

Universidade de São Paulo  
FMRP – Departamento de Bioquímica e Imunologia  
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica

*Bioprospecção e produção de  
enzimas fibrolíticas por Aspergillus  
japonicus com potencial para  
aplicação em nutrição de  
ruminantes*

Fernanda Dell Antonio Facchini

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Universidade de São Paulo  
FMRP – Departamento de Bioquímica e Imunologia  
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica

*Bioprospecção e produção de  
enzimas fibrolíticas por Aspergillus  
japonicus com potencial para  
aplicação em nutrição de  
ruminantes*

Fernanda Dell Antonio Facchini

Orientadora: Maria de Lourdes T.M. Polizeli

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

## FICHA CATALOGRÁFICA

**Facchini, F.D.A.**

Bioprospecção e produção de enzimas fibrolíticas por *Aspergillus japonicus* com potencial para aplicação em nutrição de ruminantes.

153p.: il.; 30 cm.

Dissertação de mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

Orientadora: Polizeli, Maria de Lourdes T.M.

1. *Aspergillus japonicus*; 2. xilanase; 3. CMCase; 4. Ração animal.

*"A vida é como andar de bicicleta. Para manter seu equilíbrio  
você deve continuar em movimento."  
(Albert Einstein)*

*À minha família, carinhosamente  
dedico este trabalho ...*

## ***PEGADAS NA AREIA***

Uma noite eu tive um sonho...

Sonhei que estava andando na praia com o SENHOR e, através do céu, passavam cenas de minha vida. Para cada cena que se passava, percebi que eram deixados dois pares de pegadas na areia; um era o meu e o outro do SENHOR. Quando a última cena de minha vida passou diante de nós, olhei para trás, para as pegadas na areia e notei que muitas vezes no caminho de minha vida havia apenas um par de pegadas na areia. Notei, também, que

isso acontecia nos momentos mais difíceis da minha vida. Isso me

aborreceu deveras e perguntei, então, ao SENHOR:

- "SENHOR, tu me disseste que, uma vez que eu resolvi Te seguir, Tu andarias sempre comigo todo o caminho; mas notei que, durante as maiores atribulações do meu viver, havia na areia dos caminhos da vida apenas um par de pegadas. Não compreendo por que nas horas em que eu mais necessitava de Ti, Tu me deixaste".

- **“Meu precioso filho, Eu te amo e jamais te deixaria nas horas de tua prova e de teu sofrimento. Quando vistes na areia apenas um par de pegadas, foi, exatamente aí, que Eu te carreguei nos braços”**

# *Agradecimientos*

Por toda minha caminhada, pessoas maravilhosas me apoiaram, me ajudaram e contribuíram para essa vitória, mas a Deus agradeço primeiramente por tudo... pelos meus pais e meu irmão sempre presentes, pela conquista deste título, por ter me abençoado com eternos amigos e amigas e, principalmente, por ter me carregado nos braços quando não enxergava mais. Contudo, agradeço sem mais palavras pela concretização desse sonho.

Agradeço imensamente a minha família, que com todo o amor me apoiaram nessa decisão, me auxiliaram nas fases mais complicadas: na mudança de vida, de uma nova etapa, de um novo recomeço e que, sem esse porto seguro, talvez não tivesse condições de sonhar e concretizar meu mestrado.

É impossível não agradecer a Prof<sup>a</sup>. Dra. Maria de Lourdes T. M. Polizeli, não só pela presença e orientação durante a pós-graduação, mas também por momentos de boas risadas e também de tristezas, por enriquecer minha vida pessoal e profissional, pelas indicações de aulas de Yoga e pelo carinho e “puxões de orelhas” que me tornaram melhor a cada dia.

Ao Prof. Dr. Ricardo Andrade Reis, agradeço muito pela dedicação, apoio nas decisões, paciência, ensinamentos sobre ruminantes, sugestões que enriqueceram meu trabalho e auxílio em toda a parte de nutrição de ruminantes realizado no Departamento de Forragicultura da UNESP em Jaboticabal.

Ao Prof. João Atílio Jorge, agradeço pela convivência agradável e descontraída, pela contribuição com seu conhecimento, sugestões e pela ajuda com os equipamentos em momentos de desespero.

Agradeço também ao Prof. Dr. Francisco Hector Terenzi e ao Prof. Dr. Luiz Henrique Souza Guimarães pelo convívio harmonioso e bem humorado.

Ao Prof. Dr. Luiz Alexandre Pedreira de Freitas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto e a Profa. Dra. Maria Isabel Moura Nascimento da UNICAMP agradeço pelo auxílio estatístico nas análises de planejamento fatorial.

À Profa. Elza Tiemy Sakamoto Hojo do setor de Genética, Departamento de Biologia da FFCLRP por permitir a realização dos testes de citotoxicidade em seu laboratório e à aluna Giovana da Silva Leandro pelo auxílio e atenção.

Ao Prof. Dr. Daniel Rume Casagrande da Universidade Federal do Amazonas por todo auxílio e disponibilidade na realização das análises estatísticas referentes aos testes de digestibilidade.

À Prof. Dra. Eleni Gomes por ter me dado a base para realização deste mestrado e por ter aceitado participar da banca examinadora.

Meu agradecimento especial a Simone, que além de ajudar nos momentos mais desesperadores, também deu seu total apoio e sugestões nos experimentos realizados em Jaboticabal, as quais foram bem aproveitadas.

Como prometido, desde o início dos experimentos com ruminantes, meu carinhoso agradecimento ao Vitão, que me ajudou não só na discussão de resultados, nos experimentos de digestibilidade, nos artigos, na coleta de rúmen das cabras e nos trabalhos mais fétidos que fizemos, mas também com sua paciência e extrema calma

(que às vezes até me irritava e me fazia perder os ônibus de ida a Jaboticabal!) nos momentos de aflições, me acompanhando nas madrugadas de coletas e nas viagens.

Agradeço ainda à Karla e a Anna Paula da UNESP de Jaboticabal, pelas correções e explicações e por todo o auxílio na parte de ração animal, à Juli e à Tati pela ajuda com a coleta de forrageiras e análise bromatológica e, aos alunos do laboratório da UNESP Jaboticabal que me auxiliaram.

Agradeço também ao funcionário e amigo Ricardo Fernandes Alarcon pelo convívio risonho e contagiante, pelos abraços apertados e pelo enorme apoio técnico que incansavelmente dedica aos alunos/amigos. Seu trabalho foi fundamental à realização desta etapa.

Agradeço à Ivone, secretária da Pós-Graduação da Bioquímica, pela força, eficiência e eterno bom humor. Meus agradecimentos também aos funcionários da Pós-Graduação pela atenção e enorme disponibilidade.

Aos amigos e amigas que trabalharam dia a dia no laboratório: Ana Vici (retribuindo agora as palavras por ela ditas: foi um presente que Deus enviou durante o mestrado, sendo sempre minha companheira, amiga e irmã de coração), Vivian (sempre conselheira, que convivia com meu mau-humor pelas manhãs e as crises de choro e TPM), Michele, Juliana (Jubs), André e Alexandre (que ampliaram meu conhecimento em músicas sertanejas e as mais esquisitas), Rose (vou cobrar a dança heim?), Beraba, Mônica, Felipe (Magal), Matheus (meu pupilo favorito), Priscila (que se bandiou para outra facção e me abandonou), Marita (nos últimos momentos se tornou grande amiga), Heloisa (Loli), Cynthia, Tati (adoro essa menina), Bruninha, Alan, Jean, Allana, Mariele, e André.

À meus queridos amigos de Ribeirão Preto, que conquistaram seu espaço em minha vida esbanjando alegria e sorrisos: Elise (chuchu), Malson, Felipe e, claro, não poderia esquecer da Regis, minha parceira para “tudo”.

Aos amigos pré-históricos do coração, não poderia deixar de agradecer: Berto (irmão de facul, conselheiro, companheiro em todas as horas e que insiste em trabalhar na mesma área, sempre disposto a ajudar em seu plantão), Laura (eterna amiga, que mesmo longe por anos esteve presente), Ana Carol e Marina (amigas do coração), Dany Forges e Marailss (suporte, amizade e moradia em São Carlos e Rio Preto), Gabi, Aline, Ana Lulu, Letícia e a todos os “outros” que me ajudaram nessa caminhada e com a vitória da qualificação.

À FAPESP pelo apoio financeiro.

**Muito obrigada!!!**

# Índice Geral

<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>I</b>
<b>LISTA DE TABELAS .....</b>	<b>II</b>
<b>ABREVIATURAS E UNIDADES .....</b>	<b>III</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
1.1 Fungos .....	1
1.1.1 <i>Aspergillus japonicus</i> .....	3
1.2 Composição da parede celular vegetal .....	4
1.2.1 Parede celular de forrageiras .....	8
1.3 Sistemas enzimáticos em estudo .....	11
1.3.1 Sistema xilanolítico.....	12
1.3.2 Sistema celulolítico.....	14
1.4 Processos fermentativos na produção de enzimas microbianas .....	15
1.5 Aplicações industriais das enzimas em estudo .....	18
1.5.1 Aplicação das enzimas na nutrição de ruminantes .....	19
1.6 Efeito de enzimas fibrolíticas na digestibilidade ruminal .....	21
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>26</b>
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>28</b>
3.1 Coleta de fungos filamentosos .....	28
3.2 Isolamento e identificação dos microrganismos.....	28
3.3 Manutenção da cepa .....	30
3.4 Seleção e identificação dos microrganismos produtores de xilanases e CMCases .....	31

