas sólidas (DURAND *et al.* 1988; PANDEY, 1992; PANDEY *et al.* 2000; MITCHELL *et al.* 2005; RODRIGUEZ e SAROMÁN, 2005; RANI *et al.* 2009). Na Tabela 1.5 podem-se visualizar alguns exemplos de fitases e xilanases de origem microbianas produzidas por CES.

Tabela 1.5a. Exemplos na literatura de produção de fitases fúngica por CES.

MICROORGANISMO	SUBSTRATO	ATIVIDADE FITASE (U/g)*	REFERÊNCIAS
<i>Aspergillus niger</i> FS3	Polpa cítrica	93	Spier <i>et al.</i> 2011
<i>Aspergillus niger</i>	Farelo de trigo	154	Bhavsar <i>et al.</i> 2010
<i>Pseudomonas</i> AP-MSU	Farinha de mandioca	73	Esakkiraj <i>et al.</i> 2010
<i>Aspergillus ficuum</i>	Resíduo de canola	56,43	Costa <i>et al.</i> 2009
<i>Malbranchea sulfurea</i>	Farelo de trigo	2,84	El-Gindy <i>et al.</i> 2009
<i>Aspergillus niveus</i>	Farelo de trigo	3,4	El-Gindy <i>et al.</i> 2009
<i>Sporotrichum thermophile</i> TLR50	Resíduo de gergelim	180	Singh e Satyanarayana 2008
<i>Aspergillus niger</i>	Resíduo de oliveira	58	Vassilev <i>et al.</i> 2007
<i>Aspergillus oryzae</i>	Soja e arroz	16	Chantasartrasamee <i>et al.</i> 2005
<i>Rhizomucor pusillus</i>	Farelo de trigo	9,18	Chadha <i>et al.</i> 2004
<i>Rhizopus oligosporus</i>	Resíduo de coco	14,29	Sabu <i>et al.</i> 2002
<i>Aspergillus niger</i> W2	Polpa Cítrica	7,74	Silva <i>et al.</i> 2003

*U/g de sólido seco, Extraído e modificado de SALMON, (2011).

Tabela 1.5b. Exemplos na literatura de produção de xilanases fúngica por CES.

MICROORGANISMO	SUBSTRATO	ATIVIDADE XILANASE (U/g)*	REFERÊNCIAS
<i>Aspergillus awamori</i>	Bagaço de cana	2.500	Lemos <i>et al.</i> 2001
<i>Aspergillus fischeri</i>	Farelo de trigo	1.024	Senthilkumar <i>et al.</i> 2005
<i>Aspergillus niger</i>	Farelo de trigo e Palha de trigo	2.500	Deschamps <i>et al.</i> 1985
<i>Aspergillus niger</i> LPB 326	Bagaço de cana e Farelo de soja	3.099	Maciel, 2006
<i>Aspergillus ochraceus</i>	Palha de trigo	428	Biswas <i>et al.</i> 1988
<i>Thermoascus aurantiacus</i>	Bagaço de cana	2.700	Souza <i>et al.</i> 1999
<i>Melanocarpus albomyces</i> IIS-68	Palha de trigo	7.760	Narang <i>et al.</i> 2001
<i>Thermomyces lanuginosus</i> D2W3	Palha de sorgo	48.000	Sonia <i>et al.</i> 2005

*U/g de sólido seco, Extraído e modificado de MACIEL, (2006).

Uma alternativa para a redução dos custos é a utilização de resíduos agroindustriais como substratos na CES para a produção da enzima. No Brasil, é produzida diariamente uma grande variedade de resíduos agroindustriais e agrícolas, como os provenientes da indústria de papel e celulose, derivados da madeira (serragem), usinas de açúcar e álcool (bagaço de cana e palha) e, os gerados pelas culturas de trigo (palha e farelo de trigo), de milho (casca e sabugo), arroz (cascas), laranja (bagaço), dentre outros (RAMOS, 2003).

O cultivo em estado sólido se sobressai quando comparado com o cultivo submerso, devido à possibilidade do uso de resíduos agroindustriais e agrícolas, os quais baixam o custo do sistema. Além disso, destaca-se por eficiente produção de enzimas, reduzido consumo de água, o que permite um menor volume de cultivo no reator, e a simulação do habitat natural dos microrganismos, principalmente dos fungos filamentosos. Porém, a heterogeneidade da composição do substrato e a dificuldade de

controle do processo, principalmente quanto à remoção do calor metabólico gerado pelo crescimento do microrganismo, são algumas das desvantagens. Segundo Mitchell *et al.* (2005) a temperatura interna do biorreator pode apresentar-se em até 20°C acima da temperatura de incubação; o que pode desnaturar as enzimas ao final do processo de cultivo. Outro fator refere-se à formação de gradientes de umidade e concentração de metabólitos, fatores estes que implicam diretamente na ampliação de escala (COUTO e SANROMÁN, 2006; SINGHANIA *et al.* 2009).

A produção de enzimas fúngicas por CES se mostra mais vantajosa pela facilidade de extração da enzima do ponto de vista industrial, já que os fungos sintetizam enzimas extracelulares, que são lançadas em um substrato externo e, portanto, elimina-se a etapa de rompimento celular para extração de enzimas intracelulares. As hifas são capazes crescerem na superfície das partículas e penetrar nos espaços entre elas, colonizando os substratos sólidos (HÖLKER e LENZ, 2005). Na Figura 1.10, estão representados esquematicamente alguns dos processos que ocorrem durante a CES por fungos filamentosos.

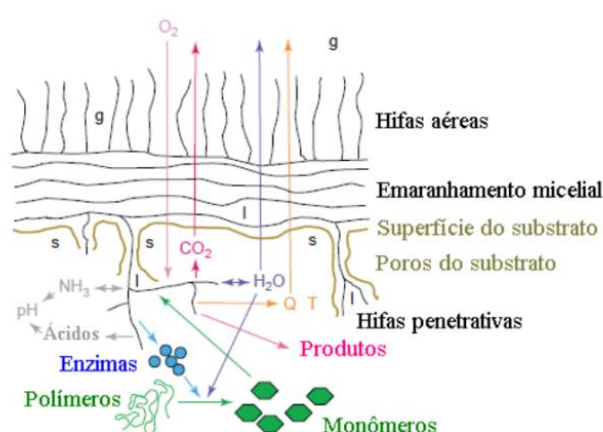


Figura 1.10. Representação esquemática de alguns processos de micro-escala que ocorre durante a CES (HÖLKER e LENZ, 2005).

Após a germinação de esporos, há o desenvolvimento do micélio, onde são produzidas hifas, podendo essas ser aéreas ou penetrativas em relação ao substrato. Os espaços formados entre o micélio e o substrato são tomados pelo líquido e água, e os espaços entre as hifas aéreas com ar e vapores metabólitos. O pH do meio pode sofrer influência da liberação de ácidos carbônicos e troca de amônia. As enzimas hidrolíticas, produzidas pelo micélio, difundem para a matriz sólida e catalisam a degradação das macromoléculas em unidades menores, que são absorvidas pelo fungo servindo como nutrientes; o O_2 é consumido e CO_2 , H_2O , calor e importantes metabólitos são produzidos durante o cultivo (HÖLKER e LENZ, 2005).

Dentre os fungos filamentosos, os termofílicos têm se destacado na produção de enzimas, uma vez que as enzimas sintetizadas têm boa estabilidade térmica, atividade ótima a altas temperaturas e taxas de hidrólises. Geralmente apresentam-se mais resistentes a agentes detergentes e às enzimas proteolíticas; são estáveis em amplas faixas de pH, podendo ser usadas em diferentes tipos de materiais e processos (HAKI, 2003; GOMES *et al.* 2007). Também há vantagens durante o processo fermentativo, como redução da contaminação por microrganismos mesófilos indesejáveis, possibilidade de trabalhar em temperaturas mais elevadas, favorecendo a solubilidade de substratos e produtos, e aumentando as taxas de reação por redução da viscosidade e por aumento do coeficiente de difusão dos substratos (GOMES *et al.* 2007).

A adaptação de um determinado microrganismo à termofilia envolve o ajuste da membrana citoplasmática, das proteínas e do DNA às temperaturas acima da faixa mesofílica (GOMES *et al.* 2007).

As enzimas produzidas por estes microrganismos apresentam características de grande importância industrial, como resistência a solventes orgânicos e a temperaturas

mais altas, sendo estáveis e ativas em temperaturas superiores à temperatura ótima para o crescimento do microrganismo (SABOTO *et al.* 1999).

1.5 Aporte Tecnológico às Enzimas

O principal desafio na produção de proteínas e enzimas comerciais é o de proteger a sua estabilidade em solução aquosa. A água presente nos extratos enzimáticos aquosos brutos, além de ocupar espaço, facilita uma variedade de inconvenientes como a possibilidade de contaminação por microrganismos e degradações químicas e físicas durante as etapas de purificação, transporte, armazenamento e aplicação (NAMALDI *et al.* 2006; COSTA-SILVA, 2010). Sendo assim, formulações enzimáticas desidratadas apresentam vantagens em relação aos extratos enzimáticos aquosos, proporcionando aumento da vida útil e praticidade no manuseio, mesmo à temperatura ambiente (LIAO *et al.* 2003), pois a remoção de água fracamente ligada reduz o movimento livre das proteínas, minimizando mudanças conformacionais e desnaturação (BELGHITH *et al.* 2001; SAMBORSKA *et al.* 2005; NAMALDI *et al.* 2006 ANANDHARAMAKRISHNAN *et al.* 2007; SLOTH *et al.* 2008). Quanto mais uma enzima consegue manter o balanço iônico correspondente ao seu pH ótimo, melhor a preservação de suas funções biocatalíticas, sendo assim, a desidratação é considerada satisfatória quando as moléculas de água são retiradas de maneira que a estrutura tridimensional das moléculas permaneça a mais intacta possível (AEHLE, 1990; Ó'FAGÁIN, 1997). Neste contexto, as técnicas de secagem por liofilização e *spray drying* têm sido estudadas.

A liofilização é um método clássico de elaboração de proteínas desidratadas, sendo considerada uma operação branda, resultando em um produto de alta qualidade e baixa deterioração. O material, previamente congelado, é desidratado por sublimação, seguida pela dessorção, empregando-se baixas temperaturas de secagem a pressões

reduzidas. No entanto, a desvantagem da liofilização está associada ao elevado custo da técnica, devido ao congelamento, à redução da pressão, e à longa duração do processo, e só é aconselhável a produtos com alto valor agregado. Além disso, o custo do equipamento e dos acessórios é alto (LOMBRAÑA e IZKARA, 1996; RATTI, 2001; SCHERSCH *et al.* 2010).

A secagem por atomização, mais conhecida por *spray drying*, surge como alternativa à liofilização, sendo uma operação amplamente utilizada em diversas aplicações, tais como na indústria de alimentos, para produção de proteína de leite, ovos, sucos, café instantâneo, sopas e aromas em pó, e na indústria farmacêutica, na produção de antibióticos, enzimas, vitaminas e suspensões sólidas, bem como na encapsulação de aromas e sabores voláteis, dentre várias outras aplicações (ESTEVES, 2006; ANANDHARAMAKRISHNAN *et al.* 2007). *Spray drying* é uma técnica através da qual um produto líquido é atomizado numa corrente controlada de gás quente que promove a evaporação do solvente, obtendo-se pó em curtos intervalos de tempo. O gás usado é geralmente ar ou, mais raramente, um gás inerte como o nitrogênio. O líquido inicial de alimentação do pulverizador pode ser uma solução, uma emulsão ou uma suspensão. Os pós obtidos apresentam-se sem aglomerados, geralmente esféricos, e dependendo do material inicial e das condições operacionais de alimentação, variam de muito fino (10-50 μm) até partículas de grande tamanho (2-3 mm) (MASTERS, 1996; GHARSALLAOUI *et al.* 2007). A secagem por pulverização é um processo contínuo de etapa única, podendo ser resumido em quatro estágios: atomização (com bocal estacionário ou rotativo); contato do líquido pulverizado e o gás (nos sentidos co-corrente, contra-corrente ou misto); evaporação do solvente (formação do produto, secagem) e recuperação do produto (coletor) (MASTERS, 1980).

A atomização ou sistema de pulverização pode ser realizada por pressão ou por energia centrífuga e é responsável por determinar a distribuição do tamanho de partícula, área de troca térmica, trajetória e velocidade da partícula, sendo desejável uma elevada área superficial da gotícula, pois a associação da alta diferença de temperatura entre o ar quente e a gotícula resulta numa secagem muito rápida o que, juntamente com o resfriamento causado pela evaporação da água, evita o superaquecimento do interior das gotículas (GHARSALLAOUI *et al.* 2007; ROUSTAPOUR *et al.* 2009). A Figura 1.11 ilustra esquematicamente o processo de secagem em *spray dryer*.

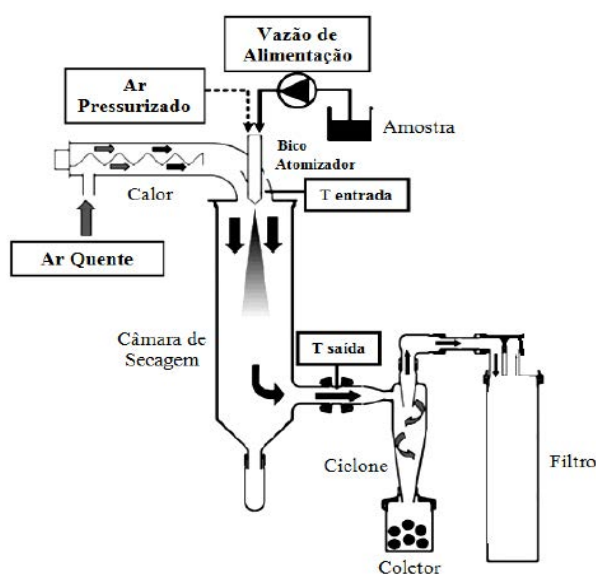


Figura 1.11. Diagrama esquemático da secagem por atomização em mini *spray dryer*. Extraído e adaptado de BÜRKI *et al.* 2011.

Na câmara de secagem, apenas uma boa área de contato não é suficiente para assegurar uma secagem eficiente, fazendo-se necessário fornecer energia para vaporização do líquido e também ar suficiente para vaporizar toda a umidade. Sendo assim, o material a ser seco entra em contato direto com o ar quente, sendo o diâmetro da câmara um parâmetro importante do processo, uma vez que diâmetros muito

reduzidos afetam a atomização, devido a deposição de produto nas paredes. Geralmente, sistemas de pulverização por bocal requerem diâmetros reduzidos em comparação aos sistemas de pulverização por disco (PERRY e GREEN, 1997; ROSA *et al.* 2003). O sistema de separação gás-sólido é responsável por captar o pó, sendo em geral utilizado ciclones.

A técnica de *spray drying*, devido à sua versatilidade operacional, permite a produção desde escalas laboratoriais da ordem de mililitros até dezenas de toneladas por hora, na indústria. Também devido à versatilidade, tornou-se o principal equipamento para a secagem de materiais que apresentam sensibilidade ao calor, como alimentos e materiais de origem biológica, em decorrência da rápida evaporação do solvente, baixo tempo de residência no equipamento e baixa temperatura da gota (ROSA *et al.* 2003; SAMBORSKA *et al.* 2005). Além disso, segundo Elversson e Millqvist-Fureby (2005), o método de secagem *spray drying* oferece algumas vantagens em comparação a outros métodos, como o controle do tamanho da partícula do pó em uma única etapa, e o domínio da morfologia e a densidade das partículas a serem formadas. No entanto, a secagem pode trazer estresse térmico e cisalhante sobre a enzima, dependendo das condições operacionais, que podem provocar danos às estruturas secundárias (alfa-hélice e beta-folha) e terciárias da cadeia peptídica, levando inclusive ao desenovelamento da enzima (MILLQVIST-FUREBY *et al.* 1999; DePAZ *et al.* 2002; NALMANDI *et al.* 2006). A desidratação das enzimas pode romper as ligações de hidrogênio que ligam cadeias peptídicas adjacentes.

Como alternativa de minimizar os efeitos indesejáveis da secagem, faz-se necessário o controle de parâmetros operacionais como temperatura de entrada e/ou saída do ar, concentração de sólidos e vazão do líquido. Visando a proteção da enzima também se faz o uso de aditivos. Os aditivos podem ser divididos entre protetores e

estabilizadores. Os protetores evitam a degradação das enzimas durante a secagem, enquanto que os estabilizadores mantem as condições ideais para a manutenção da atividade enzimática durante a estocagem (BELGHITH *et al.* 2001). Além disso, Wang e Langrish (2007) citam que os aditivos utilizados como auxiliares na secagem por *spray dryer* têm, frequentemente, uma elevada temperatura de transição vítrea em relação ao material a ser secado, reduzindo, assim, a viscosidade do produto final. Encontra-se na literatura a aplicação de diversos aditivos como a maltodextrina, os açúcares (celobiose, glicose, lactose, sucrose e trealose), os polímeros (carboximetilcelulose, celulose micro-cristalina, dextrana e goma arábica), os polióis (glicerol, manitol, propileno glicol, sorbitol e xilitol) e o dióxido de silício coloidal (Aerosil® 200), comumente aplicado na indústria farmacêutica (BELGHITH *et al.* 2001; DePAZ *et al.* 2002; SELIVANOV, 2005; NAMALDI *et al.* 2006; DOMINGUES *et al.* 2008; SLOTH *et al.* 2009; COSTA-SILVA, 2010). Em recente trabalho, Sato *et al.* (2013) utilizaram adjuvantes não convencionais tais como farelo de milho e farelo de soja, para a secagem de fitases.

Assim, testes específicos acerca dos aditivos adequados a cada função devem ser realizados para o extrato enzimático a ser seco, para haver agregação de valores, evitar alterações nas propriedades do produto, bem como a diminuição do custo do mesmo. Os adjuvantes utilizados no presente estudo não foram convencionais, sendo farelo de trigo, farelo de soja e farelo de milho, observados na Tabela 1.6.

Tabela 1.6. Composição química do farelo de trigo (FT), farelo de soja (FS) e farelo de milho (FM), expressos na matéria natural.

	MS(%)	PB(%)	EE(%)	MM(%)	P(%)	FB(%)
FT	89,19	15,28	2,32	4,67	0,84	8,45
FS	87,45	44,38	1,3	5,01	0,35	6,20
FM	88,63	8,87	4,14	1,15	0,23	2,06

Zambom *et al.* (2001); Mello *et al.* (2009). *Matéria seca (MS) Proteína bruta (PB) Extrato etéreo (EE) Matéria mineral (MM) Fósforo (P) Fibra bruta (FB)

2. OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho foi o de obter fitases e xilanases por cultivo em estado sólido e dar-lhes tratamento tecnológico por secagem em *spray dryer*, visando a manutenção de atividade das enzimas por tempo prolongado.