3.5 Condições de cultivo .....	31
3.5.1 Fermentação submersa (FSm) .....	31
3.5.2 Fermentação em estado sólido (FES) .....	34
3.6 Contagem dos conídios em Câmara de Neubauer .....	34
3.7 Obtenção das preparações enzimáticas.....	35
3.7.1 Fermentação submersa .....	35
3.7.2 Fermentação em estado sólido .....	35
3.8 Dosagens enzimáticas .....	35
3.8.1 Xilanases e celulases (CMCase, FPase e Avicelase) .....	35
3.8.2 $\beta$ -xilosidase, acetil-xilanoesterase, arabinofuranosidase, $\alpha$ -glucuronidase e $\beta$ -glucosidase.....	36
3.8.3 Dosagem de outras enzimas .....	37
3.9 Dosagem de proteínas totais .....	37
3.10 Padronização da produção enzimática .....	38
3.10.1 Efeito da temperatura .....	38
3.10.2 Efeito da fonte de carbono .....	38
3.10.3 Efeito da umidificação com diferentes soluções salinas em FES .....	38
3.10.4 Efeito da fonte de nitrogênio.....	39
3.10.5 Planejamento fatorial para FSm na produção enzimática .....	39
3.10.6 Efeito do tempo de cultivo de <i>A. japonicus</i> na produção enzimática .....	41
3.10.7 Concentração de número de conídios .....	41
3.10.8 Efeito do pH na produção enzimática .....	42
3.10.9 Influência do Tween 80 na produção enzimática .....	42
3.11 Caracterização bioquímica dos extratos brutos obtidos.....	42
3.11.1 Efeito da temperatura na atividade enzimática .....	42
3.11.2 Efeito da temperatura sobre a estabilidade enzimática .....	43
3.11.3 Efeito do pH na atividade enzimática .....	43
3.11.4 Efeito do pH sobre a estabilidade enzimática .....	43
3.11.5 Influência de compostos iônicos na atividade enzimática .....	43
3.11.6 Variação do substrato xilanolítico .....	44
3.11.7 Efeito do tempo de armazenamento dos extratos enzimáticos .....	44
3.12 Estudos do potencial biotecnológico das enzimas na digestibilidade de ruminantes .....	44
3.12.1 Citotoxicidade.....	44
3.12.2 Hidrólise enzimática de diferentes espécies de capim colhidos através de pastejo simulado .....	46
3.12.3 Análise bromatológica dos capins .....	47

3.12.4	Efeito da hidrólise enzimática no capim seco e processado .....	47
3.12.5	Aplicação das enzimas fibrolíticas em ruminantes .....	47
3.12.5.1	Avaliação da digestibilidade <i>in vitro</i> de diferentes volumosos na presença de enzimas fibrolíticas .....	48
3.12.5.2	Avaliação da atividade enzimática na degradação <i>in vitro</i> através da produção de gás.....	49
3.12.5.3	Avaliação da atividade de xilanase e CMCase no fluido ruminal ..	51
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>54</b>
<b>Parte I: Prospecção, isolamento e seleção de fungos filamentosos</b>		
4.1	Prospecção de fungos filamentosos .....	56
4.1.1	Coleta e seleção dos microrganismos.....	56
4.1.2	<i>Screening</i> de fungos filamentosos.....	55
<b>Parte II: Otimização das condições de cultivo para produção de xilanases e CMCases em fermentação sólida e submersa</b>		
4.2	Efeito da temperatura no cultivo de <i>Aspergillus japonicus</i> .....	65
4.3	Padronização das condições de cultivo para produção enzimática em fermentação em estado sólido (FES) .....	67
4.3.1	Avaliação de diferentes fontes de carbono .....	67
4.3.2	Efeito de diferentes soluções salinas na produção enzimática .....	70
4.3.3	Efeito da fonte de nitrogênio na produção enzimática .....	71
4.3.4	Determinação do tempo de cultivo .....	72
4.3.5	Efeito da concentração de inóculo sobre a produção enzimática e sobre o crescimento de <i>A. japonicus</i> .....	74
4.3.6	Influência do pH inicial na produção enzimática em FES .....	74
4.4	Padronização das condições de cultivo para produção enzimática em fermentação submersa (FSm) .....	75
4.4.1	Avaliação de diferentes fontes de carbono.....	75
4.4.2	Efeito da fonte de nitrogênio na produção enzimática .....	79
4.4.3	Avaliação do efeito da concentração de peptona, extrato de levedura e fonte de carbono sobre a produção enzimática em FSm utilizando design experimental .....	80

4.4.3.1 Planejamento fatorial sobre a produção de xilanase .....	81
4.4.3.2 Planejamento fatorial sobre a produção de celulase .....	81
4.4.4 Determinação do tempo de cultivo .....	82
4.4.5 Efeito do pH inicial do meio de cultivo sobre a produção enzimática por <i>A. japonicus</i> .....	91
4.4.6 Efeito da concentração de inóculo sobre a produção enzimática.....	91
4.4.7 Efeito da adição de Tween 80 na produção enzimática.....	92
4.5 Comparação entre as produções padronizadas dos meios de fermentação (FES e FSm) .....	93
4.6 Dosagens de algumas enzimas extracelulares presentes no extrato bruto obtido por <i>A. japonicus</i> .....	94

### **Parte III: Caracterização bioquímica dos extratos brutos de *Aspergillus japonicus***

4.7 Caracterização da xilanase e CMCCase produzidas por fermentação em estado sólido .....	97
4.7.1 Efeito da temperatura no ensaio enzimático.....	97
4.7.2 Estabilidade térmica das enzimas nos ensaios enzimáticos.....	98
4.7.3 Efeito do pH no ensaio enzimático .....	100
4.7.4 Estabilidade ao pH no ensaio enzimático .....	101
4.7.5 Estabilidade dos extratos enzimáticos armazenados por 6 meses.....	102
4.7.6 Efeito da adição de íons à reação enzimática sobre a atividade enzimática .....	103
4.7.7 Hidrólise de diferentes tipos de xilana por xilanase produzida por <i>A. japonicus</i> .....	104

### **Parte IV: Estudo do potencial de aplicação dos extratos brutos obtidos por *Aspergillus japonicus* em ruminantes**

4.8 Estudo da aplicação enzimática na hidrólise de forrageiras .....	107
4.8.1 Estudo da citotoxicidade do extrato bruto produzido por <i>A. japonicus</i> ....	107
4.8.2 Avaliação do preparado enzimático na hidrólise de forrageiras simulando pastejo animal .....	108
4.8.3 Efeito da hidrólise enzimática utilizando capim seco e processado como substrato .....	108
4.9 Adição de enzimas fibrolíticas em ruminantes.....	113

4.9.1 Avaliação da digestibilidade <i>in vitro</i> de diferentes volumosos na presença de enzimas fibrolíticas.....	113
4.9.2 Avaliação da atividade enzimática na degradação <i>in vitro</i> através da produção de gás .....	117
4.9.3 Avaliação da atividade enzimática <i>in vivo</i> no fluido ruminal de cabras ...	120
<b>5. DISCUSSÃO .....</b>	<b>125</b>
<b>6. CONCLUSÕES .....</b>	<b>147</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>149</b>

## I. Índice de figuras

**Figura 1** – Conidióforos de *A. japonicus* Saito.

**Figura 2** - Representação da fibra de materiais lignocelulósicos e de seus componentes e suas respectivas estruturas: celulose, hemicelulose e lignina.

**Figura 3** - Esquema básico da estrutura da parede celular de madeiras moles e de madeiras duras.

**Figura 4** - Interações potenciais e organização da matriz da parede entre celulose e xilana.

**Figura 5** - Ligações de ácidos *p*-cumárico e ferúlico com componentes da parede celular.

**Figura 6** - Componentes presentes nas plantas.

**Figura 7** - Representação esquemática de uma molécula de xilana e da atuação das enzimas do sistema xilanolítico.

**Figura 8** - Ação das endoglucanases, exoglucanases (celobiohidrolase) e  $\beta$ -glucosidase na degradação da celulose.

**Figura 9** – Esquema ilustrativo da formação de butirato, propionato, acetato e metano a partir da fermentação de carboidratos.

**Figura 10** - Locais de coleta das amostras.

**Figura 11** - Exemplo de fungos desenvolvidos em placa de Petri com meio sólido de Aveia após diluição do material coletado.

**Figura 12** – Pressão de gás sendo registrada em frascos experimentais vedados, lacrados e incubados a 39°C com solução de incubação.

**Figura 13** - (A) Cabras da raça Saanen, fêmeas, fistuladas no rúmen e com dieta a base de feno de milho. (B) Coleta do fluido ruminal.

**Figura 14** - Amostras coletadas em diferentes localidades.

**Figura 15** - Exemplos de fungos isolados em placas de Petri.

**Figura 16** - Crescimento do *Aspergillus japonicus* em placas de Petri em meio de PDA em diferentes temperaturas.

**Figura 17** – Representação gráfica em colunas da variação da temperatura de cultivo.

**Figura 18** - Efeito do tempo de cultivo para o fungo *A. japonicus* sobre a produção.

**Figura 19** - Efeito da concentração de conídios obtidas em conídios/mL.

**Figura 20** – Efeito do pH inicial na produção enzimática de xilanase e CMCase de *A. japonicus*.

**Figura 21** - Superfície de resposta para o planejamento delineado para as variáveis do meio SR na produção da xilanase.

**Figura 22** - Superfície de resposta para o planejamento delineado para as variáveis do meio SR na produção da CMCase.

**Figura 23** - Efeito do tempo de cultivo na produção de xilanase e proteínas totais produzidas em fermentação submersa.

**Figura 24** - Efeito do tempo de cultivo na produção de CMCase e proteínas totais produzidas em fermentação submersa.

**Figura 25** - Efeito do pH inicial sobre a produção das enzimas por *A. japonicus*.

**Figura 26** - Efeito da concentração de conídios na produção enzimática.

**Figura 27** - Variação da concentração de Tween 80 na produção enzimática.

**Figura 28** – Efeito da temperatura no ensaio enzimático para xilanase e celulase produzidas por *A. japonicus*.

**Figura 29** – Estabilidade térmica em diferentes temperaturas.

**Figura 30** – Estabilidade térmica da xilanase e celulase a 40°C durante 24 horas.

**Figura 31** – Influência do pH na atividade de xilanase e celulase produzida por *A. japonicus* utilizando tampão McIlvaine, fosfato de sódio, tris-HCl e glicina.

**Figura 32** – Estabilidade em relação ao pH.

**Figura 33** – Estabilidade ao pH das enzimas em estudo durante 24 horas de pré-incubação.

**Figura 34** – Estabilidade enzimática quando armazenadas após cultivo em estado sólido e congeladas durante 6 meses.

**Figura 35** – Atividade residual de xilanase em diferentes substratos.

**Figura 36** – Hidrólise enzimática de capins em diferentes concentrações de extrato enzimático durante 4 horas de incubação a 40°C com agitação.