Os objetivos específicos são:

- a) Dentro do conjunto de fungos termofílicos da coleção do LBAM/UNESP, encontrar um que produza fitases com alta atividade por cultivo em estado sólido;
- b) Otimizar as condições de cultivo de um meio sólido composto por bagaço de cana de açúcar, farelo de trigo e bagaço de laranja, para produção de fitases;
- c) Analisar a viabilidade do uso de diferentes adjuvantes durante o processo de secagem do extrato bruto de fitases e xilanases em *spray dryer*;
- d) Selecionar os melhores adjuvantes e analisar como as condições operacionais no *spray dryer* afetam as atividades enzimáticas dos pós secos;
- f) Secar o extrato bruto em liofilizador e comparar com o extrato seco em *spray dryer*;
- g) Estudar a estabilidade da enzima seca em diferentes condições de armazenamento;

3. MATERIAIS E MÉTODOS

As atividades experimentais deste trabalho foram efetuadas no Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos e no Laboratório de Bioquímica dos Processos e Microbiologia Aplicada (LBMA), ambos no IBILCE/UNESP.

3.1 Materiais

Para a produção das enzimas fitases os fungos testados foram os termofílicos *Rhizopus* sp. e *Scopulariopsis* sp., isolados de compostagem na Controeste Ambiental, localizada em São José do Rio Preto-SP; *Chaetomium* sp. N13, *Humicola grisea* var. *thermoidea*, *Myceliophthora thermophila* F214, *Myceliophthora thermophila* I-1D3b, *Myceliophthora thermophila* M77, *Rhizomucor pusillus* e *Thermomucor indiciae-seudaticae* N31 isolados de pilhas de bagaço de cana de açúcar e o isolado de solo da Chácara Jatai, localizada em Adolfo-SP, *Lichtheimia ramosa*, *Thermomyces lanuginosus* FZ e *Thermomyces lanuginosus* SER, e também o fungo mesofílico *Aspergillus niger*.

Como substratos para o cultivo em estado sólido foram utilizados bagaço de cana de açúcar, proveniente da usina Virgolino de Oliveira, localizada em José Bonifácio-SP, farelo de trigo, adquirido no mercado local, e bagaço de laranja, fornecido pela indústria Citrosuco, localizada em Catanduva-SP. O bagaço de cana de açúcar e o bagaço de laranja foram lavados em água corrente para a retirada da terra e açúcares residuais. Após a lavagem, os bagaços foram secos a 60 °C em estufa de convecção forçada, até a obtenção de peso constante. Em seguida, o bagaço de cana de açúcar foi passado em peneira de 3 mm de abertura, para a retirada de material grosseiro. O bagaço de laranja foi triturado em moedor de disco no diâmetro de 3,5 mm.

O farelo de trigo também foi lavado em água corrente e seco em estufa a 60°C até peso constante.

Para a produção das enzimas xilanases, o microrganismo utilizado foi o fungo *Myceliophthora thermophila* I-1D3b, empregado em trabalhos anteriores do grupo e reconhecido bom produtor destas enzimas. Para o cultivo em estado sólido foram utilizados bagaço de cana de açúcar e farelo de trigo, seguindo-se procedimento descrito anteriormente.

3.2 Produção de Fitases

3.2.1 Seleção de fungos

Para encontrar um fungo com boa produção de enzimas fitases foram testados treze fungos isolados pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Bioquímica dos Processos e Microbiologia Aplicada (LBMA) do IBILCE/UNESP.

O meio de cultura utilizado nessa etapa foi o ágar fitato, composto por (g/L): ácido fítico 10; NaNO₃ 2; NH₄NO₃ 2; MgSO₄.7H₂O 0,5; KCl 0,5; ZnSO₄.7H₂O 0,1; FeSO₄ 0,05; ágar 19. Os microrganismos foram inoculados neste meio por picadura com auxílio de alça de platina.

3.2.2 Cultivo em estado sólido (CES)

3.2.2.1 Ensaio de análises

Para os ensaios de produção de fitases em cultivo em estado sólido, os microrganismos utilizados foram mantidos em ágar Batata Dextrose Ágar (BDA) à temperatura ambiente, imerso em água estéril e óleo mineral.

A primeira etapa do ensaio de cultivo consistiu no repique para reativação da cepa armazenada, com auxílio de alça de platina. Em câmara de fluxo laminar, a cepa

armazenada foi repicada para placas contendo meio de aveia e incubada a 45 °C por 48 horas. Após a formação do micélio, a superfície do meio de cultivo foi raspada com alça de platina, e os esporos transferidos da mesma forma que na etapa anterior para *erlenmeyers* contendo 50 mL de meio BDA inclinado e incubados a 45 °C por 48 horas, etapa esta denominada pré-inóculo. Posteriormente, os esporos foram suspensos com auxílio de alça de platina em solução nutriente, descrita a seguir, contados em câmara de *Neubauer* e inoculados à concentração de 10^7 esporos/grama de substrato seco.

Utilizou-se como substrato sólido a mistura (5,0 g em peso seco) de bagaço de cana de açúcar, bagaço de laranja e farelo de trigo, na proporção 1:2:2 respectivamente (p/p), à umidade de 70% (b.u.) e temperatura de 45 °C, com cultivo de 96 horas em câmara DBO. O meio de cultivo foi acondicionado em embalagens de polipropileno, com dimensões de 12 cm x 20 cm, (Figura 3.1a) e esterilizados a 121 °C por 20 minutos. A solução nutriente utilizada foi a descrita por Spier *et al.* (2010): citrato de sódio, 0,3 M contendo 0,5% de citrato de amônio, KCl 2 mM, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 5 mM, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 5 mM e 0,1% de Tween, a pH 5,0. Após o período de incubação de 96 horas, a amostra foi retirada da câmara DBO (Figura 3.1b) e adicionado 20 mL de tampão acetato de sódio a 0,05 M contendo 0,01M de NaOH e pH 5,0/grama de substrato seco, seguido por agitação por 30 minutos em agitador orbital, a 100 rpm, na temperatura de 45 °C. A suspensão foi então filtrada e centrifugada a 10000 x g por 15 minutos a 5 °C, e o sobrenadante utilizado como solução enzimática bruta.

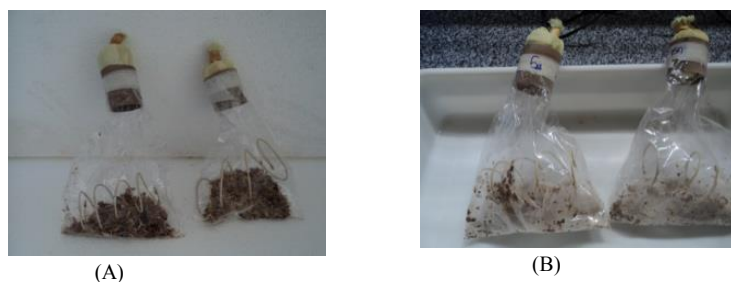


Figura 3.1. Embalagem de polipropileno para CES antes do cultivo (A) e após o período de incubação de 96 horas a 45 °C (B).

3.2.2.2 Otimização de cultivo

Os ensaios de otimização do cultivo para a produção de fitases por CES seguiu Planejamento Fatorial Multiníveis com quatro fatores: proporção de substratos (P_{sub}), tempo de cultivo (T_{cult}), temperatura de cultivo e umidade (Umid). Os fatores P_{sub} e T_{cult} seguiram três níveis e temperatura de cultivo e umidade dois níveis, apresentados na Tabela 3.1. A obtenção do EEB se deu como descrito no item anterior.

Tabela 3.1. Planejamento estatístico fatorial multiníveis para a otimização do cultivo em estado sólido para a produção de fitases.

Variáveis	Níveis		
	A	B	C
P_{sub}	1:2:1 (BC:FT:BL)	1:1:2 (BC:FT:BL)	1:2:0 (BC:FT:BL)
	Níveis		
	-1	0	1
T_{cult} (horas)	84	96	108
T°C	40		50
Umid	70		75

BC= bagaço de cana de açúcar; FT= farelo de trigo; BL= bagaço de laranja. P_{sub} = proporção de substrato; T_{cult} = tempo de cultivo; T°C= temperatura de cultivo; Umid= umidade.

3.2.2.3 Obtenção de EEB para o processo de secagem

Após a seleção do fungo, os cultivos em estado sólido para a etapa de secagem foram baseadas nas condições otimizadas e foram conduzidos em embalagens de polipropileno com dimensões de 25 cm x 30 cm, com 25,0 g substrato sólido da mistura de bagaço de cana de açúcar, bagaço de laranja e farelo de trigo na proporção 1:2:2 (p/p), à umidade de 70% (b.u.) e temperatura de 45 °C, por 96 horas em câmara DBO. A solução nutriente foi a mesma descrita anteriormente. Após o período de incubação de 96 horas, a amostra foi retirada do climatizador DBO e adicionado 350 mL de tampão acetato de sódio 0,05 M contendo 0,01 M de NaOH, pH 5,0 por 25 grama de substrato seco, seguido por agitação por 30 minutos em agitador orbital, a 100 rpm, na temperatura de 45 °C. A suspensão resultante foi filtrada em tecido *voil*, congelada em

freezer doméstico na temperatura de -12 °C e utilizada como extrato enzimático bruto (EEB).

3.2.3 *Determinação de atividade enzimática*

A atividade das fitases foi determinada pelo método colorimétrico que fornece o fosfato liberado de fitato devido à atividade enzimática (TAUSSKY e SHORR, 1953; HEINONEN e LAHTI, 1981). Neste método, 250 µL de tampão acetato de sódio a 100 mM e pH 5,0 foi adicionado a 100 µL de ácido fítico a 10 mM, preparado em tampão acetato de sódio a 100 mM e pH 5,0 e 50 µL do extrato enzimático. A mistura foi aquecida a 37 °C por 30 minutos, em seguida, 1,5 mL de solução de parada foi adicionado. Esta solução é composta por ácido sulfúrico (5 N), molibdato de amônio a 10 mM, e acetona, na proporção volumétrica 1:1:2. Após isso, 100 µL de ácido cítrico a 1 M foi adicionado e a mistura centrifugada a 13000 x g por 5 minutos na temperatura de 5 °C, sendo a seguir realizada leitura em espectrofotômetro a 355 nm. Para as amostras em branco, o extrato enzimático foi adicionado após a adição da solução de parada. Uma unidade de atividade enzimática é definida como a quantidade de enzimas necessárias para liberar 1 µmol de fosfato inorgânico por minuto de reação nas condições do ensaio. Posteriormente os resultados foram convertidos para U/gss (gramas de sólido seco).

A avaliação da atividade enzimática após a secagem em *spray dryer* foi realizada reconstituindo-se a suspensão a partir do pó seco, com base no teor de sólidos totais da formulação líquida. Os ensaios foram realizados em triplicata.

3.2.4 Caracterização físico-química das enzimas

Foram feitas avaliações do efeito do pH, temperatura sobre as atividades das enzimas fitases e xilanases do EEB. Para a determinação do pH ótimo a solução enzimática e o substrato foram incubados em tampões a 0,2 M de acetato de sódio (pH entre 1,0 e 5,5), citrato de sódio (pH entre 5,5 e 7,0), tris-HCl (pH entre 7,0 e 8,0), sendo as atividades da fitase e xilanase dosadas a 37 °C e 60 °C, respectivamente.

A temperatura ótima para a atividade enzimática foi obtida incubando-se a mistura de reação em temperaturas de 25 a 70 °C, nas condições de pH ótimo obtidas anteriormente.

3.2.5 Ensaios de armazenamento do EEB

O extrato enzimático bruto aquoso obtido no CES foi dividido em 25 frascos, sendo 12 amostras armazenadas sob refrigeração (4 °C), 12 congeladas (-12 °C) e 1 congelada de forma intermitente. A cada sete dias uma amostra congelada e uma refrigerada eram retiradas e a atividade das fitases determinadas. A amostra congelada de forma intermitente era descongelada para quantificação da atividade enzimática e retornada ao congelador ao final do teste, toda semana.

Com o intuito de proteger as enzimas da ação do congelamento e de proteases durante o armazenamento foram adicionados glicerol e fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF – sigla em inglês), respectivamente.

O extrato enzimático bruto aquoso obtido no CES foi dividido em 8 frascos mantidos em freezer doméstico na temperatura de -12 °C, sendo que 6 desses frascos continham além do EEB, glicerol nas proporções de 5%, 10%, 20%, 30%, 40% e 50% cada, um deles continha EEB e PMSF a 1 mM e outro apenas o EEB. A atividade da fitase das amostras foi determinada antes do congelamento, e após quinze e trinta dias no freezer.

3.2.5.1 Determinação de atividade enzimática de proteases

A atividade de proteases foi determinada de acordo com MERHEB *et al.* (2007), com modificações. A mistura da reação foi composta do substrato 0,4 mL de caseína (SIGMA-ALDRICH) 0,5% (p/v) em tampão acetato de sódio a 0,2 M e pH 5,0; 0,4 mL tampão acetato de sódio a 0,2 M e pH 5,0 e 0,2 mL de extrato enzimático. A mistura da reação foi incubada a 35 °C e ao final de 30 minutos a reação foi interrompida pela adição de 1 mL de TCA (ácido tricloroacético) 10%. As amostras foram centrifugadas a 2300 x g por 5 minutos. Um controle foi preparado, onde o TCA foi adicionado antes do extrato enzimático. Fez-se a leitura da absorbância a 280 nm. Uma unidade de atividade proteolítica (UAP) foi definida como a quantidade de enzima necessária para causar um aumento de 0,1 na absorbância a 280 nm, nas condições do ensaio. A atividade proteolítica foi calculada da seguinte maneira: $UAP/mL = (\Delta \text{ Abs } 280\text{nm} \times 10 \times \text{fator de diluição}) / (E \times t)$, onde E é o volume de enzima e t é o tempo da reação.

3.2.5.2 Quantificação do teor de proteína no EEB

Para determinar a proteína celular das amostras foi utilizado o método de Lowry modificado por Hartree (1972). Primeiramente foram preparadas as seguintes soluções: Solução A: 2 g de tartarato de sódio e potássio tetra-hidratado (7 mM), 100 g de Na₂CO₃ (0,8 M), 500 mL NaOH 1N (0,5 M) e água destilada até completar 1 litro. Solução B: 2 g de tartarato de sódio e potássio tetra-hidratado (0,07 M), 1 g CuSO₄.5H₂O (0,04 M), 10 mL de NaOH 1N e 90 mL de água destilada. Solução C: diluído 1 mL de Folim-Ciocalteu em 15 mL de água destilada. Feito isso, em tubo de ensaio foi adicionado 1 mL do EEB (item 3.2.2.1) em 0,9 mL da solução A e incubado em banho termostático por 10 minutos a 50 °C. Esfriado em temperatura ambiente por

10 minutos. Então foi adicionado 0,1 mL da solução B ao tubo de ensaio e após 10 minutos em temperatura ambiente, 3 mL da solução C foram adicionados. Então após incubação por 10 minutos em banho termostático a 50 °C a amostra esfriou por 10 minutos em temperatura ambiente. A leitura da absorbância foi realizada em 650 nm.

Foi preparada uma curva padrão de soroalbumina bovina nas concentrações de 0, 0,025, 0,05, 0,075, 0,1, 0,15, 0,2, 0,25, 0,3, 0,4 e 0,5 mg/mL. Seguiu-se o procedimento descrito anteriormente para cada uma das diluições e foi realizada a leitura da absorbância em 650 nm das mesmas.

3.3 Produção de Xilanases

3.3.1 Seleção do fungo

Para a produção das xilanases, o fungo utilizado foi o termofílico *Myceliophthora thermophila* I-1D3b, microrganismo já empregado pelo grupo de pesquisa LBMA, e produtor dessas enzimas, já descrito anteriormente por Zanelato (2011) e Casciadori (2014).

3.3.2 Cultivo em estado sólido (CES)

A primeira etapa da produção de xilanases consistiu no repique do fungo *Myceliophthora thermophila* I-1D3b em ágar de aveia para reativação da cepa armazenada, como descrito anteriormente, incubada a 45 °C por 48 horas. Em seguida a superfície do meio de cultivo foi raspada com alça de platina e os esporos transferidos, como na etapa anterior, para *erlenmeyers* contendo 50 mL de meio *Sabouraud* inclinado e incubados a 45 °C por 48 horas, etapa esta denominada pré-inóculo. Posteriormente, os esporos foram suspensos com auxílio de alça de platina

em solução nutriente, descrita a seguir, contados em Câmara de Neubauer e inoculados à concentração de 10^7 esporos por grama de substrato seco.

Como substrato sólido para xilanases foi utilizado a mistura de (25,0 g de massa seca) de bagaço de cana de açúcar e farelo de trigo, na proporção 7:3 (p/p), à umidade de 75% (b.u.) e temperatura de 45 °C, por 96 horas em câmara DBO. O meio de cultivo foi acondicionado em embalagens de polipropileno, com dimensões de 25 cm x 30 cm e esterilizados a 121 °C por 20 minutos. A solução nutriente foi composta por: sulfato de amônio (1%, v/v); MAP (monofosfato de amônio) (3 g/L); cloreto de potássio (2 g/L); $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,5 g/L); $CaCl_2$ (0.1 g/L) e Tween 80 (0,1%, v/v), ajustada a pH 5,0, sendo os três primeiros itens fertilizantes agrícolas adquiridos no comércio local. Após o período de incubação de 96 horas, a amostra foi retirada do climatizador DBO e adicionado 10 mL de tampão acetato de sódio 0,05 M, pH 5,0 por grama de substrato seco, seguido por agitação por 30 minutos em agitador orbital, a 100 rpm, na temperatura de 45 °C. A suspensão resultante foi filtrada em tecido *voil*, congelada em freezer doméstico a -12 °C e utilizada como extrato enzimático bruto.

3.3.3 Determinação das atividades enzimáticas

A atividade das xilanases foi determinada segundo Ghose (1987), com modificações, sendo os açúcares redutores, liberados pela ação enzimática a partir da reação entre 0,1 mL do extrato enzimático bruto e 0,9 mL de solução 1% (p/p) de xilana (de madeira de faia, *SIGMA-ALDRICH*), em solução tampão de acetato de sódio 0,1 M e pH 5,0. A reação foi mantida a 65 °C por 10 minutos, sendo, interrompida pela adição de 1,0 mL do reagente DNS (ácido 3-5 dinitrosalicílico) para a quantificação dos açúcares redutores liberados, segundo Miller (1959). O açúcar redutor foi quantificado por espectrofotometria a 540 nm com base em uma curva padrão de

xilose. Uma unidade de atividade enzimática foi definida, como a quantidade de enzima requerida para liberar um μmol de açúcar redutor do substrato por minuto.

A avaliação da atividade enzimática após a secagem em *spray dryer* foi realizada reconstituindo-se o pó, com base no teor de sólidos totais da formulação líquida. Essas avaliações enzimáticas foram feitas sempre no dia seguinte à secagem, tanto para as formulações líquidas como para os pós.

3.4 Ensaios de Secagem

Os extratos enzimáticos brutos utilizados nesta etapa foram os descritos nos itens 3.3.2 e 3.2.2.2. Os EEB foram previamente descongelados e em seguida misturados em um mesmo béquer, para que então as próximas etapas descritas fossem feitas com EEB contendo fitases e xilanases.

3.4.1 Determinação do teor de sólidos

As amostras foram analisadas em uma balança com lâmpada halogênia *Ohaus MB-45* (Toledo), onde o teor de umidade/sólidos foi mensurado por secagem em alta temperatura, que possui faixa de medição para umidade é de 0,01 a 100%, com precisão de leitura de 0,01%. O teor de sólidos do extrato enzimático bruto foi obtido logo após o descongelamento e a umidade dos pós imediatamente após a obtenção desses.