**Figura 37** – Efeito da hidrólise enzimática em diferentes forrageiras processadas utilizando diferentes volumes de extrato bruto.

**Figura 38** – Cinética enzimática durante 150 minutos utilizando diferentes forrageiras processadas como substratos.

**Figura 39** – Estabilidade da xilanase e celulase em fluido ruminal de cabra durante 6 horas a 40°C.

**Figura 40** – Desempenho das xilanases em rúmen de caprino.

## ***II. Índice de Tabelas***

**Tabela 1** – Coletas realizadas em Agosto/2007 em diferentes locais de pastagens

**Tabela 2** - Planejamento fatorial  $2^3$ , com variáveis independentes codificadas.

**Tabela 3** - Valores reais das variáveis independentes codificadas.

**Tabela 4** – Fungos filamentosos isolados de coletas em diferentes áreas de pastagens.

**Tabela 5** - Características dos fungos isolados quanto ao crescimento em relação à temperatura.

**Tabela 6** - Dosagem das enzimas extracelulares e de proteínas produzida pelos fungos isolados.

**Tabela 7** - Produção de xilanase por fermentação submersa em diferentes meio de cultivo para os fungos selecionados.

**Tabela 8** – Seleção da melhor fonte de carbono para a produção de xilanase e CMCase extracelular em FES.

**Tabela 9** - Efeito da mistura entre fontes de carbono na produção de xilanase.

**Tabela 10** - Efeito da mistura entre fontes de carbono na produção de celulase.

**Tabela 11**– Variação do tipo de solução na FES para produção enzimática.

**Tabela 12** – Efeito de compostos nitrogenados na produção enzimática em FES

**Tabela 13** - Seleção da melhor fonte de carbono para a produção de xilanase e CMCase extracelular em fermentação submersa.

**Tabela 14** - Efeito da mistura entre fontes de carbono na produção de xilanase em fermentação submersa.

**Tabela 15** - Efeito da mistura entre fontes de carbono na produção de celulase em fermentação submersa.

**Tabela 13** - Seleção da melhor fonte de carbono para a produção de xilanase e CMCase extracelular em fermentação submersa.

**Tabela 14** - Efeito da mistura entre fontes de carbono na produção de xilanase em fermentação submersa.

**Tabela 15** - Efeito da mistura entre fontes de carbono na produção de celulase em fermentação submersa.

**Tabela 16** – Efeito de compostos nitrogenados na produção de xilanase em FSm.

**Tabela 17** - Resultado de atividade xilanolítica produzida por *A. japonicus* através de planejamento fatorial.

**Tabela 18 - Análise de variância para produção de xilanase por *A. japonicus* em fermentação submersa.**

**Tabela 19** - Resultado de atividade celulolítica produzida por *A. japonicus* através de planejamento fatorial.

**Tabela 20** - Análise de variância para a produção de celulase por *A. japonicus* em fermentação submersa.

**Tabela 21:** Comparação entre as atividades de xilanases e celulase obtidas na produção em FES e FSm.

**Tabela 22:** Atividade enzimática em U/mL de diferentes enzimas contidas no extrato bruto.

**Tabela 23** – Efeito da adição de íons e compostos na reação enzimática sobre a atividade de celulase e xilanase brutas.

**Tabela 24** – Determinação da citotoxicidade do extrato bruto de *A. japonicus*

**Tabela 25** – Análise bromatológica das forrageiras testadas na hidrólise enzimática

**Tabela 26** – Composição químico-bromatológica dos alimentos avaliados.

**Tabela 27** – Digestibilidade *in vitro* da matéria seca e da FDN (%) de diferentes volumosos na presença de extrato bruto obtido por *A. japonicus*.

**Tabela 28** – Digestibilidade *in vitro* da matéria seca e da FDN (%) de diferentes volumosos na presença de ligninases obtidas por *A. niveus*.

**Tabela 29** – Porcentagem de DIVMO dos diferentes volumosos testados na produção de gás na ausência e presença de extrato bruto em 24 e 48 horas.

**Tabela 30** – Porcentagem de NDT dos diferentes volumosos testados na produção de gás na ausência e presença de extrato bruto em 24 e 48 horas.

**Tabela 31** – Produção de gases (mL/g MS) durante a digestão *in vitro* de forrageiras em diferentes dosagens enzimáticas e de 6 a 60 horas de incubação.

**Tabela 32** – Valores de NDT (%) de acordo com obtido por Magalhães (2007).

### III. Abreviaturas e unidades

Atm	Atmosfera
BOD	Biochemical oxygen demand
BSA	Albumina de soro bovino
C	Celulose
cm	Centímetros
CMC	Carboximetil-celulose
CMCase	Carboximetil-celulase
DNS	3,5 -Ácido dinitrosalicílico
DIVFDN	igestibilidade <i>in vitro</i> da fibra de detergente neutro
DIVMO	Digestibilidade <i>in vitro</i> da matéria orgânica
DIVMS	Digestibilidade <i>in vitro</i> da matéria seca
DO	Densidade óptica (absorbância)
EB	Energia bruta
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EE	Extrato etéreo
EL	Extrato de levedura
EM	Energia metabolizável
FC	Fonte de carbono
FDA	Fibra em detergente ácido
FDN	Fibra em detergente neutro
FES	Fermentação em estado sólido
FS	Frações de sobrevivência
F <sub>Sm</sub>	Fermentação submersa
g	Grama
GPS	Global Positioning Systems
H	Hemicelulose
HEC	Hidroximetil-celulose
L	Litro
LIG	Lignina
min.	Minuto
mg	Miligrama
mL	Mililitro
M	Molar
mM	Milimolar
MM	Material mineral
MS	Matéria seca
N	Nitrogênio total
NDT	Nutrientes disponíveis totais
P	Peptona
PB	Proteína bruta
PBS	Phosphate buffered saline
PDA	Potato dextrose Agar
pH	potencial hidrogeniônico
PNP-acetato	<i>p</i> -nitrofenil-acetato
PNP-ara	<i>p</i> -nitrofenil-β-D-arabinopiranosídeo

PNPG	<i>p</i> -nitrofenil- $\beta$ -D-glicosídeo
PNP-xil	<i>p</i> -nitrofenil- $\beta$ -D-xilopiranosídeo
p/V	peso/volume
q.s.p.	quantidade suficiente para
rpm	Rotações por minuto
SR	Segatto-Rizzatti
Tris	Tris (hidroxilmetil) aminometano
U	unidades de atividade enzimática
V	Volume
$\mu$ L	Microlitro
$\mu$ mol	Micromol
$^{\circ}$ C	graus Celsius

## RESUMO

Um programa de bioprospecção em fungos filamentosos em ambientes de pastagens foi inicialmente aplicado neste trabalho com o objetivo de selecionar bons produtores de xilanase e CMCases. Dentre as amostras, foi selecionado o fungo *Aspergillus japonicus* Saito devido à alta produção destas enzimas, o qual foi cultivado em fermentação submersa (FSm, em meio SR) ou, em fermentação em estado sólido (FES) suplementados com resíduos agroindustriais para finalidade de aplicação em nutrição de ruminantes. Analisando os dados obtidos, pode-se concluir que as xilanases e celulasas em estudo foram secretadas em maior quantidade a 30°C, sendo produzidas a partir do terceiro e sexto dia de incubação em FES e, em FSm, no sexto e quinto dias em condições estáticas, respectivamente. Para ambas as enzimas, a densidade de inóculo adequada foi de 10<sup>7</sup> conídios/mL e as melhores misturas de fontes de carbono para que o fungo produzisse estas enzimas foram farelo de soja e sabugo de milho (1:3) para xilanase e farelo de trigo e bagaço de cana (3:1) para a CMCCase em ambos os tipos de fermentação. A melhor fonte de nitrogênio foi a peptona, tanto em FES quanto em FSm, onde houve suplementação com os sais SR e Khanna no meio sólido para xilanase e celulase, respectivamente. Já em FSm o planejamento fatorial 2<sup>3</sup> indicou novas proporções de extrato de levedura, peptona e fonte de carbono para ambas as enzimas, acrescidos de sais SR. Ainda, o melhor pH inicial do meio de cultivo para a produção de celulase foi pH 4,0 e para xilanase foi pH 5,0, em FSm e a presença de Tween 80 no meio líquido reduziu a produção das enzimas. Os ótimos de temperatura e pH de reação dos extratos brutos corresponderam a 60°C e 55°C para xilanase e CMCCase, respectivamente em pH 4,0 para ambas. A termoestabilidade da xilanase foi 100% até 40°C, decaindo após esta temperatura, enquanto que a CMCCase permaneceu com 70% de estabilidade até 60°C em 120 min. Frente a diferentes pHs, a xilanase e CMCCase de *A. japonicus* mantiveram-se estáveis em pH de 4,0 a 7,0 e 5,0 e 6,0, respectivamente. A presença de Cu<sup>++</sup> e Mn<sup>++</sup> na reação aumentaram a atividade de xilanase e CMCCase em 10% e 64%, respectivamente. Os extratos obtidos não apresentaram caráter citotóxico. Na hidrólise de forrageiras, os extratos apresentaram melhor desempenho nos gêneros *Brachiaria* e nos testes *in vitro* realizados no setor de rações houve um aumento significativo na digestibilidade de diversas forrageiras, principalmente em cana-de-açúcar. Ainda, foi verificada uma maior liberação de gases na presença do preparado enzimático, sendo outro indicativo de maior digestibilidade. Nos testes *in vivo*, as xilanases mantiveram-se estáveis por até 4 horas dentro do rúmen de caprinos.