3.4.2 Secagem das enzimas por spray drying

Os ensaios foram realizados no secador por nebulização, *spray dryer*, modelo MSD 0,5 (Labmaq do Brasil), mostrado na Figura 3.2 dotado de bico atomizador de duplo fluido com orifício de saída de 3,0 mm e câmara de secagem cilíndrica de vidro borossilicato, com 51 cm de altura e diâmetro interno de 13 cm, sendo a coleta dos pós

em um ciclone de alumínio. A temperatura de saída e a vazão de alimentação do líquido foram controladas.

A operação foi iniciada com o aquecimento do gás de secagem, onde a temperatura de entrada do equipamento foi acondicionada à temperatura de saída. Após atingir temperatura desejada medida na saída da câmara de secagem, água destilada foi introduzida na alimentação do bico atomizador, na vazão pré-determinada para o experimento, até o equipamento entrar em estado permanente, sendo a água em seguida substituída pela amostra. Em todos os ensaios de secagem os parâmetros pressão do ar de atomização, vazão do ar de secagem e vazão do ar de atomização foram fixados em 6,5 Kgf/cm², 0,55 m³/min e 50 L/min, respectivamente. A suspensão de EEB e adjuvante foi mantida em constante agitação, à temperatura ambiente, com auxílio de um agitador magnético.



Figura 3.2. Equipamento *spray dryer* MSD 0.5.

O efeito da secagem por *spray dryer* sobre as enzimas foi analisado através da atividade residual de atividade enzimática obtida após a secagem e a umidade dos pós imediatamente após o processo.

3.4.3 *Secagem das enzimas por liofilização*

A suspensão de EEB e adjuvante foi congelado a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 horas antes do processo. O ensaio foi realizado em liofilizador modelo *ThermoScientific* RVT4104, Figura 3.3, que possui bomba de vácuo e duas armadilhas calibradas na temperatura de $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $-105\text{ }^{\circ}\text{C}$ e pressão de 0,49 mbar.



Figura 3.3. Liofilizador modelo ThermoScientific RVT4104.

3.4.4 *Extração enzimática dos pós*

A fim de encontrar a melhor forma para a extração das enzimas após as secagens, foi adicionado tampão acetato de sódio a 0,05 M e pH 5,0 às amostras pulverulentas e o teor de sólidos das formulações foram reconstituídos. Então essas

foram mantidas sob agitação constante com auxílio de agitador magnético na temperatura de 4 °C, por 3, 4, 5 e 6 horas.

Após o tempo de extração, a suspensão foi centrifugada a 10000 x g, na temperatura de 5 °C por 30 minutos e o sobrenadante utilizado como extrato enzimático.

3.5 Planejamentos Estatísticos

3.5.1 Discriminação dos adjuvantes

Os adjuvantes escolhidos foram os produtos agroindustriais farelo de soja (FS), farelo de trigo (FT) e farelo de milho (FM), todos adquiridos no comércio local. Os farelos foram triturados em moinho de facas e posteriormente peneirados nos diâmetros 0,149 mm (FT e FM) e 0,50 mm (FS).

Os adjuvantes foram imersos em tampão acetato de sódio 0,05 M, pH 5,0 por 1 hora e posteriormente, submetidos à ação de *mixer* industrial por 15 minutos. Após essas etapas, o adjuvante processado foi misturado com o EEB e a suspensão foi mantida em constante agitação, à temperatura ambiente, com auxílio de um agitador magnético, por 30 minutos, antes de ser submetida ao *spray dryer*. Uma alíquota da suspensão foi armazenada à temperatura de 4 °C.

O teste discriminativo seguiu um Planejamento Fatorial Multiníveis, com dois fatores: tipo de adjuvante (Adj) e temperatura de saída do ar de secagem ($T_{saída}$). O fator adjuvante foi estudado em três níveis e a temperatura de saída em dois níveis, como pode ser visto na Tabela 3.2.

A vazão de alimentação foi fixada em 8 mL/minuto e o teor de sólidos totais na formulação em 10% (p/p) para todos adjuvantes. Inicialmente foi ajustado o teor de sólidos do EEB com tampão acetato de sódio 0,05 M, pH 5,0, para 1,5% e completou-se o teor de sólido da formulação adicionando 8,5% de adjuvante.

Tabela 3.2. Planejamento estatístico fatorial multiníveis para a discriminação do adjuvante que proporcione maior retenção da atividade enzimática (*).

Variáveis	Níveis		
	A	B	C
Adjuvante	FS	FT	FM
	Níveis		
	-1		1
$T_{saída}$ (°C)	90		110

(*) FS= farelo de soja; FT= farelo de trigo; FM= farelo de milho

3.5.3 Ensaios de otimização das condições de secagem

Os ensaios para a otimização da condição ideal de secagem foram realizados com o farelo de soja como adjuvante, mantendo-se fixa a concentração de sólidos do extrato enzimático bruto em 1,5%. O farelo de soja foi escolhido com base nos ensaios de discriminação do adjuvante. Os ensaios de otimização foram conduzidos seguindo-se um planejamento fatorial rotacional de composto central, com seis repetições no ponto central, sendo três fatores analisados: temperatura de saída do ar de secagem ($T_{saída}$), vazão de alimentação da solução no *spray dryer* (Q_{alim}) e concentração de sólidos totais na formulação (ST). A matriz de planejamento é apresentada na Tabela 3.3.

Tabela 3.3. Planejamento estatístico fatorial multiníveis para os ensaios de otimização das condições de secagem.

Variáveis	Níveis				
	-1,68	-1	0	1	1,68
$T_{saída}$ (°C)	83	90	100	110	117
Q_{alim}	3	5	8	11	13
ST (%)	5	7	10	13	15

3.6 Ensaios de Armazenamento

O EEB secos por *spray drying* e por liofilização foram acondicionados em tubos Falcon[®], envoltos por filme plástico, e armazenados à temperatura ambiente (30 °C) e sob refrigeração (4 °C) e as atividades de fitases e xilanases determinadas quinzenalmente. O mesmo procedimento foi adotado para o EEB seco por liofilização.

Para tanto, as amostras pulverulentas foram diluídas em tampão acetato de sódio a 0,05 M e pH 5,0 e o teor de sólidos das formulações foram reconstituídos, como descritos no item 3.4.4. Foram realizadas determinações das atividades de fitases e xilanases após os ensaios de discriminação de adjuvantes e após os ensaios de otimização das condições de secagem. Após os ensaios de otimização de secagem, uma condição experimental foi selecionada para fornecer pós que seriam armazenados à temperatura ambiente e sob refrigeração.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Seleção dos Microrganismos Produtores de Fitases

Para a pré seleção de quais microrganismos do banco de fungos isolados pelo grupo de Pesquisa do Laboratório de Bioquímica dos Processos e Microbiologia Aplicada do IBILCE/UNESP seriam usados neste trabalho, foi adotado o método utilizado por Spier *et al.* (2007), no qual emprega-se o ágar fitato, que seleciona fungos capazes de produzirem fitases, denominado ágar fitato. A esterilização por autoclavagem do meio de cultura antes deste ser inoculado pelos microrganismos é prática comum do laboratório e isso foi feito com o ágar fitato. Em nenhum dos testes feitos com os fungos selecionados produziu-se halo. De acordo com Greiner (2013) o ágar fitato não poderia ser esterilizado por autoclavagem, pois provoca a hidrólise do ácido fítico, explicando o insucesso dessa etapa. A alternativa tecnológica seria fazer uma solução dez vezes mais concentrada, corrigir para pH 5,0 e filtra-la em membranas. A solidificação do meio foi feita em placas de vidros estéreis e um novo teste com os microrganismos citados foi refeito, novamente sem sucesso. Diante disso, os testes passaram a serem feitos através do cultivo em estado sólido, tendo-se bagaço de laranja e farelo de trigo como substratos e bagaço de cana de açúcar como suporte.

4.2 Otimização da Produção de Fitases

A primeira proporção utilizada dos meios sólidos bagaço de cana de açúcar, farelo de trigo e bagaço de laranja foi de 1:2:2 (peso), respectivamente.

Os resultados das atividades enzimáticas para fitases dos microrganismos *Thermomucor indicae-seudaticae* N31, *Lichtheimia ramosa*, *Thermomyces lanuginosus* FZ e *Thermomyces lanuginosus* SER são apresentados na Figura 4.1, sendo que os demais fungos não sintetizaram a enzima dentro de limites detectáveis. Embora a literatura cite o fungo *Aspergillus niger* como principal produtor de fitases, a atividade

obtida nas condições estudadas com este fungo não foi elevada. Spier *et al.* (2011) produziram 93 U/gss de fitases com *A. niger* através do cultivo em estado sólido utilizando polpa cítrica como substrato. Ainda que as condições utilizadas nesse trabalho tenham sido similares às utilizadas por esses autores, a cepa desse fungo, pertencente à coleção do LBMA, não produziu fitases em quantidades satisfatórias. Na Figura 4.1 e nas demais, a denominação U /gss significa a atividade enzimática por grama de substrato seco.

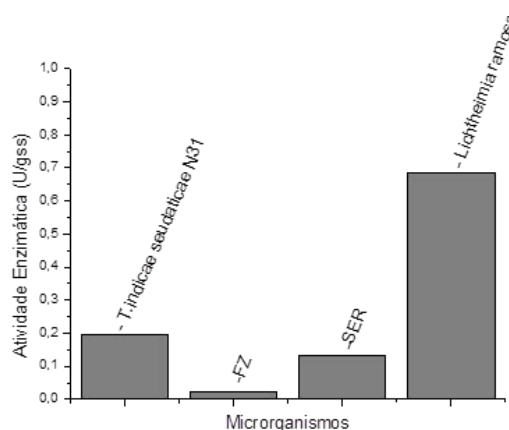


Figura 4.1. Atividade das fitases por CES após 96 horas, utilizando proporção 1:2:2 para bagaço de cana de açúcar, farelo de trigo e bagaço de laranja, respectivamente.

O fungo *Lichtheimia ramosa* proporcionou os melhores resultados. Nota-se que esse fungo produziu reduzida quantidade de fitases quando comparada a outros fungos termofílicos, por exemplo, o *Sporotichum thermophile* e *Rhizomucor pusillus* citados anteriormente na Tabela 1.5a do item 1.4.

Lichtheimia ramosa, conhecido anteriormente por *Absidia* sp., pertence à família *Lichtheimiaceae* e a ordem Mucorales. Embora o solo pareça ser o principal hábitat desses microrganismos, há relatos desses em vegetação e frutas em decomposição. Além disso, *Lichtheimia* sp. podem ser encontrados em uma variedade de substratos, incluindo produtos agrícolas como feno, palha e soja (SCHWARTZE e JACOBSEN,

2014). Schwartz *et al.* (2014) descrevem *Lichtheimia sp.* termotolerantes, sendo 37 °C a temperatura ótima de crescimento, mas podendo crescer até a temperatura de 49 °C.

Na literatura há pouca informação sobre esse microrganismo. Em trabalhos com cultivo em estado sólido, há relatos da produção de β -glicosidases, xilanases, CMCases, amilases e lipases (GONÇALVES *et al.* 2013; SILVA *et al.* 2013). Neves *et al.* (2011), cultivou *L. blakesleeana* em polpa cítrica e produziu fitases e xilanases.

Outras proporções do substrato bagaço de cana de açúcar, farelo de trigo e bagaço de laranja foram testadas para a otimização da produção das fitases pelo fungo *Lichtheimia ramosa*. Como pode-se observar na Figura 4.2, a proporção de 1:2:2 para bagaço de cana de açúcar, farelo de trigo e bagaço de laranja foi a que proporcionou melhores resultados de atividade de fitases, assim como o tempo de fermentação de 96 horas, como se comprova na Figura 4.3. Ainda na tentativa de melhorar a produção das fitases e sabendo-se que esta enzima é inibida pelo fósforo inorgânico proveniente do farelo de trigo, este foi substituído pelo farelo de soja, como pode ser visto na Figura 4.4. Nota-se que os cultivos contendo farelo de trigo na composição do substrato proporcionaram melhores produções enzimáticas quando comparados aos contendo farelo de soja.

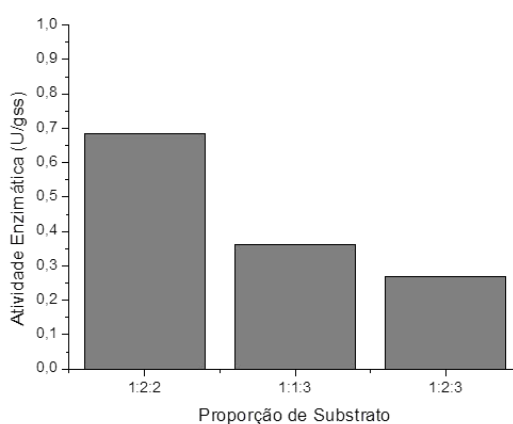


Figura 4.2. Atividade das fitases produzidas pelo fungo *Lichtheimia ramosa*, por CES pelo período de 96 horas e variação da proporção dos substratos bagaço de cana de açúcar, farelo de trigo e bagaço de laranja, respectivamente.

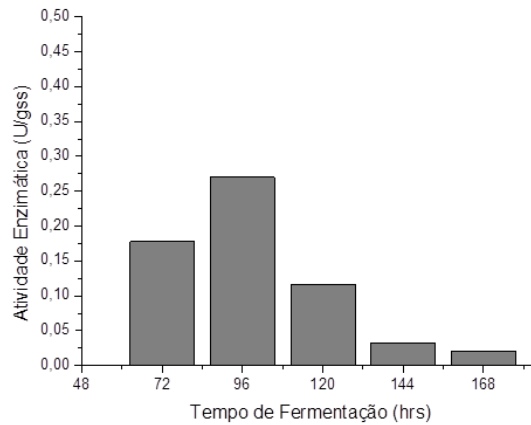


Figura 4.3. Atividade das fitases produzidas pelo fungo *Lichtheimia ramosa*, por CES, na proporção de substrato de 1:2:2 para bagaço de cana de açúcar, farelo de trigo e bagaço de laranja, respectivamente, com variação do período de cultivo.

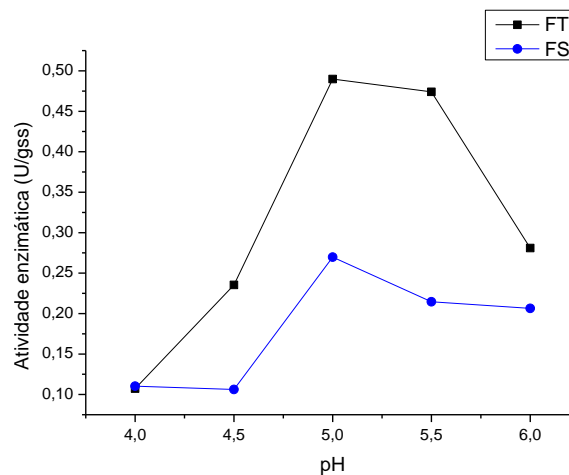


Figura 4.4. Atividade das fitases produzidas pelo fungo *Lichtheimia ramosa*, por CES, por 96 horas, na proporção de substrato de 1:2:2 para bagaço de cana de açúcar, bagaço de laranja e farelo de trigo (FT)/farelo de soja (FS); em diferentes pH da solução nutritiva de cultivo.

Para aprofundar esses estudos, foram realizados ensaios de cultivo seguindo-se um planejamento estatístico de blocos inteiramente casualizados, onde os parâmetros proporção de substrato (P_{sub}), tempo de cultivo (T_{cult}), temperatura de cultivo (T) e umidade (U_{mid}), e as atividades enzimáticas estão apresentados na Tabela 4.1. Na Tabela 4.2 é apresentada a análise de variância dos resultados.

Tabela 4.1. Planejamento estatístico para otimização da produção de fitases (*).

Ensaio	P _{sub}	T _{cult}	T		Umid (%)		Atividade	
	*BC:FT:BL	(horas)	(°C)	(°C)			enzimática U/gss	
1	A	-1	84	-1	40	-1	70	0,42
2	A	-1	84	-1	40	1	75	0,53
3	A	-1	84	1	50	-1	70	0,54
4	A	-1	84	1	50	1	75	0,41
5	A	0	96	-1	40	-1	70	0,60
6	A	0	96	-1	40	1	75	0,56
7	A	0	96	1	50	-1	70	0,58
8	A	0	96	1	50	1	75	0,42
9	A	1	108	-1	40	-1	70	0,45
10	A	1	84	-1	40	1	75	0,40
11	A	1	96	1	50	-1	70	0,37
12	A	1	108	1	50	1	75	0,33
13	B	-1	84	-1	40	-1	70	0,53
14	B	-1	84	-1	40	1	75	0,44
15	B	-1	84	1	50	-1	70	0,33
16	B	-1	84	1	50	1	75	0,42
17	B	0	96	-1	40	-1	70	0,50
18	B	0	96	-1	40	1	75	0,51
19	B	0	96	1	50	-1	70	0,23
20	B	0	96	1	50	1	75	0,47
21	B	1	108	-1	40	-1	70	0,38
22	B	1	108	-1	40	1	75	0,38
23	B	1	108	1	50	-1	70	0,28
24	B	1	108	1	50	1	75	0,33
25	C	-1	84	-1	40	-1	70	0,49
26	C	-1	84	-1	40	1	75	0,80
27	C	-1	84	1	50	-1	70	0,61
28	C	-1	84	1	50	1	75	0,93
29	C	0	96	-1	40	-1	70	0,75
30	C	0	96	-1	40	1	75	0,79
31	C	0	96	1	50	-1	70	0,50
32	C	0	96	1	50	1	75	0,65
33	C	1	108	-1	40	-1	70	0,55
34	C	1	108	-1	40	1	75	0,52
35	C	1	108	1	50	-1	70	0,69
36	C	1	108	1	50	1	75	0,68

* P_{sub}= A: 1:2:1; B: 1:1:2; C: 1:2:0; BC= bagaço de cana de açúcar; FT= farelo trigo; BL=bagaço de laranja.

Tabela 4.2. Análise de variância para a atividade enzimática de fitases. Apenas os fatores principais e os termos de interação de primeira ordem foram incluídos na análise.

ANOVA			$R^2 = 0,844$	
Parâmetro	GL	SQ	F	<i>p</i>
P_{sub}	2	0,45	27,35	0
T_{cult}	2	0,07	4,50	0,03
T	1	0,02	2,35	0,14
Umidade	1	0,02	2,06	0,17
P_{sub}xT_{cult}	4	0,01	0,36	0,83
P_{sub}xT	2	0,03	1,82	0,19
P_{sub}xUmid	2	0,05	2,92	0,08
T_{cult}xT	2	0,04	2,50	0,11
T_{cult}xUmid	2	0,02	1,19	0,33
TxUmid	1	0,001	0,18	0,68
Error	16	0,131		
Total	35	0,84		

P_{sub}= proporção do substrato; T_{cult}= tempo de cultivo; °C= temperatura de cultivo; Umid= umidade.

Conforme as condições de cultivo aplicadas, a atividade enzimática variou de 0,23 a 0,93 U/gss (ensaios 19 e 28, respectivamente). No entanto, a análise de variância deste planejamento não foi conclusiva, não apresentando parâmetros significativos para os efeitos principais e para as interações entre eles. Quando a análise foi realizada sem os termos de interação de segunda, terceira e quarta ordens, a análise de variância mostrou que os fatores tempo e proporção eram significativos, como pode ser visto na Tabela 4.2. Assim, decidiu-se por realizar um novo planejamento, tendo a proporção e o tempo de cultivo como únicas variáveis, com três níveis para ambas, conforme é apresentado na Tabela 4.3.