## ABSTRACT

A prospection program of filamentous fungi from pasture environment samples was initially applied in this work, with the aim of selecting good xylanase and CMCase producers. Among these samples it was selected the fungus *Aspergillus japonicus* due to production of high enzymatic levels. This fungus was cultivated either under submerged fermentation (SbmF, SR medium), or under solid state fermentation (SSF) supplemented with agro-industrial residues, aiming to employ the xylanase and CMCase produced for ruminant nutrition. We observed that xylanase and cellulase were secreted in higher levels, at the third and sixth days of incubation under SSF, and at the sixth and fifth days under SbmF (static conditions), respectively. For both enzymes, the appropriate inoculum density was  $10^7$  conidia/mL, at 30°C. The best inducer mixtures were soybean bran and crushed corncob (1:3) for xylanase and wheat bran and sugar cane bagasse (3:1) for CMCase, for both types of fermentations. The best nitrogen source was peptone, for both SbmF and SSF, which was also supplemented with SR and Khanna salts for xylanase and cellulase, respectively. In the SbmF was performed a full factorial design  $2^3$  that indicated new proportions of yeast extract, peptone and carbon source for both enzymes, added of SR salts. The best initial pH of culture medium for the cellulase and xylanase production was pH 4.0 and 5.0, respectively. Addition of Tween 80 to the liquid medium reduced the production of both enzymes. The optimum temperature and pH of the enzymatic activities in the crude extracts were 60°C and 55°C for xylanase and CMCase, respectively, and pH 4.0 for both enzymes. The thermostability of xylanase was 100% up to 40°C, decreasing at higher temperatures, while the CMCase remained 70% stable after 120 min at 60°C. *A. japonicus* xylanase and CMCase remained stable in the range of pH 4.0-7.0 and 5.0-6.0, respectively. The presence of  $\text{Cu}^{2+}$  and  $\text{Mn}^{2+}$  increased the xylanase and CMCase activities in 10% and 64%, respectively. The extracts showed no cytotoxic character. In the hydrolysis of forage, the extracts showed better performance in the genera *Brachiaria* and *in vitro* tests performed in the feed animal sector showed a significant increase in the digestibility of various crops, mainly sugar cane. Still, there was a higher release of gases in the presence of the enzyme mix, being other indicator of higher digestibility. *In vivo* tests showed that xylanases were stable for up to 4 hours in the caprine rumen environment.

# *1. INTRODUÇÃO*

A procura de fontes mais ricas de enzimas como, por exemplo, microrganismos com possíveis aplicações industriais, tem sido de grande valor para o ramo da biotecnologia. Os microrganismos são dotados de um imenso potencial de degradação de material orgânico, produzindo um “pool” de enzimas o qual tem sido explorado comercialmente ao longo dos anos (JAYANI et al., 2005). Desse modo, há necessidade de se explorar a biodiversidade microbiota de variados ambientes, incluindo a procura por novas fontes de enzimas de interesse industrial. Nesse contexto, a bioprospecção pode ser entendida como uma exploração sistemática e legal da diversidade de vida existente em qualquer local do meio ambiente e tem como objetivo principal à busca de recursos genéticos e bioquímicos para fins comerciais (Santos, 2001).

### **1.1 Fungos**

Os microrganismos transportam os nutrientes através da membrana plasmática como, por exemplo, compostos de baixa massa molecular. Para tal, eles secretam exoenzimas, as quais hidrolisam as macromoléculas presentes no substrato até atingir a forma e a solubilidade necessária para que sejam transportadas pela membrana (PUTZKE e PUTZKE, 2002). Entre estas enzimas encontram-se as amilases, pectinases, xilanases, celulasas e ligninases, que são importantes para diversos processos com potenciais aplicações industriais, incluindo ração animal.

Os fungos formam um vasto grupo de organismos classificados em um reino próprio, denominado Fungi, pertencente ao Domínio Eukaryota. Não só estão incluídos neste grupo organismos de dimensões consideráveis, os cogumelos, mas também muitas formas microscópicas, como bolores e leveduras. O número de espécies conhecidas de fungos é estimada em pelo menos 74.000, sendo a maioria terrestres, mas talvez existam até 1,5 milhões de espécies, sendo que a maioria ainda não foi identificada, estudada e descrita pelos micologistas (HAWKSWORTH et al., 1995; HAWKSWORTH, 2001). Assim, a prospecção de enzimas de interesse industrial em

fungos de solo brasileiro e resíduos ainda é um tema pouco explorado e de potencial interesse biotecnológico.

Nas últimas décadas, a utilização de fungos em bioprocessos ganhou importância devido à produção de enzimas com características físico-químicas variadas e com potenciais excelentes para a aplicação industrial. A capacidade de síntese em grande escala, bem como a facilidade com que são secretadas para o meio externo constituem algumas dessas características (IWASHITA, 2002; PAPAGIANNI, 2004).

Os fungos podem ocupar muitos ambientes como solos, materiais orgânicos em decomposição, plantas, dentre outros. Essa diversidade de habitats, evolutivamente, garantiu a esses organismos a capacidade de sintetizar uma série de enzimas com diferentes características, possibilitando-lhes o uso da matéria orgânica do meio (GOUKA et al., 1997). Como outros microrganismos, podem se adaptar a ambientes inhóspitos, nos quais fatores como pH, temperatura, pressão e salinidade ultrapassam valores considerados padrões para a maioria dos microrganismos (LASA e BERENQUER, 1993).

Os fungos filamentosos, em virtude de sua presença em vários ecossistemas e habitats, são cultivados em meios de cultura com relativa simplicidade de composição, são fáceis de manusear, suas condições de cultivo são facilmente controladas, ocupam pouco espaço e crescem onde há fonte de carbono associada ao calor e umidade (TREVISAN, 2004).

Os *Aspergillus* estão inseridos no filo Ascomycota, o qual é o maior filo do reino Fungi, pois compreende quase 50% de todas as espécies conhecidas de fungos. Este gênero pertence à ordem dos Eurotiales e família Trichocomaceae. Os ascomicetos, de forma geral, apresentam tanto ciclo sexual como assexual, e possuem como característica principal a presença de uma estrutura reprodutiva denominada asco, na qual são formados os ascósporos (esporos sexuais) (GUARRO et al., 1999). A classificação destas espécies tem sido baseada primariamente em diferenças nas

características morfológicas (GAMS et al., 1985).

As colônias do gênero *Aspergillus* crescem rapidamente e podem possuir colorações diversas (verdes, amarelas, marrons, brancas e pretas), consistindo em uma densa cobertura com conidióforos eretos, nos quais os conídios formam colunas compactas e, em sua maioria, são pigmentados (SAMSON et al., 1995).

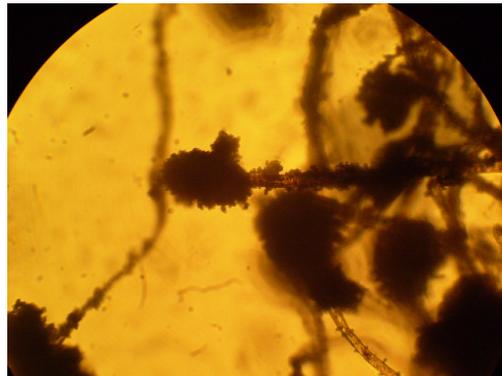
O gênero *Aspergillus* é um modelo biológico clássico e, em geral, tem grande relevância prática, por existirem espécies produtoras de enzimas industriais, ácidos orgânicos e outros produtos comercialmente importantes. Existem cerca de 200 espécies de *Aspergillus* comumente isolados do solo, materiais em decomposição, ar e também de vários outros ambientes. Devido à grande produção de enzimas extracelulares, é extensamente utilizada em processos biotecnológicos. Em razão animal alguns autores como COLLOMBATTO et al. (2003b, 2004), GIRALDO et al. (2008) e KRUEGER e ADESOGAN (2008) utilizam enzimas de produzidas por espécies de *Aspergillus*, embora sejam de origem comercial.

### **1.1.1 *Aspergillus japonicus***

O microrganismo selecionado para este estudo, o *Aspergillus japonicus* Saito (Figura 1), é membro do gênero *Aspergillus* seção Nigri (formalmente grupo dos *Aspergillus niger*) e são distribuídos por todo mundo, crescendo em uma vasta variedade de substratos. Devido a sua importância biotecnológica, a identificação das linhagens precisa ser clara, mas até agora, a taxonomia dos “black” *Aspergilli* está longe de ser esclarecida, pois as diferenças entre as espécies são muito sutis (ABARCA et al., 2004).

*Aspergillus japonicus* Saito é uma espécie de *Aspergillus* que produz colônias pretas com micélio branco, denso e basal e com ausência de exudato e pigmentos solúveis. São quase completamente cobertos por conídios de coloração preta ou marrom escura, com formato redondo e, ocasionalmente elíptico além de uniseriados. Esta espécie tem sido isolada de solos, raízes de plantas e folhas em decomposição,

predominantemente em regiões tropicais e subtropicais (DOMSCH et al., 1980 e KLICH AND PITT, 1988). Essa espécie cresce rapidamente a temperatura ambiente (24-28°C), possuindo colônias com cerca de 5,0 a 6,0 cm de diâmetro durante 10 dias de incubação em meio sólido Czapeck. Alguns sinônimos considerados são *A. japonicus* var. *atrofuscus* (1953), *A. brunneo-violaceus* (1955), *A. japonicus* var. *capillatus* (1932) e *A. atro-violaceus* (1934) (RAPER e FENNELL, 1965).



**Figura 1** - Conidióforos de *A. japonicus* Saito. Microcultivo em PDA (potato dextrose agar) a 30°C. Cepa isolada em solo de área rural. Fotografia: F.D.A. Facchini.

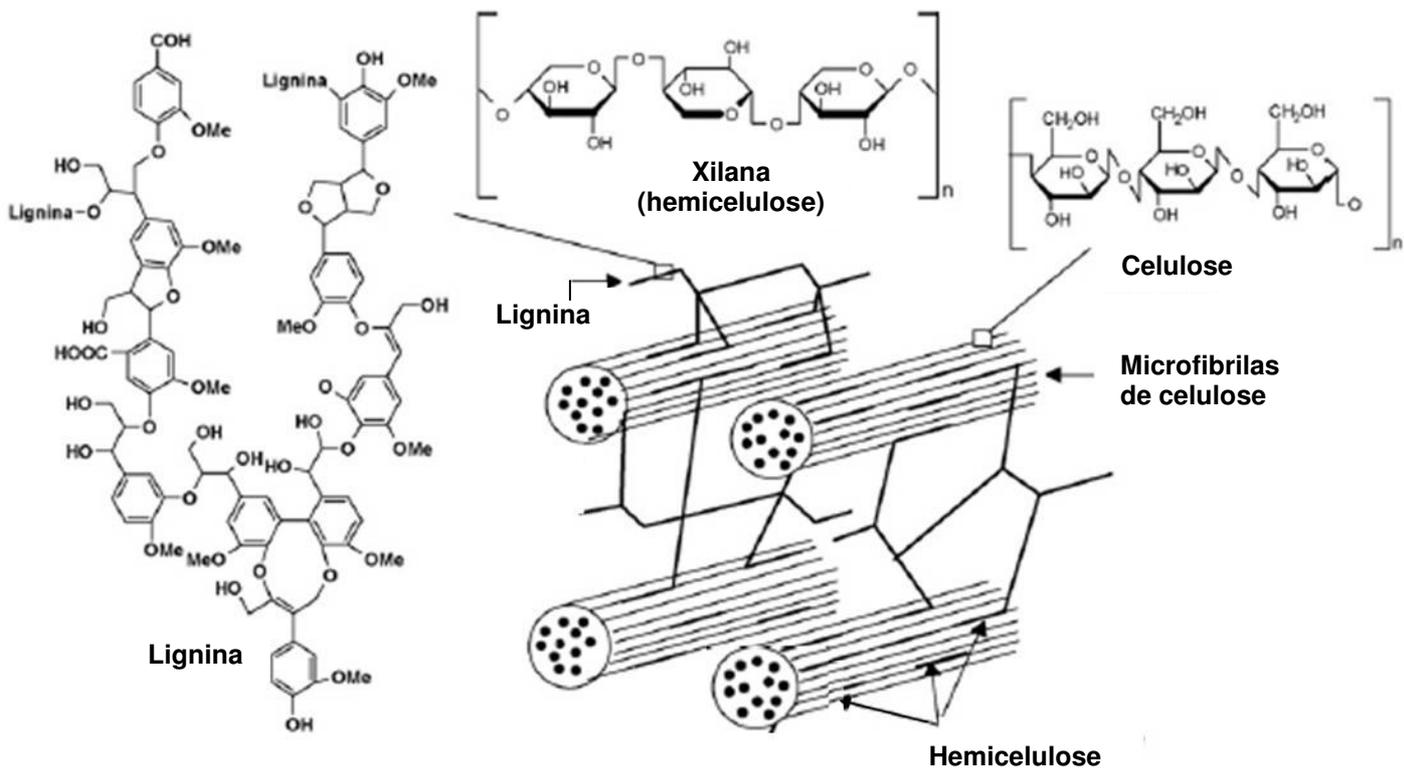
Dados da literatura têm descrito que as espécies de *Aspergillus japonicus* são ótimas produtoras de várias enzimas de interesse biotecnológico, como as pectinases (TEIXEIRA et al., 2000; SEMENOVA et al., 2003),  $\beta$ -frutofuranosidase (CHEN, 1998; WHANG e ZHOU, 2006),  $\beta$ -glucosidase (DECKER et al., 2000), celulases (SANYAL et al., 1988), tanases (BRADDOO et al., 1997), fitases (PROMDONKOY et al., 2009) e lipases (VORA et al., 1988) bem como possíveis produtores de ocratoxina (ABARCA et al., 2004).

## **1.2 Composição da parede celular vegetal**

O material lignocelulósico consiste principalmente de três diferentes tipos de compostos: celulose, hemicelulose e lignina, que se encontram associados uns aos

outros e em diferentes proporções dependendo do vegetal (Figura 2) (ROGALINSKI et al., 2008; CAGNON et al., 2009).

A parede celular vegetal é composta de diferentes camadas, as quais diferem umas das outras em sua estrutura e composição química. Basicamente, a celulose forma um esqueleto que é circundado pela hemicelulose e pela lignina que dá certa rigidez, estando todas intimamente associadas entre si (ROGALINSKI et al., 2008).



**Figura 2** - Representação da fibra de materiais lignocelulósicos e de seus componentes e suas respectivas estruturas: celulose, hemicelulose e lignina (adaptado de GRAMINHA et al., 2008).

A celulose é o biopolímero mais abundante do mundo e o principal polissacarídeo estrutural da parede vegetal. É um polímero linear e plano constituído de resíduos de glicose unidos por ligações  $\beta$  (1 - 4), que são resistentes à hidrólise enzimática e é encontrado tanto em vegetais primitivos quanto em plantas mais evoluídas.

Em sua estrutura, a celulose apresenta regiões altamente ordenadas, estabilizadas por ligações de hidrogênio intra e intermolecular, e áreas menos

ordenadas ou amorfas, onde as cadeias apresentam uma organização randomizada (FAN et al., 1987). As microfibrilas de celulose são arranjadas em conjunto e, formam assim, as chamadas fibrilas de celulose que são independentes e fracamente unidas por pontes de hidrogênio (HENDRIKS e ZEEMAN, 2009). Vários autores têm sugerido que a celulose amorfa, devido a sua maior área superficial, seja mais susceptível a hidrólise enzimática do que a forma ordenada ou cristalina, porém, complexos enzimáticos produzidos por vários microrganismos têm se demonstrado capazes de hidrolisar tanto a celulose amorfa quanto a cristalina, em açúcares solúveis de baixa massa molecular, como a glicose e celobiose.

Os componentes hemicelulósicos apresentam massa molecular mais baixa do que a celulose, inclui uma grande variedade de polissacarídeos com estruturas lineares e/ou ramificadas e geralmente são classificados de acordo com o principal açúcar presente na sua composição. Fazem parte deste grupo: xilana, manana, galactana e arabinana (DILLON, 2004). As hemiceluloses são intimamente associadas com a lignina e celulose, além de interagir covalentemente com a pectina. O componente dominante das angiospermas e plantas agrícolas como o capim e a palha são a xilana, enquanto que a das gimnospermas é a glucomanana (HENDRIKS e ZEEMAN, 2009).

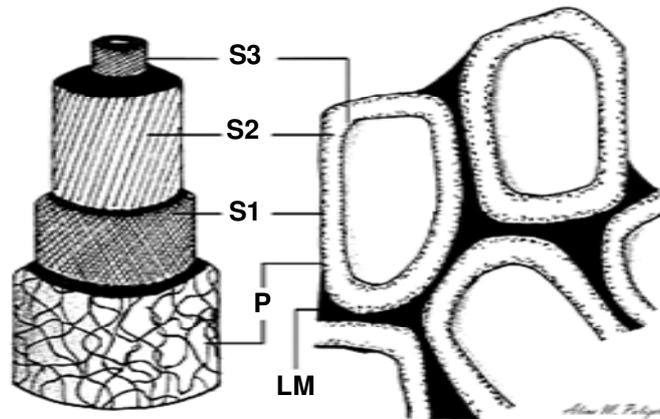
A xilana é o principal componente da hemicelulose e o segundo mais abundante polissacarídeo natural existente. Encontra-se localizada entre a molécula de lignina e o conjunto de fibras de celulose e é um polímero linear com a cadeia principal composta por resíduos de  $\beta$ -xilopiranosose unidos através de ligação glicosídica do tipo  $\beta$  (1 - 4). Na natureza, a cadeia principal desse polissacarídeo pode ter adição de unidades de ramificações como 4-O-metil- $\alpha$ -D-glucuronopiranosil, grupos acetil,  $\alpha$ -L-arabinofuranosil, etc. em diversas proporções dependendo do tipo de árvore (POLIZELI et al., 2005).

Juntamente com a celulose e a hemicelulose, a lignina é um dos principais constituintes do material lignocelulósico. Está presente em cerca de 20% a 30% na

composição na madeira e de 16 a 33% da biomassa das plantas superiores, agindo como material adesivo, como agente de enrijecimento (suporte estrutural), impermeabilidade e como barreira contra degradação enzimática e/ou microbiana e estresse oxidativo (FENGEL e WEGENER, 1989; WU et al., 2008; HENDRIKS e ZEEMAN, 2009). Em gramíneas, essa porcentagem de lignina é mais baixa e varia entre as diferentes espécies como, por exemplo, cerca de 7 – 9% em capim-Mombaça (*Panicum maximum* Jacq. cv. Mombaça) e capim-Elefante cv. Roxo (SANTOS et al., 2001; DIAS et al., 2007).

A lignina é uma macromolécula amorfa de elevada massa molecular com estrutura muito complexa, formado por unidades fenólicas e de alcoóis, baseada em três precursores: álcoois coniferílico, sinapílico e *p*-cumarílico. A proporção destes componentes varia entre diferentes espécies de plantas e pode ser utilizada com propósitos taxonômicos. Em função da sua estrutura, essa macromolécula é de difícil degradação, comparado aos polímeros de polissacarídeos, permanecendo nos solos como componentes recalcitrantes do húmus (SILVA, 2004). Existem três tipos principais de lignina: a lignina de gimnospermas, a de angiospermas e a de gramíneas (não lenhosas ou herbáceas) (BURANOV e MAZZA, 2008).

O esquema da Figura 3 mostra de que maneira estas substâncias podem estar organizadas formando a parede celular vegetal. Em cada camada as porcentagens de celulose, hemicelulose e lignina variam em proporção. A parede celular primária (P) possui em torno de 10, 20 e 70% de celulose, hemicelulose e lignina, respectivamente. Já na parede celular secundária, formada por três camadas (S1, S2 e S3), a proporção desses componentes (celulose, hemicelulose e lignina, respectivamente) correspondem a cerca de 35, 25 e 40% em S1, 55, 30, e 15% em S2 e 55, 40, 5% em S3. Na lamela média (LM) a proporção desses componentes corresponde a 0,10 e 90% (POLIZELI, 2009).