Tabela 4.3. Valores codificados (P_{sub} e T_{cult}) e respostas da atividade enzimática da fitase nos ensaios de otimização das condições de cultivo em estado sólido.

Ensaio	P_{sub} BC:FT:BL	T_{cult} (horas)	Atividade fitase (U/gss)	
1	A	-1	84	0,48
2	A	0	96	0,54
3	A	1	108	0,39
4	B	-1	84	0,43
5	B	0	96	0,43
6	B	1	108	0,34
7	C	-1	84	0,71
8	C	0	96	0,67
9	C	1	108	0,61

* P_{sub} = A: 1:2:1; B: 1:1:2; C:1:2:0. BC= bagaço de cana de açúcar; FT= farelo trigo; BL=bagaço de laranja.

Os resultados mostram variação na atividade enzimática de 0,34 a 0,71 U/gss, (ensaios 6 e 7 respectivamente). A partir dos dados apresentados, notam-se melhores resultados nas condições de cultivo na proporção de substratos 1:2:0 (BC:FT:BL) e em menores tempo de produção (84 e 96 horas). Estes dados são observados na análise de variância, mostrados na Tabela 4.4, com coeficiente de determinação $R^2 = 0,978$, indicando que o modelo é determinístico para as duas variáveis estudadas. Esta análise de variância não contempla interações cruzadas das variáveis, sendo que os fatores principais mostraram-se significativos a um índice de significância de 95 %

Tabela 4.4. Análise de variância para resposta de atividade de fitases nos ensaios de otimização de CES.

ANOVA			$R^2 = 0,978$	
Parâmetro	GL	SQ	F	<i>p</i>
P_{sub}	2	0,112	76,13	0,001
T_{cult}	2	0,018	12,52	0,019
Erro	4	0,003		
Total	8	0,134		

Na Figura 4.5 são apresentadas as atividades enzimáticas para os efeitos principais, onde se constata que o tempo de cultivo pode ser fixado em 84 horas e que a

melhor proporção BC:FT:BL é 1:2:0, ou seja, sem o bagaço de laranja em sua composição. Por não conter o substrato fonte de baixo teor de fósforo inorgânico nessa composição, ou seja, o bagaço de laranja, acredita-se que foram metabolizadas outras fosfatases que não a fitase, uma vez que é conhecido que o fósforo inorgânico presente no farelo de trigo inibe a produção desta enzima. Desta forma, para continuidade do trabalho foi escolhida a proporção 1:2:2. A literatura enfatiza a importância do tempo de cultivo para o experimento ser eficiente e econômico. Nascimento (2011), o melhor resultado de produção de fitases por cultivo submerso com *Aspergillus niger* var. *phoenicis* URM 4924 ocorreu no tempo de 84 horas. Em contrapartida, Silva *et al.* (2000) obtiveram fitases fúngicas por cultivo em estado sólido com *Aspergillus niger* e polpa cítrica em 48 horas.

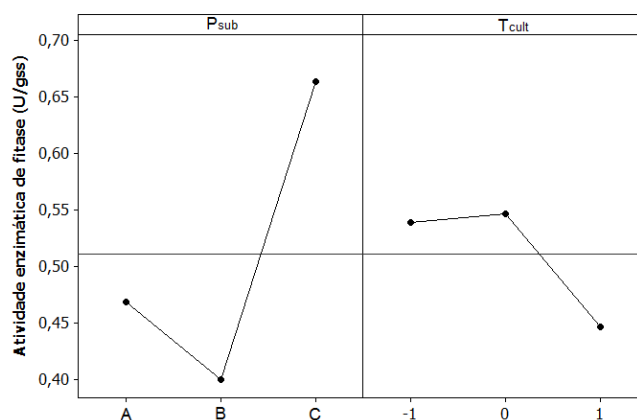


Figura 4.5. Atividade de fitases para os fatores analisados nos ensaios de otimização do CES.

4.3 Ensaios de Armazenamento do Extrato Enzimático Aquoso Bruto

Dentre as dificuldades para viabilização industrial de enzimas de origem microbiana está a estabilidade durante o período de armazenamento e estocagem para aplicação futura, além da necessidade de redução de volume do extrato enzimático

aquoso bruto. Nessa temática, estudou-se o comportamento das fitases do extrato enzimático aquoso bruto durante o armazenamento refrigerado e congelado.

Os valores obtidos para as atividades de fitases estão apresentados na Figura 4.6, onde a atividade relativa (AR) foi baseada na atividade da enzima logo após a extração, antes do armazenamento propriamente dito. Como se pode observar, as atividades das fitases apresentaram tendência de queda durante o armazenamento. De acordo com Greiner (2013), queda contínua ou elevação contínua seriam justificáveis em virtude de uma degradação das proteínas devido a alterações de pH, principalmente durante o congelamento, ou ativação das mesmas, devido à ação de íons presentes nos extratos e que teriam tempo suficiente para alcançar os sítios ativos das enzimas. No entanto, oscilações entre quedas e elevações não são esperadas.

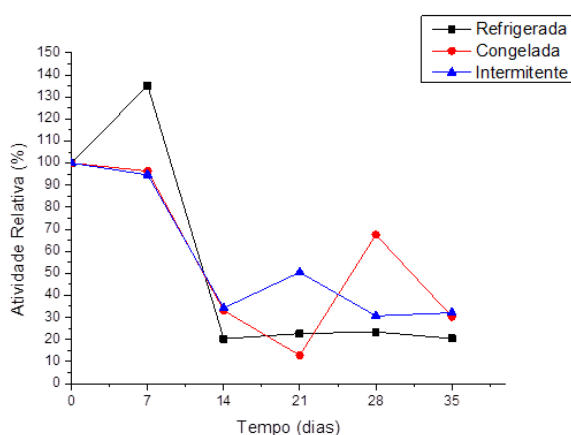


Figura 4.6. Atividade relativa (AR) das atividades de fitases dos extratos brutos armazenados por um mês sob refrigeração, congelamento e congelamento intermitente.

O grau de desnaturação proteica induzida pelo congelamento é função da taxa de resfriamento e da temperatura final do produto, sendo que a estabilidade da enzima varia significativamente com a taxa de resfriamento, devido à formação de agregados solúveis e/ou insolúveis (WANG, 2000; TATTINI JUNIOR, 2006). O aumento da concentração de proteína leva ao aumento da resistência à desnaturação durante o congelamento, uma vez que testes após o congelamento-descongelamento revelam que

a porcentagem de agregados de proteína varia inversamente com a concentração de proteínas. Acredita-se que os danos durante o congelamento envolvam desnaturação da proteína durante a formação da interface gelo/água (STRAMBINI e GABELLIERI, 1996; CARPENTER, *et al.* 1997). Além disso, pode haver alterações no pH durante o congelamento, afetando a estabilidade principalmente em soluções enzimáticas tamponadas (STRAMBINI e GABELLIERI, 1996).

Para avaliar se a concentração de proteínas poderia ser relevante no extrato enzimático, foram feitas determinações específicas para tanto, cujos resultados são apresentados na Tabela 4.5. Comparando-se a concentração de proteínas obtidas com as reportadas na literatura, conclui-se que as mesmas são da mesma ordem de grandeza e não parece ser este fator relevante na redução da atividade das fitases com o armazenamento. Palma (2003) observou 180 mg/g de proteína no extrato resultante da fermentação de bagaço de mandioca e farelo de arroz com o fungo *Thermoascus aurantiacus* ATCC 204492.

Tabela 4.5. Quantidade de proteína, fitases e proteases no EEB e atividade de fitase e protease.

Proteína (mg/g)	185,9
Fitases (U/gss)	0,5
Proteases (U/gss)	17,4

Uma possível causa para a queda da atividade das fitases poderia ser a presença de proteases no EEB. Na Tabela 4.5 são apresentados os resultados da quantificação da atividade destas enzimas, que se mostraram expressivas. De acordo com a Tabela 4.5 a atividade de proteases presentes no EEB é praticamente 35 vezes maior da obtida nos ensaios de fitases. Para tentar inibir a atividade das proteases e reduzir a ação deletéria do fator congelamento, ao EEB foram adicionados glicerol em várias concentrações, e o inibidor de protease PMSF, sendo os resultados apresentados na Figura 4.7. A ação do

agente PMSF manteve a atividade das fitases, de modo que se acredita que a queda observada na Figura 4.7 deva-se à ação das proteases.

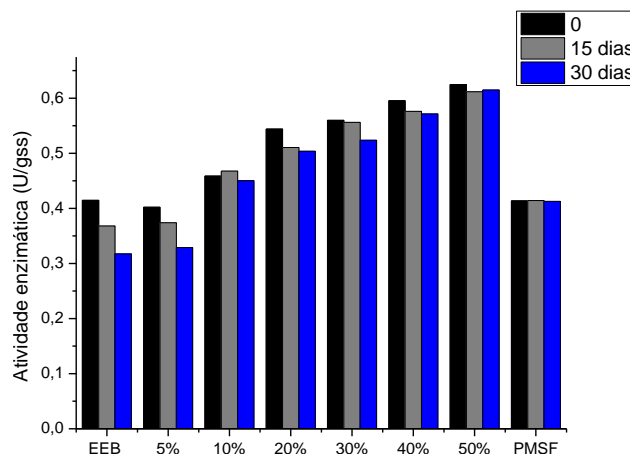


Figura 4.7. Atividade de fitases dos extratos brutos armazenados com glicerol e PMSF, por um mês sob congelamento.

Proteases ou peptidases são enzimas que catalisam a hidrólise de ligações peptídicas presentes em proteínas ou peptídeos, liberando peptídeos de tamanho variável ou aminoácidos livres. As proteases podem ser classificadas quanto à natureza química do sítio catalítico do mecanismo de ação, são elas: serina proteases; cisteína proteases; aspártico proteases; treonina protease e metaloproteases. O PMSF é um inibidor de proteases que atua impedindo a ação das serino-proteases (DA SILVA-LÓPEZ, 2014).

O glicerol é um agente estabilizante ao frio bastante conhecido, que previne a formação de cristais de gelo (FARRANT, 1965). Na Figura 4.7 nota-se que apenas na concentração de 5% de glicerol os resultados foram próximos do EEB, sendo que nas demais concentrações não só preservou a atividade ao longo do armazenamento, como potencializou sua atividade, de modo que a compreensão dos fenômenos observados necessita de estudos mais aprofundados, o que foge do alcance deste trabalho.

4.4. Caracterização Físico-química das Enzimas

4.4.1 Fitases

As variações de pH e temperatura de reação enzimática afetam a atuação das enzimas no meio reacional ao qual são aplicadas. Assim, avaliou-se o efeito dessas variáveis na atividade das fitases, demonstrado na Figura 4.8.

Observa-se que o pH ótimo da fitase é 3,5, ligeiramente abaixo das faixas observadas para a maioria das fitases conhecidas, que têm pH ótimo entre 4,0 e 6,0 (LEI e PORRES, 2003; VATS e BANERJEE, 2004). A Tabela 4.6 mostra os pH e temperatura ótimos para fitases encontrados na literatura.

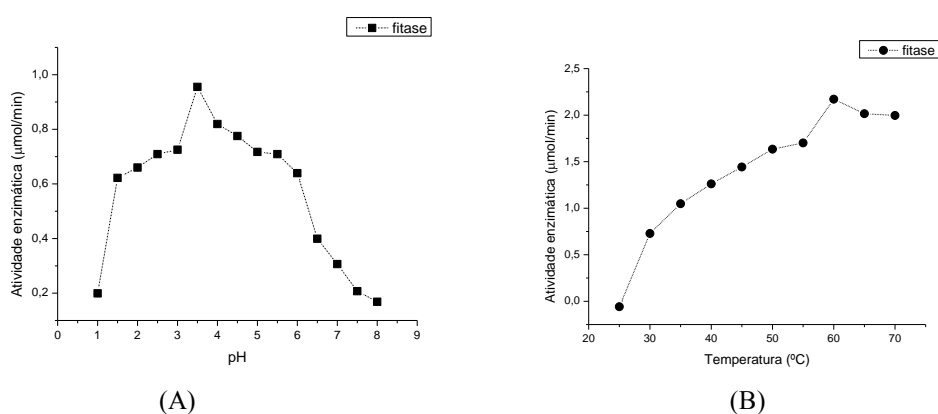


Figura 4.8. Dependência da atividade enzimática da fitase com o pH (A) e temperatura (B) de reação.

Tabela 4.6. Exemplos na literatura de pH e temperatura ótimos de fitases.

Microrganismo	Substrato	pH	Temperatura	Referências
<i>A. niger</i> var. <i>phoenicis</i> URM 4924	farelo de arroz e milhocina	5	60 °C	NASCIMENTO, 2011
<i>Rhizopus oligosporus</i>	farelo de arroz	3 e 4,5	60 °C	AZEKE <i>et al.</i> 2011
<i>Saccharomyces castelli</i>	galactose, fitato de sódio e sais minerais	4,4	74 °C	SEGUEILHA, 1992
<i>A. niger</i> ATCC 9142	amido de milho	5,0	65 °C	CASEY e WALSH, 2003

In *et al.* (2009) destacam que as fitases ácidas são mais aplicadas como aditivos alimentares, as quais podem liberar o fósforo inorgânico contido nos alimentos dentro do trato gastrointestinal dos animais monogástricos. Além disso, Naves (2009) cita que para Liebert *et al.* (1993) é possível que os principais locais de atividade das fitases sejam no papo (pH entre 4,0 e 5,0) e o proventrículo (pH entre 2,5 e 3,5) do frango. Sendo assim, a fitase estudada nesse trabalho possui características favoráveis para utilização como suplementação animal, pois mantém atividades relativas acima de 60% para pH variando de 1,5 a 6,0.

De acordo com Bedford (2005), no processo de peletização, onde a ração é submetida às condições de alta temperatura e pressão, é importante estar seguro de que a fitase realmente estará ativa na ração em que os animais estão consumindo.

A fitase produzida pelo fungo *L. ramosa* obteve temperatura ótima de atividade em 60 °C, decaindo ligeiramente para temperaturas superiores. Esse resultado corrobora o de Nascimento (2011) observado na Tabela 4.6. No entanto, enquanto que a atividade enzimática de *A. niger* var. *phoenicis* URM 4924 decaiu abruptamente para tempos superiores a 60 °C, a atividade das fitases obtidas no presente trabalho decaíram ligeiramente até a temperatura máxima aqui testada, 70 °C, indicando seu caráter termoestável.

4.4.2 Xilanases

Reconhecendo a reduzida produção de fitases obtidas no trabalho, e projetando a etapa de secagem, decidiu-se trabalhar concomitantemente com outra enzima de interesse alimentar para animais monogástricos, a xilanase. Embora o fungo *Lichtheimia ramosa* tenha produzido 55,85 U/gss no cultivo em estado sólido empregando bagaço de cana de açúcar, farelo de trigo e bagaço de laranja como

substratos, decidiu-se trabalhar com as xilanases produzidas pelo fungo *Myceliophthora thermophila* I-1d3b, descrito no item 3.3.2, pela superior atividade dessa enzima em relação à primeira. Diante disso, avaliou-se o efeito do pH e temperatura sobre a atividade dessas enzimas, observados na Figura 4.9. Para a Figura 4.9 (A) o valor máximo da atividade enzimática foi 864 U/gss e na Figura 4.9 (B) 854 U/gss.

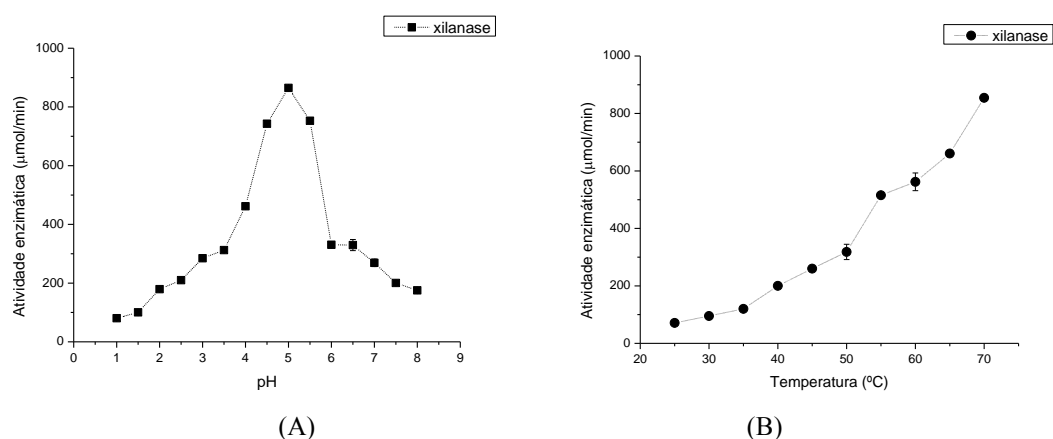


Figura 4.9. Dependência da atividade enzimática da xilanase com o pH (A) e temperatura (B) de reação.

Na Figura 4.9 nota-se que a xilanase produzida pelo fungo *Myceliophthora thermophila* I-1D3b possui dentro das faixas estudadas, pH e temperatura ótimos de 5,0 e 70 °C, respectivamente. Esses dados corroboram aos encontrados na literatura que reporta que geralmente as xilanases ácidas possuem faixa de temperatura ótima de 50 a 60 °C e a maioria das xilanases fúngicas apresentam pH ótimo para hidrólise da xilana na faixa de 4,5 a 6, apesar de serem normalmente estáveis na faixa de pH de 3 a 8 (KORMELINK *et al.* 1993; ANGELO, 1995; KIMURA, *et al.* 1995).

Tabela 4.7. Exemplos na literatura de pH e temperatura ótimos de xilanases.

Microrganismo	Substrato	pH	Temperatura	Referência
<i>A.fumigatus</i> M.7.1	bagaço de cana de açúcar e farelo de trigo	4,5	60 °C	MORETTI, 2010
<i>Myceliophthora</i> sp M.7.7	bagaço de cana de açúcar e farelo de trigo	5,0	65 °C	MORETTI, 2010
<i>A.niger</i> LPB 326	bagaço de cana de açúcar e farelo de soja	5,3	50 °C	MACIEL, 2006
<i>A.casielus</i>	bagaço de cevada	6,5	50 °C	KRONBAUER <i>et al.</i> 2007

De acordo com a Tabela 4.7 a faixa de pH de maior atividade das xilanases é estreita e ligeiramente ácida, enquanto que a faixa de temperatura é mais ampla. Palma (2003) cita que as xilanases provenientes de diferentes microrganismos são estáveis na faixa de pH de 3 a 10, sendo as melhores atividades enzimáticas constatadas em pH entre 4 e 7.

4.5 Ensaio de Secagem

A proteção das fitases é o foco desse trabalho, porém visando compreender se os resultados obtidos nesta dissertação poderiam ser estendidos a outras enzimas usadas na alimentação animal, avaliou-se também como resposta a retenção da atividade de xilanases.

4.5.1 Ensaio preliminar

Ao analisar as atividades enzimáticas das alíquotas das suspensões preparadas com a mistura do extrato enzimático bruto (EEB) e o adjuvante (Mist) antes da secagem, observou-se alterações das mesmas quando comparadas as atividades enzimáticas do EEB, sendo os resultados apresentados em termos de atividade relativa (%) na Tabela 4.8.

Tabela 4.8. Atividades relativas das suspensões de secagem em relação ao EEB (*).

	FT		FS		FM	
	Fitase	Xilanase	Fitase	Xilanase	Fitase	Xilanase
AR (%)	151	95	229	61	64	64

(*) FT= farelo de trigo; FS= farelo de soja; FM= farelo de milho.

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 4.8, as atividades das enzimas apresentaram alterações antes mesmo de serem submetidas ao *spray dryer*, ou

seja, quando o EEB foi misturado aos adjuvantes. Com exceção do farelo de milho, nota-se que os adjuvantes alteram de modos diferentes as fitases e xilanases. Na presença dos adjuvantes, as fitases apresentaram aumento em sua atividade, já as xilanases, queda. Sendo assim, os resultados das atividades enzimáticas ao longo no trabalho não serão expressas em atividades relativas.

Diante disso, avaliou-se a atividade enzimática de fitase e xilanase dos farelos misturados apenas ao tampão acetato de sódio (Tabela 4.9) para então julgar se a composição química dos adjuvantes pudesse interferir nos resultados das análises de atividade enzimática.

Tabela 4.9. Quantificação de atividade enzimática de fitases e xilanases dos farelos de soja, trigo e milho, e do extrato enzimático bruto.

	Atividade enzimática (U/gss)	
	Fitase	Xilanase
Farelo de soja + tampão acetato de sódio	0,06	4,88
Farelo de trigo + tampão acetato de sódio	0,90	5,20
Farelo de milho + tampão acetato de sódio	0	7,97
Extrato enzimático	0,47	562,04

Na Tabela 4.9 observa-se que o farelo de trigo, mesmo sem o EEB, apresenta elevada atividade de fitases, praticamente o dobro da maior obtida nos ensaios de cultivo. Isso acontece pelo trigo conter alto teor de fosfato inorgânico em sua composição química, o que interfere na determinação da atividade das fitases, por ser o elemento quantificado pelo método. No entanto, os demais resultados mostram que os farelos não apresentaram atividades de xilanase e fitase significativas que possam interferir nos resultados dos ensaios de secagem.

Após a secagem das suspensões, suspeitou-se que a enzima pudesse estar adsorvida à superfície do adjuvante, de forma que esta não pudesse ser quantificada caso não fosse extraída do pó seco. A fim de encontrar a melhor forma para a extração das enzimas dos pós após as secagens, foram feitos testes variando-se os tempos de extração, apresentados na Tabela 4.10. As secagens foram realizadas nas mesmas condições para todos os adjuvantes. As atividades relativas (AR) e atividades enzimáticas (AE) foram calculadas em relação à mistura líquida dos adjuvantes com EEB (Mist) e ao EEB.

Tabela 4.10. Avaliação do melhor tempo de extração dos pós obtidos em secagem por *spray dryer*.

Adjuvantes	AR (%)		AE (U/gss)	
	Fitase	Xilanase	Fitase	Xilanase
Farelo soja	EEB	100	0,18	849,9
	Mis/EEB	209,4	0,38	647,6
	3 horas	40,2	0,15	443,1
	4 horas	74,3	0,11	623,0
	5 horas	31,2	0,09	604,6
	6 horas	22,6	0,03	436,6
Farelo trigo	EEB	100	0,18	849,9
	Mis/EEB	584,4	1,07	295,3
	3 horas	31,7	0,34	261,4
	4 horas	25,8	0,09	302,7
	5 horas	52,2	0,14	284,2
	6 horas	67,7	0,38	258,3
Farelo milho	EEB	100	0,18	849,9
	Mis/EEB	156,1	0,29	529,8
	3 horas	8,9	0,02	241,3
	4 horas	35,6	0,009	252,2
	5 horas	5,5	0,005	196,9
	6 horas	0	0	203,9

De acordo com a Tabela 4.10 nota-se que os melhores resultados para a xilanase foram obtidos com o tempo de 4 horas de extração para todos os adjuvantes usados, e para as fitases o mesmo foi observado com os adjuvantes farelos de soja e de milho. Passado esse tempo ótimo, as atividades das enzimas apresentaram queda. Diante dessas informações, suspeita-se que as enzimas tenham sido adsorvidas à superfície dos farelos usados como adjuvantes durante o processo de secagem. Essa interação não possibilitou a total quantificação enzimática dos pós, pela dificuldade na extração das enzimas o que

será abordado mais detalhadamente no decorrer do trabalho. A queda na atividade das fitases e xilanases a partir de 5 horas de extração pode ter se dado pela desnaturação das enzimas extraídas ou pela possibilidade de novas interações dessas com as superfícies de contato. O farelo de trigo apresentou maior atividade de fitases no tempo de 6 horas de extração, provavelmente devido à alta quantidade de fósforo inorgânico nesse adjuvante, como explicado anteriormente.

Processos como os de armazenamento ou manipulação podem alterar a estrutura proteica de tal modo que esta seja afetada irreversivelmente e com isso perca a sua função. A adsorção das proteínas numa superfície e suas interações geram preocupações em seguimentos como os da biotecnologia e processamento de alimentos, pois tais interações podem interferir de modo crucial na execução do processo. Nakanishi *et al.* (2001) citam que enzimas imobilizadas por adsorção apresentam alterações em sua atividade não só pela quantidade de enzima adsorvida, mas também pela queda da estabilidade e atividade daquelas que são possíveis de serem extraídas e analisadas.

O efeito adsorção depende de fatores como as propriedades das proteínas, o tipo de superfície e das condições ambientais. Em relação às propriedades das proteínas, a carga, tamanho da molécula, estabilidade estrutural, composição de aminoácidos, e conformação estérica são variáveis que interferem na quantidade adsorvida (BOS *et al.* 1994; NAKANISHI *et al.* 2001).

4.5.2 Ensaio de discriminação dos adjuvantes

A Tabela 4.11 apresenta os parâmetros operacionais e os resultados dos ensaios de secagem do EEB com os adjuvantes: farelo de soja (A), farelo de trigo (B) e farelo de milho (C). As atividades enzimáticas dos pós estão expressas em relação à suspensão líquida antes do processo de secagem. É possível observar valores de

umidade variando de 2,9 até 7,6% (b.s.), sendo o menor valor obtido no ensaio n° 2 utilizando farelo de soja como adjuvante e o maior no ensaio n° 5 com farelo de milho. Já a manutenção da atividade enzimática após a secagem variou de 19,6 a 403,0% para fitase e para xilanase de 37,6 até 175,4%.

É possível observar que os maiores valores de Atividade Residual (A.Re) para fitases foram nas formulações contendo farelo de trigo como adjuvante e para xilanases foram as contendo farelo de soja.

Tabela 4.11. Parâmetros operacionais e resultados obtidos nos ensaios discriminativos de secagem em *spray dryer* de extrato enzimático bruto acrescido de adjuvante (*).

ENSAIO	Adjuvante	Atividade Residual (%)				U _{final} (%, b.s.)
		T _{saída} (°C)	Fitase	Xilanase		
1	A	-1	90	59,13	114,54	3,01
2	A	1	110	54,35	175,38	2,95
3	B	-1	90	403,03	24,83	6,81
4	B	1	110	236,08	37,56	3,65
5	C	-1	90	19,56	43,16	7,56
6	C	1	110	21,74	55,38	3,63

*A= farelo de soja; B= farelo de trigo; C= farelo de milho.

As respostas de Atividade Residual foram submetidas à análise de variância, sendo identificado como parâmetro significativo para retenção da atividade de fitases apenas o fator adjuvante, como pode ser observado na Tabela 4.12. Note-se que o erro

resultante do ajuste é pequeno em relação à soma quadrática residual (SQ) total, indicando que o modelo é determinístico.

Tabela 4.12. Análise de variância para resposta da atividade de fitase, nos ensaios de discriminação dos adjuvantes.

ANOVA			$R^2 = 0,924$	
Parâmetro	GL	SQ	F	<i>p</i>
Adj	2	106480	11,63	0,079
T _{saída}	1	4792	1,05	0,414
Erro	2	9158		
Total	5	120430		

* Adj = Adjuvante; T_{saída} = Temperatura de saída do ar de secagem

A análise revelou, para as faixas operacionais selecionadas, uma tendência de maiores atividades residuais para as fitases com o adjuvante farelo de trigo (B), não apontando a temperatura de saída do gás de secagem como fator significativo do processo, como pode ser visto na Figura 4.10.

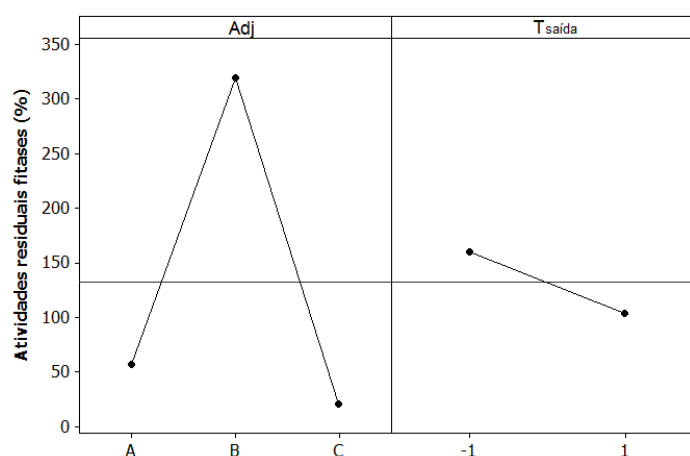


Figura 4.10. Média das atividades residuais de fitases para os fatores adjuvantes (Adj) e temperatura de saída do gás (T_{saída}) nos ensaios de discriminação dos adjuvantes.

Para a atividade residual de xilanase, a análise de variância também indicou somente o parâmetro adjuvante (Adj) como significativo para a retenção de atividade de xilanase, como pode ser visto na Tabela 4.13, e os melhores resultados foram obtidos com farelo de soja (A), como se constata na Figura 4.11. O modelo estatístico ajustado pode ser considerado determinístico, haja vista o elevado coeficiente de determinação ($R^2 = 0,95$).

Tabela 4.13. Análise de variância para resposta da atividade de xilanase, nos ensaios de discriminação dos adjuvantes (*).

ANOVA			$R^2 = 0,954$	
Parâmetro	GL	SQ	F	p
Adj	2	14950,8	19,17	0,050
T _{saída}	1	1227,0	3,15	0,218
Erro	2	779,8		
Total	5	16957,5		

* Adj = Adjuvante; T_{saída} = Temperatura de saída do ar de secagem

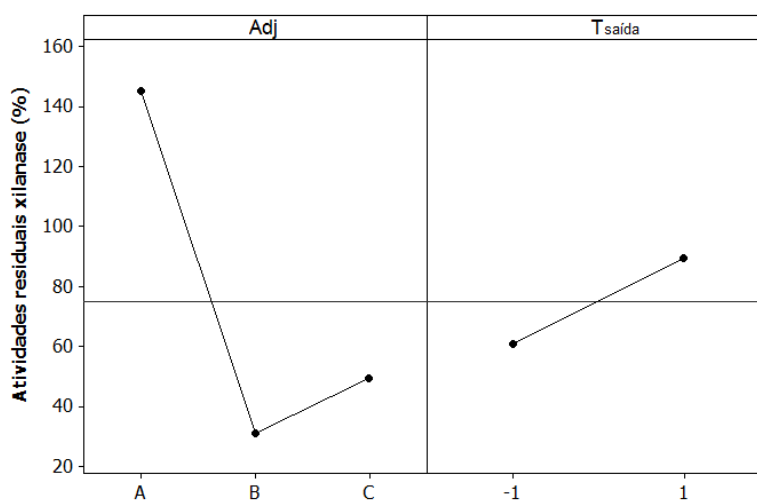


Figura 4.11. Média das atividades residuais de xilanases para os fatores adjuvantes (Adj) e temperatura de saída do gás (T_{saída}) nos ensaios de discriminação dos adjuvantes.

A literatura indica como relevante o uso de adjuvantes na secagem de materiais bioativos, como as enzimas, uma vez que processos como *spray drying* induzem ao stress térmico e mecânico, podendo levar a instabilidades químicas e/ou físicas. No entanto, os mecanismos de estabilização destes compostos no estado sólido ainda não são bem definidos (CHANG e PIKAL, 2009).

Em trabalho de secagem de fitases por *spray dryer*, Sato *et al.* (2014), obtiveram melhores resultados de atividade residual para o adjuvante farelo de soja (60,4%), seguido pelo farelo de milho (40,5%). Esses resultados são similares aos apresentados no presente trabalho para o farelo de soja, porém é superior em relação ao farelo de milho.

4.5.3 Ensaio de otimização das condições de secagem

Embora o adjuvante farelo de trigo tenha sido apontado como o melhor para as enzimas fitases, esse resultado não foi escolhido para os ensaios de otimização, pois as atividades enzimáticas medidas não correspondiam ao fósforo inorgânico disponibilizado pelas fitases e sim ao presente na composição do farelo de trigo, de modo que se decidiu por escolher o adjuvante que proporcionou maior atividade para xilanase, ou seja, farelo de soja. Além do mais, o farelo de soja é o alimento proteico vegetal mais comumente utilizado na alimentação de aves.

Diante disso, buscou-se otimizar as condições de secagem visando a manutenção da atividade das fitases e xilanases. Nestes ensaios, foram analisados os fatores temperatura de saída do ar de secagem ($T_{saída}$), vazão de alimentação do *spray dryer* (Q_{Alim}) e sólidos totais presentes na amostra (ST), através de um planejamento estatístico rotacional de composto central. Os ensaios foram realizados, sendo a média da atividade enzimática e da umidade final dos pós apresentados na Tabela 4.14.

Tabela 4.14. Valores codificados e respostas da atividade residual da fitase e xilanase e umidade final dos pós nos ensaios de otimização das condições de secagem (*).

Ensaio	T _{saída}		Q _{alim}		ST		Atividade Enzimática (U/gss)		U _{final}
	(°C)		(mL/min)		(%)		Fitase	Xilanase	(%) b.s.
1	-1	90	-1	5	-1	7	0,29	346,9	4,1
2	1	110	-1	5	-1	7	0,35	240,8	3,5
3	-1	90	1	11	-1	7	0,46	385,7	5,7
4	1	110	1	11	-1	7	0,38	271,4	4,09
5	-1	90	-1	5	1	13	0,26	261,2	4,7
6	1	110	-1	5	1	13	0,28	244,9	3,3
7	-1	90	1	11	1	13	0,44	277,5	3,7
8	1	110	1	11	1	13	0,19	251,0	3,8
9	-1,68	83	0	8	0	10	0,25	361,2	5,1
10	1,68	117	0	8	0	10	0,38	381,6	3,4
11	0	100	-1,68	3	0	10	0,49	514,3	3,8
12	0	100	1,68	13	0	10	0,23	375,5	3,5
13	0	100	0	8	-1,68	5	0,31	386,9	2,7
14	0	100	0	8	1,68	15	0,53	83,3	3,3
15	0	100	0	8	0	10	0,34	291,8	4,7
16	0	100	0	8	0	10	0,21	361,2	4,7
17	0	100	0	8	0	10	0,29	363,3	5,3
18	0	100	0	8	0	10	0,32	312,2	5,2
19	0	100	0	8	0	10	0,37	334,7	4,4
20	0	100	0	8	0	10	0,43	316,3	4,4
Média global							0,34	318,10	
Desvio Padrão							0,09	86,07	
Intervalo de Confiança (95%)							0,04	40,28	
Coefficiente de Variação (%)							27,93	27,06	

*Adj = Adjuvante; T_{saída} = Temperatura de saída do ar de secagem; ST= teor de sólidos; U_{final}= umidade final

Conforme as condições aplicadas na secagem, a atividade residual das enzimas em relação ao EEB variou de 72,5 a 200,8% para fitases, e 14,1 a 86,7% para xilanases. No caso das xilanases, tal redução pode ter ocorrido devido à dependência da atividade residual ao processo de secagem e das condições operacionais, e também pela provável adsorção das enzimas no adjuvante.

De acordo com a Tabela 4.14, nota-se que embora as duas enzimas tenham sido cultivadas por fungos e substratos diferentes, o coeficiente de variação para a média de todos os tratamentos (27%) é praticamente o mesmo para a fitase e xilanase. Uma comparação direta entre as médias dos resultados não é possível devido à diferença das

ordens de grandeza das atividades das fitases e xilanases. Para poder comparar estas médias, o valor de cada atividade foi dividido pela atividade máxima observada, um procedimento de normalização. Comparando-se as atividades normalizadas através de um teste de Turkey a 95 % de índice de significância indica que ambos são iguais. Como as atividades enzimáticas foram obtidas a partir de suspensões reconstituídas empregando-se os pós secos, a combinação de adsorção das enzimas com a influência das condições de secagem parecem estar afetando igualmente ambas as enzimas. No entanto, estudos específicos têm de ser realizados para avaliar a influência de cada uma dessas variáveis sobre as atividades.

Poucos estudos são disponíveis na literatura sobre secagem de enzimas empregando resíduos sólidos agroindustriais como adjuvantes.

Nakanishi *et al.* (2001) explicam que para proteínas com elevada estabilidade, as quantidades adsorvidas em superfícies hidrófilicas são geralmente reduzidas, a menos que exista atração eletrostática entre elas, em comparação com as mesmas proteínas adsorvidas em superfícies hidrofóbicas, o que as leva a uma mudança estrutural sobre a superfície em que está adsorvida. Já as proteínas com baixa estabilidade, como as hemoglobinas, albumina de soro bovino, catalases e fitases, tendem a adsorver em todas as superfícies independentemente de interações eletrostáticas.

A adsorção ocorre geralmente de maneira irreversível mesmo à temperatura ambiente. A irreversibilidade da adsorção pode surgir devido a várias causas, embora os detalhes não sejam conhecidos. Estas situações variam e dependem das combinações de proteínas/superfície e da extensão da deformação da proteína na superfície em que essa está adsorvida, podendo também haver a interação mesmo sem haver mudanças conformacionais da proteína (BOS *et al.* 1994; NAKANISHI *et al.* 2001; DHRUV, 2009).

Além da adsorção das enzimas na superfície dos farelos usados como adjuvantes, o processo de secagem também pode afetar o modo como isso acontece, pois a quantidade de proteínas adsorvidas a altas temperaturas tende a ser muito maior do que à temperatura ambiente (NAKANISHI *et al.* 2001). Proteínas contendo resíduos do aminoácido cisteína, como as fitases e xilanases, formam multicamadas sobre uma superfície sólida quando submetidas ao calor, uma vez que o calor desnatura a enzima e o resíduo de cisteína livre fica disponível para formar novas ligações dissulfeto (S-S) (ARNEBRANT e NYLANDER, 1986; NAKANISHI *et al.* 2001) como mostra a Figura 4.12.

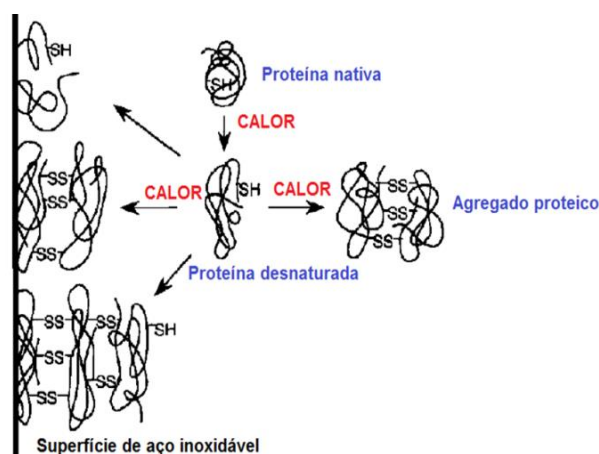


Figura 4.12. Agregação de proteínas em superfície sólida em alta temperatura (Extraído e modificado de NAKANISHI *et al.* 2001).