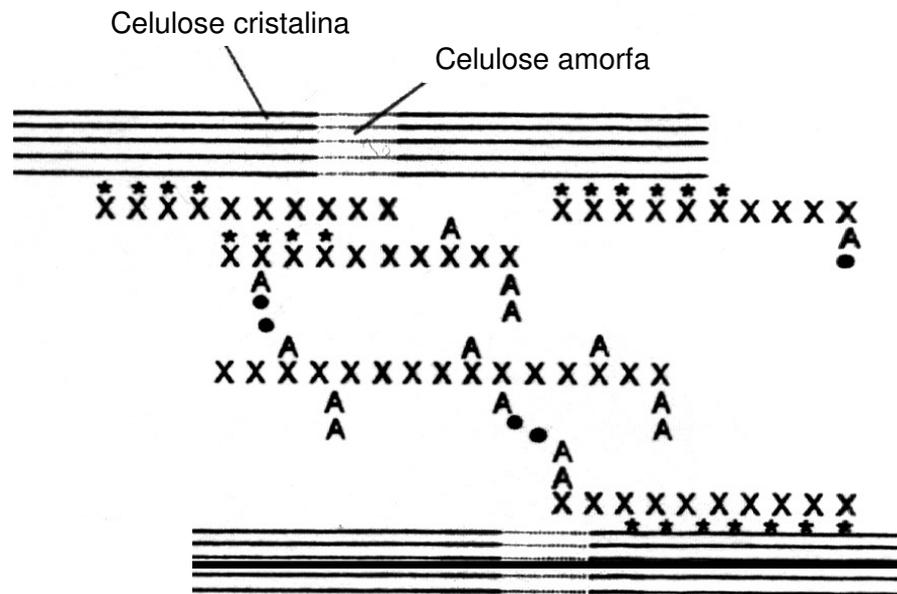
**Figura 3** - Esquema básico da estrutura da parede celular de madeiras moles e de madeiras duras. LM - lamela média; P - parede celular primária e camadas da parede celular secundária S1, S2 e S3 (adaptado de POLIZELI, 2009).

### 1.2.1 Parede celular de forrageiras

Os constituintes da parede celular das forrageiras apresentam uma matriz complexa: com estrutura tridimensional, interações dos polímeros, ligações do tipo éster e éter e proporções de siringil, guaiacil e hidroxicinamil na fração da lignina. Estas estruturas definem a habilidade dos microrganismos do trato digestivo dos ruminantes em digerir a parede celular. Quando se trata de forragens de clima tropical, comparada às forragens de clima temperado, normalmente apresentam qualidade nutricional inferior em função da maior proporção de parede celular espessa (esclerênquima, feixes vasculares) com maior conteúdo de lignina, e menores teores de proteína, acarretando assim, em uma menor digestibilidade. Assim, a lignificação da parede celular vegetal e as ligações químicas da lignina e compostos fenólicos aos polissacarídeos limitam a digestão da fibra.

De acordo com Hatfield (1989), as interações da matriz que poderiam restringir a extensão e a taxa de degradação da celulose seriam as pontes de hidrogênio da hemicelulose com a celulose. O aumento das ligações dos polissacarídeos de cadeia

linear com as microfibrilas de celulose limitaria o acesso à degradação da celulose (Figura 4).

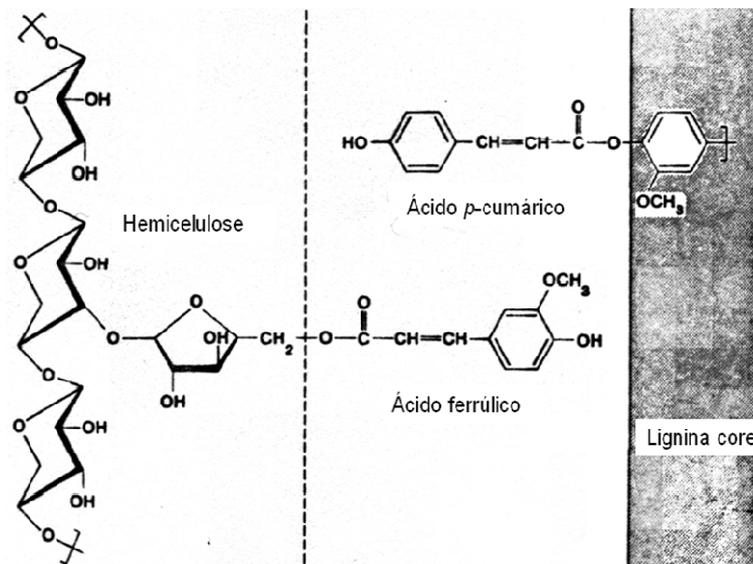


**Figura 4** - Interações potenciais e organização da matriz da parede entre celulose e xilana. X = xilana; A = arabinose; \* = pontes de hidrogênio; • = ácido ferrúlico; •• = ácido diferrúlico (HATFIELD, 1989)

As células do mesófilo (presente nas folhas) apresentam espaços intercelulares e parede celular não lignificada que quando rompidas pela mastigação do ruminante tornam-se mais acessíveis às bactérias, aumentando a digestão da fibra. Por outro lado, as células de esclerênquima possuem maior espessura e sua digestão ocorre do interior do lúmen para o exterior da célula, uma vez que a superfície é protegida por uma parede indigestível (lamela média primária), necessitando de um maior período de tempo para a digestão (WILSON e MERTENS, 1995).

A concentração de lignina nas plantas forrageiras tem sido constantemente responsabilizada como um dos fatores limitantes da digestibilidade da planta. Embora as correlações entre teor de lignina e digestibilidade sugiram esta associação, não são necessariamente provas que a lignina seja realmente a principal responsável pela menor digestibilidade da matéria seca (Jung, 1989).

Segundo Jung (1989) todas as forragens contêm a chamada lignina core, cujo termo é utilizado para distinguir as áreas altamente condensadas e mais resistentes a degradação dos compostos fenólicos que podem ser extraídos da amostra. Os ácidos ferrúlico e *p*-cumárico (componentes da lignina) estão presentes nas gramíneas em aproximadamente 10 e 25% respectivamente. O ácido ferrúlico tende a estar associado com a fração de hemicelulose, enquanto que a maioria dos ácidos *p*-cumáricos está esterificada com a lignina core (Figura 5).

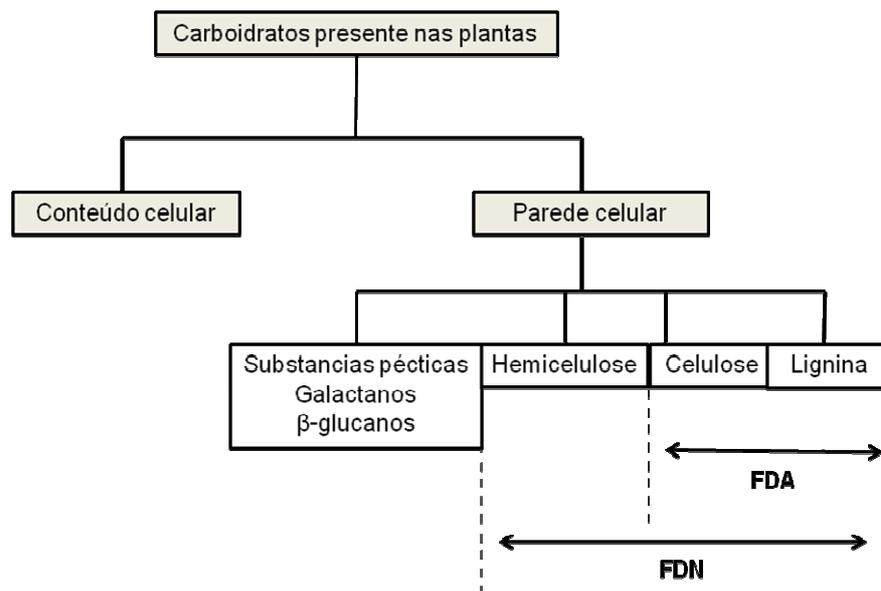


**Figura 5** - Ligações de ácidos *p*-cumárico e ferrúlico com componentes da parede celular (JUNG, 1989).

Nas forrageiras, em dietas de animais herbívoros, especialmente ruminantes, a fibra é nutricionalmente importante por conter a parte orgânica da matéria alimentar mais resistente à ação do processo digestivo no trato gastrintestinal desses animais. Um sistema de análise de forragem deve incluir a determinação dos teores de fibra, proteína e lignina, sendo o primeiro ponto crítico para a precisão dessas determinações a avaliação dos conteúdos de matéria seca (MS) da forragem. Algumas avaliações, tais como as de carboidratos solúveis são de particular importância em pesquisas sobre ensilagem.

As divisões de fibras mais comumente utilizadas em zootecnia são a fibra em detergente neutro (FDN), que compreende a fração fibrosa da forrageira contendo a hemicelulose, a celulose e a lignina, e a fibra em detergente ácido (FDA), que compreende a fração fibrosa exceto a hemicelulose (Figura 6) (HALL, 2001).

A eficiência de utilização de plantas forrageiras pelos animais depende de inúmeros fatores, incluindo a qualidade e a quantidade da forragem disponível, o potencial do animal e a natureza dos produtos da digestão.



**Figura 6** - Componentes presentes nas plantas. FDN = fibra em detergente neutro; FDA = fibra em detergente ácido.

### 1.3 Sistemas enzimáticos em estudo

Nos últimos 30 anos houve um grande aumento no interesse pela busca e pesquisa de enzimas que degradam compostos lignocelulósicos, principalmente devido ao resultado do avanço na industrialização, que gera diariamente toneladas de resíduos sólidos, o qual muitas vezes, se torna um problema de poluição ambiental, e devido ao advindo da política canavieira, que prevê o aproveitamento ao máximo da matéria orgânica na agroindústria, diminuindo a geração de resíduos e agregando

valor a este. Assim, a habilidade de alguns microrganismos degradarem estes compostos torna-se vantajoso industrialmente e comercialmente.