Kondo e Urabe (1995), citados por Nakanishi *et al.* (2001), analisaram a adsorção de α -amilases em partículas de sílica e constataram que a redução da atividade enzimática estava intimamente relacionada com a alteração da quantidade de α -hélice na conformação da enzima. Baron *et al.* (1999) estudaram mudanças nas atividades e na estrutura secundária da α -quimiotripsina adsorvida na superfície do mineral montmorilonita e notaram que provavelmente a inativação da enzima deu-se pela

interação dos aminoácidos principais da enzima com a superfície do mineral carregada negativamente.

Diante de todas as incertezas, não pode se concluir que o processo de secagem não foi efetivo, mas sim que as enzimas ficaram adsorvidas, seja nos adjuvantes ou na parede dos equipamentos, o que dificultou a quantificação das mesmas. Devido à ampla faixa de variação das atividades residuais, decidiu-se por analisar as atividades enzimáticas propriamente ditas. A faixa de variação das atividades enzimáticas de fitase foi de 0,19 a 0,53 U/gss. A Tabela 4.15 apresenta a análise de variância, onde se constata que nenhum dos fatores e suas interações foram significativos e que o modelo não é determinístico.

Tabela 4.15. ANOVA para atividade enzimática de fitase para os ensaios de otimização das condições de secagem empregando-se o adjuvante farelo de soja.

ANOVA		$R^2 = 0,20$		
Parâmetro	GL	SQ	F	<i>p</i>
Regressão	9	0,04	0,28	0,965
Linear	3	0,006	0,14	0,931
T _{saída}	1	0,00006	0,00	0,950
Q _{alim}	1	0,001	0,11	0,751
ST	1	0,005	0,32	0,582
Quadrática	3	0,003	0,08	0,970
T _{saída} xT _{saída}	1	0,001	0,07	0,799
Q _{alim} xQ _{alim}	1	0,0007	0,06	0,815
STxST	1	0,001	0,10	0,764
Interação	3	0,028	0,63	0,615
T _{saída} xQ _{alim}	1	0,021	1,40	0,264
T _{saída} xST	1	0,005	0,36	0,563
Q _{alim} xST	1	0,001	0,12	0,737
Erro residual	10	0,151		
Falta de ajuste	5	0,124	4,58	0,06
Erro puro	5	0,03		
Total	19	0,19		

T_{saída}= Temperatura de saída do ar de secagem; ST= teor de sólidos; Q_{alim}= vazão de alimentação

A faixa de variação das atividades das xilanases foi de 83,26 a 514,28 U/gss. A partir da análise de variância apresentada na Tabela 4.16, o ajuste do modelo não pode ser considerado satisfatório (coeficiente $R^2 = 64\%$). Observa-se que ao nível de

significância de 95% foi significativo apenas o termo quadrático da temperatura de saída, e se for considerado nível de significância de 90%, também os termos quadráticos vazão de alimentação e teor de sólidos totais.

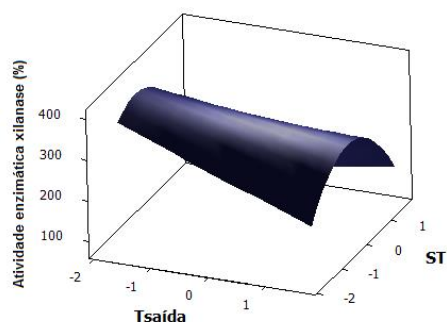
Tabela 4.16. ANOVA para atividade enzimática de xilanase para os ensaios de otimização das condições de secagem empregando-se o adjuvante farelo de soja.

Parâmetro	ANOVA		$R^2 = 0,64$	
	GL	SQ	F	p
Regressão	9	63299,8	1,98	0,151
Linear	3	5722,7	0,54	0,667
$T_{saída}$	1	68,3	0,02	0,892
Q_{alim}	1	15,1	0,00	0,949
ST	1	5639,3	1,59	0,236
Quadrática	3	56384,4	5,29	0,019
$T_{saída} \times T_{saída}$	1	9488,2	4,36	0,063
$Q_{alim} \times Q_{alim}$	1	9202,1	3,71	0,083
STxST	1	37694,1	10,62	0,009
Interação	3	1192,7	0,11	0,951
$T_{saída} \times Q_{alim}$	1	905,0	0,25	0,625
$T_{saída} \times ST$	1	34,8	0,01	0,923
$Q_{alim} \times ST$	1	252,9	0,07	0,795
Erro residual	10	35501,6		
Falta de ajuste	5	5292,0	0,18	0,961
Erro puro	5	30209,7		
Total	19	98801,5		

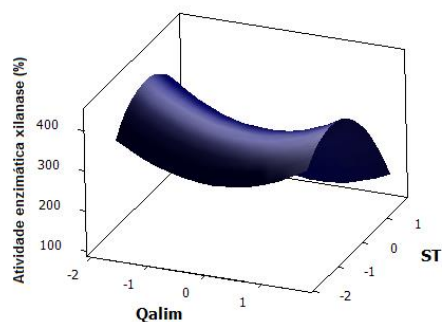
$T_{saída}$ = Temperatura de saída do ar de secagem; ST = teor de sólidos; Q_{alim} = vazão de alimentação

A partir dos dados apresentados, notam-se melhores condições de conservação nas menores vazões de alimentação e teor de sólidos. Tal observação é comprovada pelas superfícies de resposta mostradas na Figura 4.13 e pela condição ótima de secagem obtida pela solução das equações canônicas, que indicou máxima atividade para a vazão de alimentação de 3 mL/min, teor de sólidos 7,5% e temperatura de saída de 83 °C.

Como as análises das atividades enzimáticas para fitases não foram conclusivas, a otimização do processo de secagem foi definida com base nos resultados apresentados para a xilanase.



(A)



(B)

Figura 4.13. Superfície de resposta para atividade enzimática de xilanase para o pós obtidos em *spray dryer* nos ensaios de otimização das condições de secagem, empregando o adjuvante farelo de soja.

Os melhores resultados em baixas vazões de alimentação podem estar relacionados ao fato de atomizadores de duplo-fluido apresentar em eficácia reduzida à medida que a vazão de alimentação do líquido aumenta, uma vez que o ar de atomização age sobre o líquido de forma menos homogênea (AMERI e MAA, 2006).

Embora não conclusivas, nota-se a tendência de melhores atividades enzimáticas em temperaturas mais baixas. Observações similares de impactos da degradação de enzimas relacionados a altas temperaturas de secagem são comumente reportados na

literatura (NAMALDI *et al.* 2006; ANANDHARAMAKRISHNAN *et al.* 2007; YOSHII *et al.* 2008; BÜRKI *et al.* 2011). Estudos sugerem que os efeitos negativos do processo ocorrem no período decrescente de secagem, ou seja, nos últimos estágios do processo, quando a umidade da partícula é baixa e a difusão da água para a superfície da gota não consegue manter a saturação, de modo que a temperatura da gota aumenta, aproximando-se da temperatura de saída do ar de secagem (AMERI e MAA, 2006; SLOTH *et al.* 2009; SCHUTYSER *et al.* 2012).

Em relação ao teor de sólidos, a hipótese de que maiores concentrações de adjuvante resultariam em maior proteção ao bioativo não se sustenta, podendo-se então deduzir que existe um limite para a concentração de adjuvante utilizada abaixo do qual haveria influência desta variável. Possivelmente, maiores concentrações de sólidos resultam em maior adsorção de enzimas, que não são recuperadas dos pós para a análise das atividades após a secagem. Concentrações próximas à encontrada no presente trabalho são reportadas na literatura como adequadas. Sato *et al.* (2014) obteve melhores resultados em ensaio discriminativo de adjuvantes para a secagem de fitases com 10% de farelo de soja. Para Anandharamakrishnan *et al.* (2007) alta concentração de sólidos da solução resulta em uma crosta mais espessa na superfície da partícula que, associado à altas temperaturas do gás de secagem e elevadas taxas de alimentação, resulta na formação rápida de uma massa seca, enquanto o interior ainda está úmido, favorecendo assim a desnaturação das proteínas.

4.6 Ensaio de Armazenamento dos Pós

Os resultados para a estabilidade dos pós, avaliada através das atividades enzimáticas estão apresentados na Figura 4.14. A mesma suspensão preparada para a secagem na condição otimizada em *spray dryer* foi submetida à liofilização (7,5% ST)

para servir de método comparativo na manutenção enzimática dos pós armazenados em temperatura ambiente (25 °C) e sob refrigeração (4 °C).

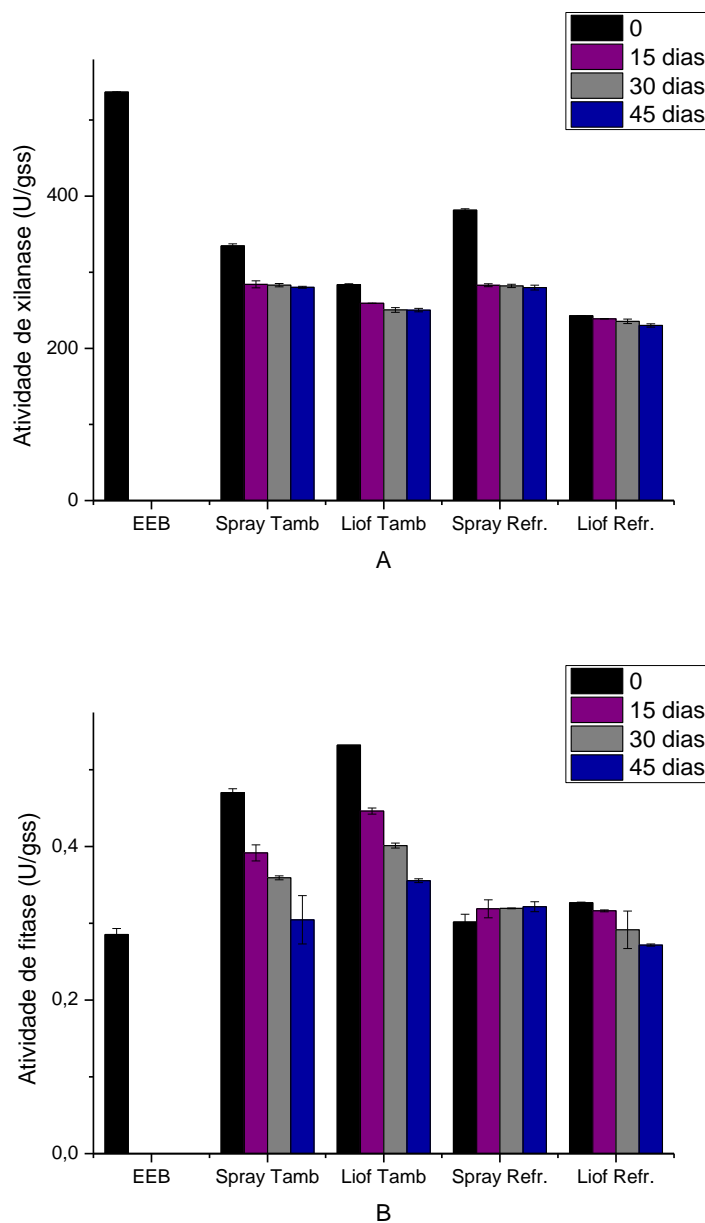


Figura 4.14. Retenção da atividade xilanase (A) e fitase (B) dos pós obtidos por *spray drying* e liofilização na condição ótima, armazenados sob refrigeração (4 °) e no ambiente (25 °).

De acordo com a literatura, a liofilização é o método mais recomendado para a preparação de proteínas desidratadas, as quais devem apresentar elevada retenção enzimática e estabilidade adequada por longo período de armazenagem, quando

comparado ao método de secagem por *spray drying*. Embora os pós liofilizados tenham apresentado boa retenção na atividade ao longo do armazenamento, esses apresentaram menores atividades enzimáticas quando comparadas aos pós secos em *spray dryer*. Isso pode ser explicado pelo processo de liofilização ser feito lentamente, permitindo a interação enzima/adjuvante de forma acentuada, potencializando a dificuldade da extração enzimática dos pós. Isso pode ser observado na Figura 4.14a, onde a redução atividade de xilanase dos pós nos dois métodos de secagem se dá de maneira acentuada quando comparada ao EEB.

Nota-se que a atividade das fitases aumenta após as secagens quando comparadas ao EEB. Ainda que exista dificuldade na determinação das atividades dessa enzima, o mesmo foi observado por Siqueira *et al.* (2013) em secagens de avicelase, CMCase e peptidases produzidas pelo fungo *Trichoderma harzianum* e secas por *spray drying*, utilizando dextrana como adjuvante.

O comportamento observado para fitase e xilanase durante o armazenamento pode ser considerado satisfatório quando comparado à literatura. Neto (2012) obteve comportamento semelhante ao armazenar por 180 dias proteases secas em *spray dryer* com maltodextrina, restando nas melhores condições de secagem, 80% da atividade enzimática quando armazenadas a 25 °C, e 90% de retenção quando armazenadas a 4 °C. Shiota (2014) também observou retenção de 83% atividade enzimática de endoglucanase secas por *spray dryer* com goma arábica armazenadas por 75 dias em temperatura ambiente. Belghith *et al.* (2001) que relatam perda superior a 30% de atividade de endoglucanase imediatamente após a secagem em *spray dryer* e comportamento de queda na retenção de atividade durante o armazenamento a 4 °C e 30 °C a partir de 60 dias de armazenamento. Siqueira *et al.* (2013) no armazenamento de enzimas secas em *spray dryer* com dextrana por 30 dias notaram perda total da

atividade enzimática de peptidases no armazenamento a 25 °C e em alguns experimentos a atividade residual foi menor que 20% nos pós à 4 °C. Ainda no mesmo trabalho, Siqueira *et al.* (2013) reportam queda superior a 50% na retenção da atividade de endoglucanase e avicelase nos pós armazenados a 4 °C.

Segundo Sato *et al.* (2014) a função do carboidrato na proteção da enzima é que este substitui a água que interage com a proteína no meio aquoso e por formar pontes de hidrogênio com a proteína, preserva a estrutura nativa da mesma no estado sólido. A segunda hipótese é a formação de uma matriz cristalina, que protege a estrutura nativa da proteína, dificultando as alterações conformacionais provocadas pelo método de secagem. No entanto, além dos carboidratos, os adjuvantes utilizados no presente trabalho contêm outros compostos químicos em sua composição, como demonstrado na Tabela 1.6 do item 1.5. Sendo assim, suspeita-se da participação das proteínas, lipídeos e minerais contidos no farelo de soja na proteção da enzima, uma vez que esses compostos químicos são capazes de interagir com as enzimas.

5. CONCLUSÕES

Ao final deste estudo, pode-se considerar que houve sucesso em encontrar um microrganismo produtor de fitases e que é possível secar fitases e xilanases empregando-se resíduos sólidos agroindustriais como adjuvantes, sendo que as enzimas preservaram atividades significativas ao longo do armazenamento. Pode-se ainda particularizar as seguintes conclusões:

- Dos treze fungos testados, *Lichtheimia ramosa* foi capaz de produzir fitases em quantidades que pode despertar interesse para produção em larga escala por CES;
- A propoção farelo de trigo/bagaço de cana de açúcar influenciou na produção de fitases bem como o tempo de cultivo;
- No armazenamento do extrato enzimático bruto líquido, as fitases apresentaram tendência à perda da atividade enzimática, explicado pela ocorrência de proteases. A adição do glicerol ao extrato enzimático bruto preservou a atividade da fitase no congelamento;
- A fitase e xilanase apresentaram pH ótimo em condições ácidas e boa estabilidade térmica;
- O adjuvante farelo de soja foi o mais indicado para preservação das atividades de fitase e xilanase após o processo de secagem;
- As atividades das fitases sofreram influência do processo de secagem, mas as análises estatísticas não indicaram influência significativa das variáveis temperatura de saída, vazão de alimentação e teor de sólidos totais, enquanto que para a xilanase a menor temperatura de saída e menor vazão de alimentação foram apontadas como melhores para a conservação da enzima;

- Os pós obtidos na condição ótima apresentaram boa retenção da atividade enzimática durante o armazenamento, sendo essa melhor observada para xilanase.

REFERÊNCIAS

- AEHLE, W. *Enzymes in Industry: Production and Application*. v.2, Holanda, 1990.
- ALMEIDA, M. V. de *et al.* A cascata dos fosfoinositídeos. **Química Nova**, v. 26, n. 1, p. 105-111, jan./fev. 2003.
- AMERI, M.; MAA, Y-F. Spray drying of biopharmaceuticals: stability and process considerations. **Drying Technology**, v.24, p. 763–768, 2006.
- ANAMI, M.H.*et al.* Lixiviação de nitrato e fosfato proveniente de água residuária da suinocultura tratada em sistema de lagoas. v. 12, n. 2, p. 192-201, abr/jun, 2007.
- ANANDHARAMAKRISHNAN, C. *et al.* Effects of process variables on the denaturation of whey proteins during spray drying. **Drying Technology**, v.25, p. 799–807, 2007.
- ANGELO, R. S. Xilanases de *Aspergillus* sp. 2M1: produção, caracterização e aplicação no branqueamento de polpas kraft. Dissertação de mestrado em Química. **Universidade Estadual de Campinas**, 1995.
- ARAUJO, D.M. Avaliação do farelo de trigo e enzimas exógenas na alimentação de frangas e poedeiras. **Dissertação de Mestrado em Zootecnia**, Universidade Federal da Paraíba, 66p. 2005.
- ARAUJO, J.A. *et al.* Uso de aditivos na alimentação de aves. **Acta Veterinária Brasílica**, v.1, n.3, p.69-77, 2007.
- ARNEBRANT, T.; NYLANDER, T. Sequential and competitive adsorption of β -lactoglobulin and λ -casein on metal surfaces. **Journal Colloid Interface Science**, v.111, p.529-533, 1986.
- ASSUENA, V. *et al.* Effect of dietary phytase supplementation on the performance, bone densitometry, and phosphorus and nitrogen excretion of broilers. **Brazilian Journal of Poultry Science**, Campinas, v. 11, n.1, p.25-30, jan/mar, 2009.
- AWAFO, V.A. Biosynthesis of cellulase-system from *Trichoderma reesei* and its characteristics. **Tese de Doutorado em Ciência de Alimentos e Química Agrícola**, Canadá, 1997.
- AZEKE, M.A. *et al.* Purification and characterization of two intracellular phytases from the tempeh fungus *Rhizopus oligosporus*. **Journal of Food Biochemistry**. v.35, p.213-227, 2011.
- BARBOSA, H.P. *et al.* Efeitos dos níveis de flúor provenientes dos fosfatos de tapira e monocalcico no desempenho e característica do osso de suínos em crescimento e terminação. **Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, v.21, p.839-847, 1992.
- BARON, M.H. *et al.* Chymotrypsin adsorption on montmorillonite: enzymatic activity and kinetic FTIR structural analysis. **Journal Colloid Interface Science**, v.214, p.319-332, 1999.
- BEDFORD, M. Nuevas tecnologías en materia de enzimas para piensos de aves de corral. **Congresso Latino-americano de Avicultura**, Panamá, 2005.

- BELGHITH, H. *et al.* Stabilization of *Penicillium occitanis* cellulases by spray drying in presence of Maltodextrin. *Enzyme and Microbial Technology*, v.28, p. 253–258, 2001.
- BELLAVER, C. Uso de resíduos de origem animal na alimentação de frangos de corte. In: SIMPÓSIO BRASIL SUL DE AVICULTURA, 3., 2002, **Anais... Chapecó: SBA**, p. 6-22. 2002.
- BERNAUD, F.S.R.; RODRIGUES, T.C. Fibra alimentar – Ingestão adequada e efeitos sobre a saúde do metabolismo. **Arquivo Brasileiro Endocrinologia e Metabologia**. v.57, n.6, p.397-405, 2013.
- BHANDARI, B.R. e HOWES, T. Implication of Glass Transition for the Drying and Stability of Foods. **Journal Food Engineering**. v. 40, n.1–2, p.71–79, 1999.
- BHANDARI, B.R. *et al.* Problems Associated with Spray Drying of Sugar-Rich Foods. **Drying Technol.** v.15, n.2, p.671–684, 1997.
- BHAVSAR, K. *et al.* High level phytase production by *Aspergillus niger* NCIM 563 in solid state culture: response surface optimization, up-scaling, and its partial characterization. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**. 2010.
- BHAVSAR, K. *et al.* High level phytase production by *aspergillusnigercim* 563 in solid state culture: response surface optimization, up-scaling, and its partial characterization. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**. p. 1407-1417, 2001.
- BIELY, P. Microbial xylanolytic systems. **Trends in Biotechnology**, v.3, p. 286–295, 1985.
- BISWAS, S.R. *et al.* Xylanase and β -xylosidase production by *Aspergillus ochraceus* during growth on lignocelluloses. **Biotechnology and Bioengineering**, v.31, p.613 – 616, 1988.
- BOS, M.A. *et al.* Influence of the electric potential of the interface on the adsorption of proteins. **Colloids Surfaces B**, v. 3, p.91-100, 1994.
- BRENDA ENZYMES: Disponível em: http://www.brendaenzymes.org/search_result.php?a=9&T%5B2%5D=2&T%5B0%5D=1&RNV=1&V%5B3%5D=7&T%5B5%5D=1&T%5B1%5D=1&W%5B2%5D=phytase&submit_button=Search&l=10. Acesso em 15 de novembro de 2014.
- BÜRKI, K. *et al.* New insights into respirable protein powder preparation using a nano spray dryer. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 408, p.248–256, abril, 2011.
- BÚTOLO, J.E. Qualidade de ingredientes na alimentação animal. Campinas. [s.n], p.430. 2002.
- CAMPESTRINI, E. *et al.* Utilização de enzimas na alimentação animal. **Revista Eletrônica Nutritime**. v. 2, n.6, p.254-267, 2005.
- CAO, L. *et al.* Application of microbial phytase in fish feed. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, p. 497–507, 2007.
- CARPENTER, J.F. *et al.* Rational design of stable lyophilized protein formulations: some practical advice. **Pharmaceutical Research**, v.14, p. 969-975, 1997.

CARRÉ, B. Causes for variation in digestibility of starch among feedstuffs. **Poultry Science**. v.60 p. 76-89, 2004.

CASCIATORI, F. P. Biorreatores de leite fixo para fermentação em estado sólido: ampliação de escala para produção de celulases de origem fúngica. **Relatório Científico Parcial de Bolsa de Doutorado**. São Paulo: FAPESP, 2014.

CASEY, A.; WALSH, G. Purification and characterization of extracellular phytase from *Aspergillus niger* ATCC 9142. **Bioresource Technology**.v. 86, n.2, p.183-188, 2003.

CHANG, L.; PIKAL, M.J. Mechanisms of protein stabilization in the solid state. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.98, p.2886–2908, 2009.

CHANTASARTRASAMEE, K. *et al.* Phytase activity from *Aspergillus oryzae* AK9 cultivated on solid state soybean meal medium. **Process Biochemistry**, v.40, n.7, p.2285-2289, 2005.

CHARLTON, P. Expanding enzyme application: higher amino acid and energy values for vegetable proteins. **Biotechnology in the feed industry**, v.12, p.317-326, 1996.

CHOCT, M. Feed non-starch polysaccharides: chemical structures and nutritional significance. **Feed Milling International**, p.13-26, jun, 1997.

COLLINS, T. *et al.* Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. **FEMS Microbiology Reviews**. v. 29, p.3–23, 2005.

COLLOPY, P. D.; ROYSE, D. J. Characterization of Phytase Activity from Cultivated Edible Mushrooms and Their Production Substrates. **Journal Agricultural Food Chemistry**. v. 52, n. 25, p. 7518-7524, 2004.

COMPANIES AND MARKETS – Disponível em: <http://www.companiesandmarkets.com/Market/Industrial/All?Sectors=IS1013&Keywords=enzyme&SearchType=Phrase&OrderByType=Date&ReportPublishType=All&Publishers=-1>

Acesso em 13 de Agosto de 2014.

CONTE, A.J., *et al.* Efeito da fitase e xilanase sobre o desempenho e as características ósseas de frangos de corte alimentados com dietas contendo farelo de arroz. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v. 32, n.5, p.1147-1156, 2003.

CORRÊA, L. B; CORRÊA, E. K. Estudo das fontes poluidoras em uma granja produtora de suínos: uma perspectiva de educação ambiental – estudo de caso. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALIZADOS EM SUÍNOS, 11, **Anais... Concórdia: EMBRAPA Suínos e Aves**, p. 447-448, Goiânia, 2003.

COSTA F.G.P. *et al.* Efeito da enzima fitase nas rações de frangos de corte, durante as fases pré-inicial e inicial. **Ciências e Agrotecnologia**. v. 31, p.865-870, 2007.

COSTA, M. *et al.* Phytase production by *Aspergillus ficuum* in submerged and solid state fermentation using agroindustrial waste as support. **Revista colombiana biotecnologia**, v. 11, n.1, p.73-83, 2009.

COSTA-SILVA, T. A. Caracterização bioquímica e secagem em “spray dryer” de lípases produzidas pelo fungo endofítico *Cercospora kikuchii*. Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo, 2010.

COSTA-SILVA, T.A. *et al.* Stabilization of endophytic fungus *Cercospora kikuchii* lipase by spray drying in the presence of maltodextrin and b-cyclodextrin. **Drying Technology**, v.28, p.1245–1254, 2010.

COUSINS, B. Enzimas na nutrição de aves. I Simpósio Internacional ACAV—**Embrapa sobre Nutrição de Aves**. Santa Catarina, nov., 1999.

COUTO,S.R.; SANROMÁN, M.A. Application of solid-state fermentation to food industry—A review. **Journal of Food Engineering**, v.76, p. 291–302, 2006.

COWIESON, A.J.; ADEOLA, O. Carbohydrase, protease and phytase have an additive beneficial effect in nutritionally marginal diets for broiler chicks. **Poultry Science**, n.84, p. 1860-1867, 2005.

DA SILVA, R. *et al.* Pectinases, Hemicelulases e Celulases, Ação, Produção e Aplicação no Processamento de Alimentos: **Revisão. Boletim da SBCTA**. v. 31, n.2, p. 249 – 260, 1997.

DA SILVA-LÓPEZ, R.E. Proteases de *Leishmania*: novos alvos para o desenvolvimento racional de fármacos. **Química Nova**, v. 33, n. 7, p.1541-1548, 2010

DAMASO, M.C.T. *et al.* Application of xylanase from *Thermomyces lanuginosus* IOC-4145 for enzymatic hydrolysis of corncob and sugarcane bagasse. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 113-116, p. 1003-1012, 2004.

DEMIRBAS, F.M. *et al.* Biowastes-to-biofuels, **Energy Conversion and Management**, v. 52, p. 1815–1828, 2011.

DePAZ, R.A. *et al.* Effects of drying methods and additives on the structure, function, and storage stability of subtilisin: role of protein conformation and molecular mobility. **Enzyme Microbiology Technology**, v.31, p. 765–774, 2002.

DHRUV, H.D. Controlling nonspecific adsorption of proteins at bio-interfaces for biosensor and biomedical applications. Dissertação de Doutorado em Engenharia Biológica. **Universidade Estadual de Utah**. 2009.

DOMINGUES, G.S. *et al.* Micropartículas nanorrevestidas contendo um fármaco modelo hidrofóbico: preparação em etapa única e caracterização biofarmacêutica. **Química Nova**. v.31 n.8 São Paulo, 2008.

DURAND, A. *et al.* Laboratory scale bioreactor for solid state processes. **Journal of Biotechnology**, v. 8, p. 59–66, 1988.

EL-GINDY, A.A. *et al.* Extracellular Phytase Production by Solid-state Cultures of *Malbranchea sulfurea* and *Aspergillus Niveus* on Cost-effective Medium. **Research Journal of Agriculture and Biological Sciences**, v. 5, p. 42-62, 2009.

- ELVERSSON, J.E.; A. MILLQVIST-FUREBY, A. Particle size and density in spray drying—effects of carbohydrate properties. **Journal of Pharmaceutical Science** . v.94, p.2049–2060, 2005.
- ENGELEN, A. J. *et al.* Simple and rapid determination of phytase activity. **Journal of AOAC International**, v.77, n.3, p.760-764, 1994.
- ENZYME AND MICROBIAL TECHNOLOGY, New York, v. 35, n. 1, p. 3-14, julho, 2004.
- ESAKKIRAJ, P. *et al.* Preliminary optimization of solid-state phytase production by moderately halophilic *Pseudomonas* AP-MSU 2 isolated from fish intestine. **Annals of Microbiology**, v. 60, n. 3, p.461-468, 2010.
- ESTEVES, B.N. Influência do processo de secagem por pulverização mecânica (spray dryer) no tamanho de partícula e densidade aparente do café solúvel. Dissertação de Mestrado em Engenharia Química. **Universidade de São Paulo**, 2006.
- FARRANT, J. Mechanism of cell damage during freezing and thawing and its prevention. **Nature**, v. 205, p. 1284-7, 1965.
- FEIGIN, A. *et al.* Irrigation with treated sewage effluent, management for environmental protection. **Advanced Series in Agricultural Sciences**. Berlin, 1990.
- FERNANDES, M.L.M. Produção de lipases por fermentação no estado sólido e sua utilização em biocatálise. **Dissertação de Doutorado em Química**, Curitiba, 2007.
- FERREIRA, M.A.M, *et al.* Avaliação financeira, de riscos e de custos de transação envolvidos na internalização da produção de ração na suinocultura. **Organizações Rurais & Agroindustriais**, v. 15, n. 2, p. 194-205. Lavras, 2013
- FLENDER, L. *et al.* Effects of laccase and xylanase on the chemical and rheological properties of oat and wheat doughs. **Journal Agricultural Food Chemistry**, v.56, n.14, p. 5732–5742, 2008.
- FREEDONIA GROUP – World Enzyme to 2017. Disponível em: <http://www.rnrmarketresearch.com/world-enzymes-to-2017-marketreport.html?vsmid=1079>. Acesso em 25 de novembro de 2014.
- FU, S. *et al.* Effect of Ca²⁺ on beta-propeller phytases. **Protein and Peptide Letters**. v. 15, n. 1, p. 39-42, 2008.
- GARCIA, M.I. *et al.* α - Amilase supplementation of broiler diets based on corn. **Poultry Science**. v.82, p.436-442, 2003.
- GAUTHIER, R. La salud intestinal: clave de la productividad - El caso de los ácidos orgánicos. **Jefo Nutrition Inc**. Puerto Vallarta, 2002.
- GHARSALLAOUI, A. *et al.* Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. **Food Research International**. v.40, p.1107–1112, 2007.
- GHOSE, T.K. Measurement of cellulase activities. **Pure & Applied Chemistry**, v.59, p. 257-268, 1997.

- GIRIO, F.M. *et al.* Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. **Bioresource technology**, v. 101, p. 4775–4800, 2010.
- GODOI, M.J.S. *et al.* Utilização de aditivos em rações formuladas com milho normal e de baixa qualidade para frangos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v.37, n.6, p.1005-1011, 2008.
- GOMES, E. *et al.* Enzimas termoestáveis: fontes, produção e aplicação industrial, **Química Nova**, v.30, 2007.
- GOMES, E. *et al.* Ligninases production by basidiomicetes strains on lignocellulosic agricultural residues and decolorization of synthetic dyes. **Journal Biotechnology**. v.131, p. 228, 2007.
- GOMES, P.C. *et al.* Disponibilidade de fósforo nos fosfato de tapira, fosforíndus e na farinha de ossos para suínos. **Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, v.21, p.83-89, 1992.
- GONÇALVES, F.A. *et al.* Isolation, identification and characterization of a novel high level β -glucosidase-producing *Lichtheimia ramosa* strain. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**. v.2, p.377–384, 2013.
- GREINER, R. *et al.* Stereospecificity of myo-inositol hexakisphosphate dephosphorylation by a phytate-degrading enzyme of baker's yeast. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.49, n.5, p.2228-2233, 2001.
- GREINER, R. *et al.* Stereospecificity of myo-Inositol hexakisphosphate dephosphorylation by a phytate-degrading enzyme of *Escherichia coli*. **Journal of Biotechnology**. v. 84, n.1, p.53-62, 2000.
- GREINER, R. *et al.* The pathway of dephosphorylation of myo-inositol hexakisphosphate by phytate-degrading enzymes of different *Bacillus* spp. **Canadian Journal of Microbiology**. v. 48, n.11, p.986-994, 2002.
- GREINER, R.; KONIETZNY, U. Construction of a bioreactor to produce special breakdown products of phytate. **Journal Biotechnology**. v. 48, p. 153–159, 1996.
- HAIFENG, Y. *et al.* Near-Infrared Reflectance Spectroscopy-Based Methods for Phytase Registration in Feed Industry. **Journal Agricultural Food Chemistry**. v. 55, p.7667-7675, 2007.
- HAKI, G.D.; RAKSHIT, S.K. Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. **Bioresource Technology**, v. 89, p.17–34, 2003.
- HALTRICH, D. *et al.* Production of fungal xylanases. **Bioresource Technology**, v. 58, p.137 – 161, 1996.
- HAMIN NETO, Y.A.A. Fermentação, purificação, caracterização bioquímica e microencapsulação de protease produzida pelo fungo *Eupenicillium javanicum*. Dissertação de Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos – **Universidade de São Paulo**, Ribeirão Preto, 2012.

HANNAS, M.I.; PUPA, J.M.R. Enzimas: uma alternativa viável para enfrentar a crise na suinocultura. Acessado em 20 agosto de 2013. Disponível em: http://www.engormix.com/enzimas_uma_alternativa_viavel_p_artigos_26_POR.htm. 2007.

HARTREE, E. F. Determination of protein: A modification of the lowry method that gives a linear photometric response. **Analytical Biochemistry**, v.48, n.2, p.422-427, 1972.

HEINONEN, J.K.; LAHTI, R.J. A new and convenient colorimetric determination of inorganic orthophosphate and its application to the assay of inorganic pyrophosphatase. **Anal Biochemistry**. v. 113, p.313–317, 1981.

HELBERT, R., SHARP, R. Molecular Biology and Biotechnology of Extremophiles. **Chapman and Hall**, 1992.

HÖLKER, U.; LENZ, J. Solid-state fermentation- are there any biotechnological advantages. **Current Opinion in Microbiology**, v. 8, p. 301- 306, 2005.

IN, M-J. *et al.* Fermentative production and application of acid phytase by *Saccharomyces cerevisiae* CY strain. **African Journal of Biotechnology**. v. 7, n.17, p.3115-3120, 2008.

KIMURA, I., SASAHARA, H. AND TAJIMA, S. Purification and characterization of two xylanases and an arabinofuranosidase from *Aspergillus sojae*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**. v. 80, p.334-339, 1995.

KONDO, A.; URABE, T.: Temperature dependence of activity and conformational changes in α -amylases with different thermostability upon adsorption on ultrafine silica particles. **Journal Colloid Interface Science**, v.174, p.191-198, 1995.

KONIETZNY, U.; GREINER, R. Molecular and catalytic properties of phytate-degrading enzymes (phytases). **International Journal of Food Science & Technology**. v.37, n.7, p. 791–812, out, 2002.

KORMELINK, F. J. M.*et al.* Purification and characterisation of three endo (1,4)- β -xylanases and one β -xylosidase from *Aspergillus awamori*. **Journal Biotechnology**.v. 27, p.249-253, 1993.

KORNEGAY, E. T. Digestion of phosphorus and other nutrients: the role of phytases and factors influencing their activity. **Enzymes in farm animal nutrition**. p. 237-271. 2001.

KRONBAUER, E.A.W.*et al.* Produção de xilanase por *Aspergillus casei* com diferentes fontes de carbono. **Boletim de centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**, Curitiba v. 25, n. 2, p. 207-216 jul.dez. 2007

KULKARNI, N. *et al.* Molecular and biotechnological aspects of xylanases. **FEMS Microbiology**, v.23, p.411 – 456, 1999.

LEI, X. G.; PORRES, J. M. Phytase enzymology, applications, and biotechnology. **Biotechnology Letters**, v. 25, n. 21, p. 1787-1794, 2003.

LEMOS J.L.S., FONTES M.C.A. and PEREIRA N.J. Xylanase production by *Aspergillus awamori* in solid-state fermentation and influence of different nitrogen sources. **Applied Biochemical Biotechnology**. v. 91, p. 681-689, 2001.

- LIAO, Y.H. *et al.* Investigation of the physical properties of spray-dried stabilized lysozyme particles. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.55, p.1213-1223, 2003.
- LIEBERT, F. *et al.* Phytase activities in different gut contents of chickens as dependent on level of phosphorus and phytase supplementations. In: **Symposium Kartause Ittingen: Enzymes In Animal Nutrition**, Switzerland, p.202-205, 1993.
- LIMA, M.R. *et al.* Enzimas exógenas na alimentação de aves. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.1, n.4, p.99-110, 2007.
- LOMBRAÑA, J. I.; IZKARA, J. Experimental estimation of effective transports coefficients in freeze drying for simulation and optimization purposes. **Drying Technology**, v.14, n.3, p. 743-763, 1996.
- LUTTRELL, B. M. The biological relevance of the binding of calcium ions by inositol phosphates. **Journal of Biological Chemistry**, v. 268, n. 3, p. 1521-1524, 1993.
- MACIEL, G.M. Desenvolvimento de bioprocesso para produção de xilanases por fermentação no estado sólido utilizando bagaço de cana de açúcar e farelo de soja. Dissertação de Mestrado em Processos Biotecnológicos. **Universidade Federal do Paraná**. 2006.
- MAGA, J.A. Phytate: its chemistry, occurrence, food interactions, nutritional significance, and methods of analysis. **Journal Agricultural Food Chemistry**, v.30, n.1, p. 1–9, 1982.
- MARTINS, E.S. *et al.* Perfil enzimático produzido pelo fungo termofílico *Thermoascus aurantiacus* através de fermentação em estado sólido e fracionamento de uma poligalacturonase termoestável. **Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas**, UNESP, 2003.
- MASTERS, K. Powder and Bulk Engineering, p.36 – 44, 1996.
- MASTERS, K. Spray drying, **Advances Drying**. v. 1, p.269-298, 1980.
- MATSUDA, J. Mercado de suplementação animal e seus desafios. **Especial Associação Brasileira das Indústrias de Suplementos Minerais**. Mar, 2013.
- MERHEB C.W. *et al.* Partial characterization of protease from a thermophilic fungus, *Thermoascus aurantiacus*, and its hydrolytic activity on bovine casein. **Food Chemistry**. v.104, p. 127–131, 2007.
- MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v.31, p. 426 – 428, 1959.
- MILLQVIST-FUREBY, A. *et al.* Spray-drying of trypsin — surface characterisation and activity preservation. **International Journal of Pharmaceutics**, v.188, p. 243–253, 1999.
- MITCHELL, D.A. *et al.* Solid-state fermentation bioreactors – **Fundamentals of design and operation**. Nova York, 2005.
- MORAIS B.M.; JACOB C.M.A. O papel dos probióticos e prebióticos na prática pediátrica. **Jornal de Pediatria**. v. 82, p.189-197, 2006.