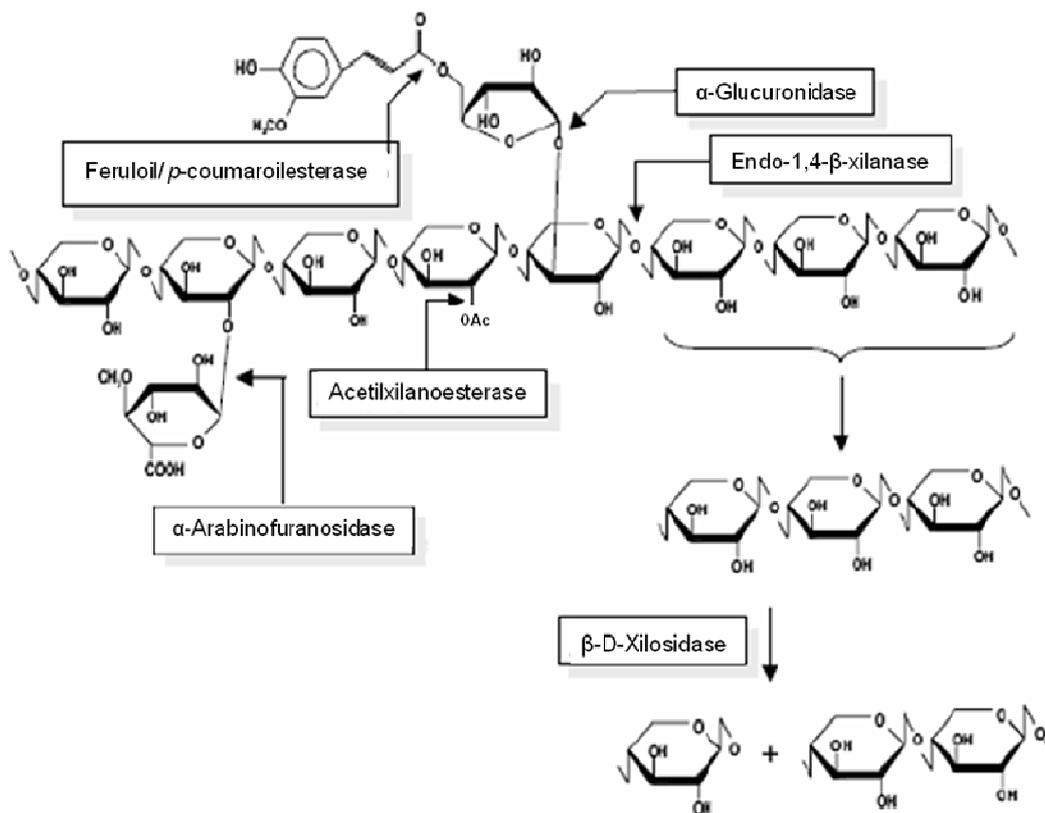
O processo de decomposição está diretamente ligado ao potencial enzimático do microrganismo. Os fungos produzem celulasas, hemicelulasas, pectinases e ligninases, direcionadas à hidrólise da parede vegetal (SZAKACS e TENGARDY, 1997) e possuem uma maior facilidade de acesso ao substrato, uma vez que as hifas do micélio penetram nos tecidos vegetais melhor do que bactérias e protozoários. Assim, têm acesso ao conteúdo celular, indisponível para outros microrganismos do mesmo ambiente (WUBAH et al., 1993).

### **1.3.1 Sistema xilanolítico**

As xilanases catalisam a hidrólise das xilanas. Estas enzimas são produzidas principalmente por microrganismos e participam da desagregação da parede celular de plantas e, em conjunto com outras enzimas, hidrolisam polissacarídeos e também digerem a xilana durante a germinação de algumas sementes. Dentre as fontes microbianas, os fungos filamentosos são especialmente interessantes, uma vez que a secreção destas enzimas para o meio possui níveis muito mais elevados que aqueles secretados por leveduras e bactérias (POLIZELI et al., 2005).

Devido à heterogeneidade da estrutura da xilana, sua degradação requer ação de várias enzimas, ou seja, de um sistema enzimático (Figura 7), denominado sistema xilanolítico. Os componentes deste sistema que têm sido mais extensivamente estudados são as endoxilanases e  $\beta$ -xilosidases. Outras enzimas menos estudadas desse sistema, a  $\alpha$ -arabinofuranosidase, acetilxilano esterase,  $\alpha$ -D-glucuronidase, ácidos ferrúlico e *p*-coumárico esterases foram descobertas apenas no final da década de 80, provavelmente devido à dificuldade de obtenção de substratos adequados (POLIZELI et al., 2005). As endo-1,4- $\beta$ -xilosidases (1,4- $\beta$ -D-xilana xilohidrolase; EC 3.2.1.8) clivam as ligações glicosídicas internas da cadeia principal da xilana, acarretando diminuição do grau de polimerização do substrato e resultando em

xilooligossacarídeos com diferentes comprimentos, as  $\beta$ -D-xilosidases ( $\beta$ -D-xilosídeo xilohidrolase, EC 3.2.1.37) hidrolisam xilooligossacarídeos pequenos e xilobiose a partir da extremidade não redutora, liberando xilose (CHÁVEZ et al., 2006; DELCHEVA et al., 2008), enquanto que as outras enzimas deste sistema clivam os grupos na ramificação: as  $\alpha$ -L-arabinofuranosidases são capazes de hidrolisar os grupos  $\alpha$ -L-arabinofuranosil terminais, as acetil-xilanoesterases hidrolisam as ligações



entre xilose e grupos acetil, as ácido ferrúlico esterases e ácido *p*-coumárico esterases clivam as ligações éster na xilana, respectivamente, entre as cadeias laterais de arabinose e ácido ferrúlico e arabinose e entre arabinose e ácido *p*-coumárico e as  $\alpha$ -glucuronidases hidrolisam as ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,2 entre ácido glucurônico e resíduos de xilose na glucuronoxilana (CHÁVEZ et al., 2006; DOBREV et al., 2007).

**Figura 7** - Representação esquemática de uma molécula de xilana e da atuação das enzimas do sistema xilanolítico. Ac = Grupo acetil (POLIZELI, 2009).

O uso das xilanases teve início na década de 80, primeiramente na preparação de ração animal, e mais tarde em indústria de alimentos, têxtil e papel. Ainda, podemos ressaltar sua aplicação na manufatura de pães e bebidas e em indústrias químicas e farmacêuticas (POLIZELI et al., 2005).

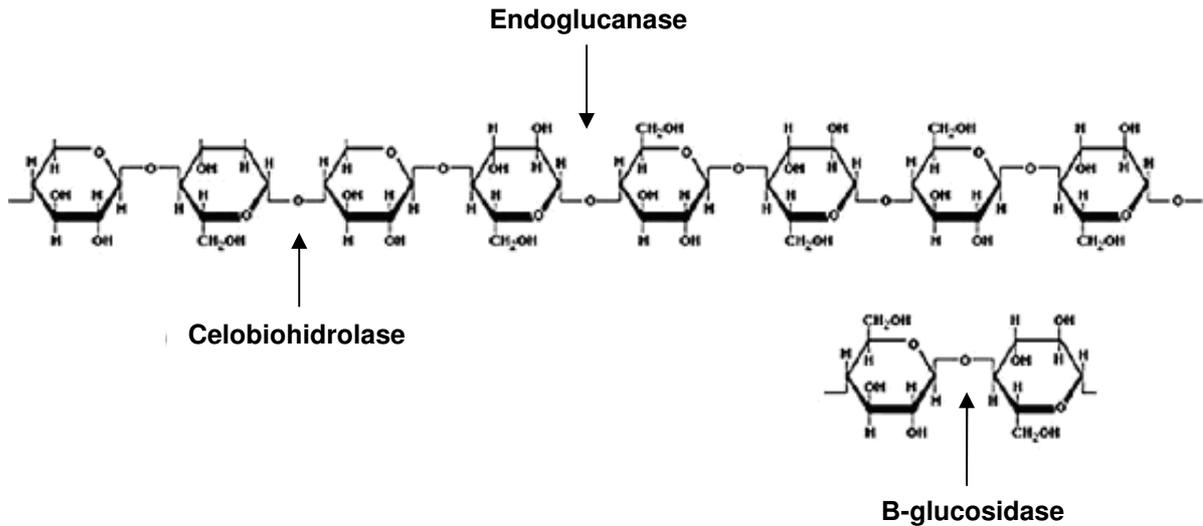
### **1.3.2 Sistema celulolítico**

As celulases são produzidas por um grande número de fungos, principalmente Ascomicetos e Basidiomicetos. O sistema enzimático das celulases é constituído de um conjunto de hidrolases glicosídicas, que envolvem três tipos de enzimas: as endo- $\beta$ -1,4-glucanases ou endoglucanases (EG I, EG II, EG III e EG IV; EC 3.2.1.4), as exo- $\beta$ -1,4-glucanase ou celobiohidrolases, ou apenas exoglucanases (CBH I e CBH II; EC 3.2.1.91), e as  $\beta$ -1,4-glucosidase (BG I e BG II; EC 3.2.1.21). Esses três componentes atuam de forma sinérgica na hidrólise de celulose (DILLON, 2004; ZHANG et al., 2007).

De acordo com o modelo de sinergismo “endo-exo”, estas enzimas cooperam da seguinte maneira: as celobiohidrolases agem como exoenzimas (na extremidade da cadeia) e liberam celobiose como produto principal, as endoglucanases agem randomicamente ao longo da cadeia produzindo novos sítios de ataque para as celobiohidrolases, e as  $\beta$ -glucosidases completam o processo através da hidrólise da celobiose e de outros oligossacarídeos à glicose (ZANDONÁ FILHO, 2001).

As endo-1,4- $\beta$ -D-glucanases hidrolisam a cadeia de celulose de modo aleatório. Estas enzimas hidrolisam a celulose amorfa e celuloses modificadas quimicamente (solúveis), como carboximetilcelulose (CMC) e hidroxietilcelulose (HEC). A celulose cristalina e o algodão, ambos substratos de elevado grau de cristalinidade, são menos hidrolisados devido ao maior grau de organização molecular que apresentam. As exo-1,4- $\beta$ -D-glucanases (celobiohidrolases) atuam nas extremidades não redutoras da cadeia de celulose, produzindo celooligossacarídeos. As celobiohidrolases não atuam

sobre celuloses solúveis por haver um impedimento estereoquímico causado pelos grupos substituintes, seja carboximetílico ou hidroxietílico. Elas atuam sobre a celulose cristalina (Avicel) produzindo uma redução lenta e gradual do seu grau de polimerização. Já as  $\beta$ -glucosidases possuem a função de hidrolisar a celobiose gerada pelas celobiohidrolases e endocelulases em glicose (KUMAR et al., 2008). O sinergismo das celulases está representado na Figura 8.



**Figura 8** - Ação das endoglucanases, exoglucanases (celobiohidrolase) e  $\beta$ -glucosidase na degradação da celulose, adaptado de KUMAR et al. (2008).