- MORETTI, M.M.S. Isolamento de fungos termofílicos produtores de celulases, xilanases e ferruloil esterase para bioconversão de bagaço de cana de açúcar em açúcares fermentescíveis. Dissertação de Mestrado em Microbiologia Aplicada. Universidade Estadual Paulista, 112p, 2010.
- MULLANEY, E.J.; ULLAH, A.H.J. The term phytase comprises several different classes of enzymes. **Biochemical Biophysical Research Communications**, v.312, p.179–184, 2003.
- MURTUMAA, M. *et al.* Static Electrification of Powders during Spray Drying. **Journal of Electrostatics**. v.62,p.63-72, 2004.
- NAKANISHI, K. *et al.* On the adsorption of proteins on solid surfaces, a common but very complicated phenomenon. **Journal Bioscience and Bioengineering**, v. 91, n. 3, p.233-244, 2001.
- NAMALDI, A. *et al.* Effects of Spray Drying Temperature and Additives on the Stability of Serine Alkaline Protease Powders. **Drying Technology**, v.4, p.1495–1500, 2006.
- NASCIMENTO, J.C.S. Produção, caracterização bioquímica e purificação de fitase produzida por *Aspergillus niger* var. *phoenicis* URM 4924. Dissertação de Mestrado em Biociência Animal. Universidade Federal Rural de Pernambuco. 115p. 2011.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL. Nutrient requirements of poultry. **National Academy of Science**.v.9, p.155. 1994.
- NAVES, L.P. Metodologias para quantificar fitato e uso de fitases em rações para frangos de corte. Dissertação de Doutorado em zootecnia. **Universidade Federal de Lavras – MG**, 2012.
- NELSON, T. S. *et al.* The availability of phytate phosphorus in soybean meal before and after treatment with a mold phytase. **Poultry Science**, v.47, p.1842-1848, 1968.
- NEVES, M.L.C. *et al.* *Lichtheimia blakesleeana* as a new potencial producer of phytase and xylanase. **Molecules**. v. 16, p.4807-4817, 2011.
- Ó'FÁGÁIN, C. Stabilizing Protein Function. Springer, 1997.
- OH, B. C. *et al.* Ca²⁺ inositol phosphate chelation mediates the substrate specificity of β -propeller phytase. **Biochemistry**, v.45, n.31, p.9531-9539, 2006.
- OLIVEIRA, M. C.; MORAES, V. M. B. Mananoligossacarídeos e enzimas em dietas à base de milho e farelo de soja para aves. **Ciência Animal Brasileira**. v.8, n.3, p.339-357, Goiânia, 2007.
- OLIVEIRA, R. A. *et al.* Influência da aplicação de águas residuárias de suinocultura na capacidade de infiltração de um solo podzólico vermelho-amarelo. **Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 4, n.2, p. 263-267, 2000.
- ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. Norma general para los aditivos alimentarios. **CODEX STAN**, 1995.

- PAIK, I. Application of phytase, microbial or plant origin, to reduce phosphorus excretion in poultry production. **Journal Animal Science**. v.16, n.1, p.124-135, 2003.
- PALMA, M.B. Produção de xilanases por *Thermoascus aurantiacus* em cultivo em estado sólido. **Dissertação de Doutorado em Engenharia Química**. Universidade Federal de Santa Catarina, 2003.
- PALOHEIMO, M. et al. Xylanases and cellulases as feed additives. **Enzymes in farm animal nutrition**. Cap.2, p.12-53, 2011.
- PANDEY, A. et al. Biofuels: Alternative Feedstocks and Conversion Processes. **Academic Press**, Reino Unido, v.1, 2011.
- PANDEY, A. et al. Production purification and properties of microbial phytases. **Bioresource technology**. v.77, p.203 – 214, 2001.
- PANDEY, A. Recent process developments in solid state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 27, p. 109–117, 1992.
- PELICIA, K. et al. Utilização de promotores biológicos para frangos de corte tipo colonial. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v.6, p.21, 2004.
- PERRY, R. H.; GREEN, D. W. Perry's Chemical Engineers' Handbook. Nova York, 1997.
- PIOVESAN, V. et al. Milhos com diferentes texturas de endosperma e adição de alfa-amilase na dieta de leitões. **Ciência Rural**. Rio Grande do Sul, 2011.
- POLIZELI, M.L.T.M. et al. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 67, n.5, p. 577–591, 2005.
- QUIRRENBACH, H. R. et al. Comportamento do ácido fítico na presença de Fe(II) e Fe(III). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 29, n. 1, p. 24-32, jan./mar, 2009.
- RAGON, M. et al. Complete hydrolysis of myo-inositol hexakisphosphate by a novel phytase from *Debaryomyces castellii* CBS 2923. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 78, n. 1, p. 47-53, 2008.
- RAMOS, L. P. The chemistry involved in the pretreatment of lignocellulosic materials. **Química Nova**, v.26, p. 863-871, 2003.
- RANI, R. et al. Recent advances in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 44, p. 13–18, 2009.
- RATTI, C. Hot air and freeze-drying of high-value foods: a review, **Journal of Food Engineering**. v.49, p. 311-319, 2001.
- RAVINDRAN, V. et al. A comparison of ileal digesta and excreta analysis for the determination of amino acid digestibility in food ingredients for poultry. **British Poultry Science**. v.40, n.2, 1999.
- RAVINDRAN, V. et al. Phytases: occurrence, bioavailability and implications in poultry nutrition. **Poultry and Avian Biology Reviews**, v. 6, n. 2, p. 125-143, 1995.

- RODRIGUEZ, S.; SAROMÁN, M. Application of solid-state fermentation to ligninolytic enzyme production. **Biochemical Engineering Journal**, v. 22, p. 11–219, 2005.
- ROOPESH, K. *et al.* Comparison of phytase production on wheat bran and oilcakes in solid-state fermentation by *Mucor racemosus*. **Bioresource Technology**, v. 97 p. 506–511, 2006.
- ROSA, E.D. *et al.* Secagem por atomização na indústria alimentícia: fundamentos e aplicações. **Depto de engenharia - Labmaq do Brasil LTDA**, 2003.
- ROSTAGNO, H. S. *et al.* Avanços metodológicos na avaliação de alimentos e de exigências nutricionais para aves e suínos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.36, p.295-304, 2007.
- ROSTAGNO, H. S. *et al.* Tabelas brasileiras para aves e suínos: composição de alimentos e exigências nutricionais. **Universidade Federal de Viçosa**. p.252, 2011.
- ROUSTAPOUR, O.R. *et al.* An experimental investigation of lime juice drying in a pilot plant spray dryer. **Drying Technology**, v.24, p. 18 –188, 2006.
- SABOTO, D. *et al.* The β -glycosidase from the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*: enzyme activity and conformational dynamics at temperatures above 100°C. **Biophysical Chemistry**, v.81, p. 23–31, 1999.
- SABU, A.*et al.* Solid-state fermentation for production of phytase by *Rhizopus oligosporus*. **Applied Biochemistry and Biotechnology** , v. 102-103, n.1-6, p.251-260, 2002.
- SAMBORSKA, K. *et al.* Spray-drying of α -amylase: the effect of process variables on the enzyme inactivation. **Drying Technology**, v. 23, p. 941–953, 2005.
- SARATALE, G.D.*et al.* Production and characterization of multiple cellulolytic enzymes by isolated *Streptomyces* sp. **MDS. Biomass and Bioenergy**, v. 47, p. 302-315, 2012.
- SATO, R.N. *et al.* Uso de antibiótico e/ou probiótico como promotores de crescimento em rações iniciais de frangos. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**. v. 4, 2002.
- SATO, S.S. *et al.* Phytase production by *Rhizopus microsporus* var. *microsporus* biofilm: characterization of enzymatic activity after spray drying in presence of carbohydrates and nonconventional adjuvants. **Journal Microbioly Biotechnoly**, v.24, p.177–187, 2014.
- SCHERSCH, K. *et al.* Systematic investigation of the effect of lyophilizate collapse on pharmaceutically relevant proteins I: stability after freeze-drying. **Journal of Pharmaceutical Sciences**. v.99, p.2256-2278, 2010.
- SCHUTYSER, M.A.I., PERDANA, J., BOOM, R.M. Single droplet drying for optimal spray drying of enzyme and probiotics. **Trends in Food Science & Technology**, p.1- 10, 2012
- SCHWARTZE, V.U. *et al.* The pathogenic potential of the *Lichtheimia* genus revisited: *Lichtheimia brasiliensis* is a novel, non-pathogenic species. **Mycoses**, v.57, p.1–4, 2014.
- SCHWARTZE, V.U.; JACOBSEN, I.D. Mucormycoses caused by *Lichtheimia* species. **Mycoses**, v.57, p.1–6, 2014.

- SCHWARZ, K.K. Substituição de antimicrobianos por probióticos e prebióticos na alimentação de frangos de corte. **Dissertação de Mestrado em Ciências Veterinárias**, Universidade Federal do Paraná, 2002.
- SEBASTIAN, S. *et al.* Implications of phytic acid and supplemental microbial phytase in poultry nutrition: a review. **World Poultry Science Journal**. v.54, p.27-47, 1998.
- SEGUEILHA, M. *et al.* Purification and properties of the phytase from *Schwanniomyces castellii*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**. v. 74, p.7-11, 1992.
- SELIVANOV, A.S.; Stabilization of cellulases using spray drying, **Engineering Life Science**. v.5, p.78–80, 2005.
- SELLE, P. H. *et al.* Consequences of calcium interactions with phytate and phytase for poultry and pigs. **Livestock Science**, v. 124, n. 1/3, p. 126-141, set, 2009.
- SELLE, P. H.; RAVINDRAN, V. Microbial phytase in poultry nutrition. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 135, n. 1/2, p. 1-41, 2007.
- SERAFIM, R. S.; LUCAS JUNIOR, J. Fósforo e nitrogênio nos dejetos de suínos produzidos sob diferentes sistemas de higienização das baias. In: Congresso brasileiro de veterinários especializados em suínos, **Anais... Concórdia: EMBRAPA Suínos e Aves**, Goiânia. p. 449-450, 2003.
- SHIEH, T.R.; WARE, J.H., Survey of microorganisms for the production of extracellular phytase. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.16, n.9, p.1348-1351, 1968.
- SHIN, S. *et al.* Enzyme mechanism and catalytic property of β propeller phytase. **Structure, Philadelphia**, v. 9, n. 9, p. 851-858, 2001.
- SHIOTA, V.M. Secagem de celulases de origem fungica por *spray-drying*. Dissertação de Mestrado em Engenharia de Alimentos. **Universidade Estadual Paulista**, 2014.
- SILVA, A.R.Z.*et al.* Produção de fitase por fermentação no estado sólido utilizando biorresíduos agrícolas para a aplicação como aditivo na alimentação animal. **Universidade Federal do Paraná**, 2003.
- SILVA, C.A.A. *et al.* Physiology of *Lichtheimia ramosa* obtained by solid-state bioprocess using fruit wastes as substrate. **Bioprocess Biosystem Engineering**. n.37, p.727–734, 2014.
- SINGH B. *et al.* Developments in biochemical aspects and biotechnological applications of microbial phytases. **Biotechnology and Molecular Biology Reviews**, v. 6, p. 69–87, 2011.
- SINGH, B., SATYANARAYANA, T. Phytase production by a thermophilic mould *Sporotrichum thermophile* in solid state fermentation and its potential applications, **Bioresource Technology**, v. 99, p. 2824–2830, 2008.
- SINGHANIA, R.R. *et al.* Recent advances in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v.44, p.13–18, 2009.

- SIQUEIRA, A.C.R. *et al.* Optimization of the drying parameters for an enzymatic extract, and an evaluation of the subsequent proteolytic and cellulolytic activities. **Biochemistry and Biotechnology Reports**.v.2. p.17, 2013.
- SLOMINSKI, B. Recent advances in research on enzymes for poultry diets. **Poultry Science**, v. 90, n. 9, p. 2013-2023, set. 2011.
- SLOTH, J. *et al.* Spray drying of suspensions for pharma and bio products: drying kinetics and morphology. **Industrial and Engineering Chemical Research**. v.48, p. 3657–3664, 2009.
- SLOTH, J.*et al.* Evaluation method for the drying performance of enzyme containing formulations. **Biochemistry Engineering Journal**, v.40, p.121–129, 2008.
- SMITH, C.H.M.; ANNISON, G. Non-starch plant polysaccharides in broiler nutrition towards a physiologically valid approach to their determination. **World's Poultry Science Journal**. n.52, 203–221. 1996.
- SORBARA, J.O.B. Carboidrases em programas enzimáticos de rações para frangos de corte. **Dissertação de Doutorado em Zootecnia**. Universidade Estadual de Maringá, 2008.
- SOTO-SALANOVA, M.F. *et al.* Uso de enzimas em dietas de milho e soja para frangos de corte. **Conferência Apinco De Ciência E Tecnologia Avícolas**, 1996, Curitiba. Anais...Curitiba, p.71-76, 1996.
- SPIER, M. R. *et al.* Phytase produced on citric byproducts: purification and characterization. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**. v.27, p.267-274, 2011.
- SPIER, M.R. *et al.* Relation between respirometric data and amylolytic enzyme production by SSF in column-type bioreactor. **International Journal Chemical Reactor Engineering** .v.5, 2007.
- STEFAN, H. *et al.* Biotechnological production and applications of phytases. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 68, p. 588–97, 2005.
- STRAMBINI, G.B.; GABELLIERI, E. Proteins in Frozen Solutions: Evidence of Ice-induced Partial Unfolding. **Biophysical Journal**, v.70, p.71-976, 1996.
- SZENGYEL, Z. Ethanol from wood: cellulase enzyme production. **Tese de Doutorado**. Departamento de Engenharia Química, Suécia, 2000.
- TAMIM, N. M. *et al.* Influence of dietary calcium and phytase on phytate phosphorus hydrolysis in broiler chickens. **Poultry Science**, v. 83, n. 8, p. 1358-1367, 2004.
- TATTINI JUNIOR, V. *et al.* Influência da taxa de congelamento no comportamento físico-químico e estrutural durante a liofilização da albumina bovina. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. vol. 42, n. 1, 2006.
- TAUSSKY, H.H.; SHORR, E. A microcolorimetric method for the determination of inorganic phosphorus. **Journal of Biological Chemistry**. v. 202, p.675–685, 1953.

- TAVERNARI, F. C. *et al.* Polissacarídeos não amiláceo solúvel na dieta de suínos e aves. **Revista Eletrônica Nutritime**, v.5, n.5, p. 673-689, 2008.
- TEIXEIRA, G.A. Estudo da produção de monacolina k por *Monascus Ruber* Van Tiegham e secagem do extrato por *spray dryer*. 2007, 125p. Dissertação (Mestrado em Medicamentos e Cosméticos); **Universidade de São Paulo**, Brasil, 2007.
- TEIXEIRA, L.V.; Misturas enzimáticas em rações para frango de corte. **Dissertação de Mestrado em Zootecnia**. Universidade Federal de Lavras. 72p, 2013.
- THAKORE, Y. Enzymes for industrial applications (BIO030E). **BCC Research**. 2008.
- TORRES, D.M. *et al.* Eficiência das enzimas amilase, protease e xilanase sobre o desempenho de frangos de corte. **Ciências Agrotécnicas**. v. 27, n.6, p.1404-1408, 2003.
- UENOJO, M; PASTORE, G.M. PECTINASES: APLICÇÕES INDUSTRIAIS E PERSPECTIVAS. **Química Nova**, v. 30, n. 2,p. 388-394, 2007.
- VASSILEV, N. *et al.* Simultaneous phytase production and rock phosphate solubilization by *Aspergillus niger* grown on dry olive wastes. **Industrial Crops and Products**, v. 26, p. 332-336, 2007.
- VATS, P.; BANERJEE, U. C. Production studies and catalytic properties of phytases (myo-inositolhexakisphosphate phosphohydrolases): an overview. **Enzyme and Microbial Technology**. v.35, p. 3-14, 2004.
- VITTI, D.M.S.S. *et al.* A kinetic model of phosphorus metabolism in growing goats. **Journal of Animal Science**, v.78, p.2706-2712, 2000.
- WALSH, G.A. *et al.* Enzymes in the animal feed industry. **Trends in Biotechnology**., v.11, n.10, p.946-957, 1993.
- WANG, J.J. *et al.* Beneficial effects of versazyme, a keratinase feed additive, on body weight, feed conversion, and breast yield of broilers chickens. **Journal of Applied Poultry Research**. v.15, p.544-550, 2006.
- WANG, S. e LANGRISH, T. Measurements of the crystallization rates of amorphous sucrose and lactose powders from spray drying, **International Journal of Food Engineering**. v. 3, n.4, p. 1-17, 2007.
- WANG, W. Lyophilization and development of solid protein pharmaceuticals. **International Journal Pharmaceutics**. v.203, p.1-60, 2000.
- WILLIAMS, P.E.V. Animal production on feed enzyme to commercial wheat and barley based poultry feeds. Proceedings of the California Nutrition Conference, Davis, **University of California**, p. 203-211, 1995.
- WONG, K.K.Y. *et al.* Multiplicity of β -1,4 Xylanase in Microorganisms: Functions and Applications. **Microbiological Reviews**. v.52, n.3, p. 305 – 317, 1988.
- WOODWARD, J. Xylanases: functions, properties and applications. **Topics Enzyme Fermentation Biotechnology**, Amsterdam, v. 8, p. 9-30, 1984.

WYATT, C. *et al.* Mechanisms of action for supplemental NSP and phytase enzymes in poultry diets. **Poultry Nutrition Conference**.n. 5., p.1-11, 2008.

YOSHII, H. *et al.* Effects of protein on retention of ADH enzyme activity encapsulated in trehalose matrices by spray drying. **Journal of Food Engineering**, v.87, p.34 – 39, 2008.

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

ZANELLA, I. Suplementação enzimática em dietas avícolas. In: PRÉ-SIMPÓSIO DE NUTRIÇÃO ANIMAL: AVES E SUÍNOS, Santa Maria, RS. Anais... Santa Maria: **Departamento de Zootecnia, UFSM**, 2001. 69p. p 37. , 2001.

INFORMAÇÕES PESSOAIS: Dr. Ralf Greiner, setembro de 2013.