As celulases são enzimas de custo relativamente alto, e uma significativa redução no custo de sua produção torna-se um fator importante comercialmente (ZHANG et al., 2006). Nessa perspectiva, é viável o uso de resíduos agroindustriais como substratos para o cultivo de fungos celulolíticos de forma a baratear a produção de celulase.

As celulases têm um vasto campo de aplicação: extração e clarificação de sucos, produção de cerveja e vinhos, alimentação animal, indústria têxtil e papelreira (BHAT, 2000) e, mais recentemente na sacarificação de materiais lignocelulósicos para a produção de etanol (SUKUMARAN et al., 2009).

#### **1.4 Processos fermentativos na produção de enzimas microbianas**

Uma variável questionável ao se utilizar enzimas em bioprocessos tecnológicos, é o custo das mesmas. Considerando que o meio de fermentação é um dos componentes importantes para o preço final do produto, é necessário buscar substratos de baixo custo para o processo fermentativo, como por exemplo, os resíduos agroindustriais.

Estima-se que sejam geradas 1000 toneladas por ano de resíduos agrícolas e agroindustriais no Brasil. Grande parte desses resíduos fica disponível no campo tornando-se, muitas vezes, um poluente ambiental e um problema de ocupação de espaço devido à lenta degradação natural ou, em alguns casos, são usados para geração de energia elétrica em algumas indústrias. Apenas uma pequena parte (5%) desses materiais é utilizada na alimentação de animais de produção (YANG et al., 2001). Dessa maneira, o uso de materiais como os lignocelulósicos torna-se uma importante ferramenta no processo fermentativo de produção, principalmente de enzimas fibrolíticas que degradam compostos como celulose, hemicelulose e lignina, de forma a reduzir o custo desta produção.

Na região noroeste do estado de São Paulo há abundância de resíduos agroindustriais, tais como bagaço de cana-de-açúcar e de laranja, cascas de frutas, resíduos da fabricação de farinha de mandioca, etc. os quais podem ser usados como fonte de carbono e de outros nutrientes para a fermentação, ou mesmo como suporte inerte de outros substratos.

Entre os processos de fermentação utilizados para produção enzimática, a fermentação submersa (FSm) tem sido mais usada, entretanto, vem aumentando o uso da fermentação em substrato sólido (FES), em especial para enzimas que atuam sobre polímeros vegetais. Dessa forma, a produção de enzimas por processos fermentativos é um vasto campo da biotecnologia que resta muito ainda para se conhecer e explorar, principalmente quando se trata da utilização de resíduos agroindustriais (RODRIGUEZ COUTO e SANROMÁN, 2005).

Tanto o processo de FES quanto o de FSm apresentam características importantes, assim, é necessário avaliar as vantagens e desvantagens em cada processo fermentativo, considerando o tipo de substrato desejado tanto na fermentação sólida quanto na líquida e, principalmente, o grupo de microrganismos a ser utilizado, pois a maioria dos microrganismos não produz quantidades semelhantes das enzimas de interesse em ambos os tipos de fermentação.

A FES pode ser definida como o crescimento de microrganismos sobre suportes sólidos úmidos na ausência ou próximo da ausência de água livre entre as partículas do material sólido. Este suporte pode ser qualquer substrato natural sendo usado como fonte de carbono e energia, ou ainda pode servir como suporte inerte podendo ser enriquecido com solução nutriente (BHANU-PRAKASH et al., 2008; DIORIO et al., 2008). A FSm por sua vez, é definida como aquela cujo substrato fica dissolvido ou suspenso em pequenas partículas no líquido, normalmente água. Na FSm a água chega a constituir cerca de 90 a 99% da massa total do material a ser fermentado. Esse tipo de fermentação apresenta como principais vantagens, o fácil acompanhamento da formação do produto e consumo do substrato e o controle dos parâmetros fermentativos como pH, temperatura, oxigenação e esterilidade. Como principais desvantagens, têm-se o grande volume de resíduos gerados e a dificuldade de separação produto / substrato (MITCHELL et al., 2000).

A FES tem se tornado muito atrativa e vantajosa, primeiro porque simula as condições de vida dos fungos filamentosos, ou seja, os meios sólidos se assemelham aos meios naturais como solos onde esses fungos se desenvolvem e, segundo, porque podem utilizar como substrato e suporte para a FES resíduos agrícolas e agroindustriais que são economicamente importante para minimizar problemas ambientais. Os resíduos agroindustriais, como farelo de trigo, bagaço de laranja, bagaço de cana-de-açúcar, farelo de soja e palha de arroz e de milho têm sido empregados com sucesso como substratos na produção de enzimas por FES (DE GREGORIO et al., 2002; SILVA et al., 2002 e 2006; FREITAS et al., 2005; PEIXOTO-

NOGUEIRA et al., 2008a).

Nos últimos anos, os processos em FES são relatados por vários pesquisadores como uma alternativa para a FSm, devido a algumas vantagens, tais como: menor risco de contaminação bacteriana resultantes do baixo requerimento de água, menores problemas de efluentes líquidos, disposição de resíduos e estabilidade do produto devido à baixa diluição do meio, fácil aeração devido à porosidade do material e extração facilitada pela alta concentração de produtos (IMANDI et al., 2008; LIA e JIA, 2008; MUKHERJEE et al., 2008; SUN e XU, 2008). Como desvantagens podem ser destacadas: as dificuldades no controle dos parâmetros do processo fermentativo (pH, temperatura, umidade e crescimento celular) e a necessidade de volumes relativamente grandes de inóculo. O principal fator limitante, no entanto, refere-se à dificuldade de vários grupos microbianos em crescer sob baixos teores de umidade, o que acaba por restringir o processo ao uso de fungos filamentosos, que se adaptam bem a essa condição. Desse modo, a FES tem se mostrado adequada para a produção de enzimas por fungos filamentosos (PANDEY et al., 1999).

A busca pela redução dos custos para a produção de enzimas faz com que aumente as investigações sobre substratos e microrganismos usados na fermentação em estado sólido. A produção de enzimas por esta forma de cultivo é um processo atraente, sob o ponto de vista econômico, devido, principalmente a possibilidade de obtenção de uma maior concentração enzimática por unidade de volume (SOCCOL e VANDERBERGHE, 2003).

### **1.5 Aplicações industriais das enzimas em estudo**

O grande interesse no estudo de enzimas está na sua possibilidade de aplicação em diversos setores da indústria melhorando procedimentos e produtos já existentes, bem como no estabelecimento de novos processos. As principais aplicações das enzimas em estudo são a xilanase para o biobranqueamento da polpa de celulose, na indústria de papel e celulose (BHAT, 2000; WHITMIRE e MITI, 2002; TECHAPUN et

al., 2003, SANDRIM et al., 2005; PEIXOTO-NOGUEIRA et al., 2009) na indústria alimentícia, principalmente na panificação para aumentar o volume específico do pão, determinando a textura do miolo e seu sabor final (HARBAK e THYGESEN, 2002, CAMACHO e AGUILAR, 2003) e na indústria de sucos e vinhos (BIELY, 1985); a xilanase e celulase na produção de etanol e xilitol (ARISTIDOU e PENTILLÄ, 2000; SCREENATH e JEFRIES, 2000; HAHN-HÄGERDAL et al., 2006; SUKUMARAN et al., 2009), na indústria têxtil tanto no processo de degomagem de fibras de rami (BRÜHLMANN et al., 2000) quanto no processo de bioestonagem (DILLON, 2004) e também, na indústria de ração animal, principalmente de ruminantes (JURKOVICH et al., 2006; UGWUANYI, 2008; JALILVAND et al., 2008; EUN e BEAUCHEMIN, 2008; KRUEGER e ADESOGAN, 2008).

### **1.5.1 Aplicação das enzimas na nutrição de ruminantes**

O rúmen possui importantes populações bacterianas, grande quantidade de fungos e protozoários anaeróbicos. Os protozoários do rúmen não são essenciais para a digestão da fibra e, na ausência deles, frequentemente o número de bactérias aumenta e mantém a digestão da fibra de celulose. Recentemente, as bactérias celulolíticas do rúmen foram estudadas extensamente e apontadas como os primeiros degradadores das fibras. Os fungos anaeróbicos do rúmen são capazes de colonizar fragmentos de plantas e penetrar na cutícula e na parede celular de tecidos lignificados no rúmen nas dietas de alimentos fibrosos, e ter atividade celulolítica. Os fungos também podem desempenhar um importante papel sinérgico na digestão ruminal da fibra pelo rompimento físico do tecido lignificado, permitindo que outros microrganismos do rúmen tenham mais fácil acesso ao talo e à porção digestível da planta. A composição e proporção de microrganismos do rúmen são afetadas por muitos fatores, tais como dieta, localização geográfica e interação animal-hospedeiro (CHEN et al., 2008a).

Considerando o potencial de digestão da fibra pelos microrganismos ruminais, torna-se difícil entender como a adição de complexos enzimáticos poderia melhorar a utilização da fibra pelos ruminantes. Entretanto, o processo de digestão da forragem é consideravelmente incompleto, apresentando um grande impacto na ingestão, principalmente quando se trata de forragens tropicais. De acordo com Varga e Kolver (1997), cerca de 20 a 70% da celulose pode não ser digerida e aproveitada pelo animal em função de fatores como a estrutura e composição da planta e de aspectos relacionados ao animal como a mastigação, salivação e pH ruminal.

Nutricionistas de ruminantes e microbiologistas têm interesse há muito tempo na manipulação do ecossistema microbiano do rúmen para aumentar a utilização e qualidade do alimento, melhorar a eficiência de produção dos ruminantes e aliviar os problemas associados com práticas de alimentação decorrente (LEE et al., 2000). Desde 1960, numerosos estudos focalizaram o assunto de adição de vários microrganismos e/ou aditivos alimentares químicos à dieta dos ruminantes. Segundo Rode et al. (1999) as enzimas fibrolíticas poderiam contribuir diretamente com a hidrólise da fibra do rúmen, por proporcionarem um aumento na concentração de substrato para os microrganismos celulolíticos, intensificando a atividade das enzimas microbianas sobre a fibra.

Assim, as enzimas em estudo (xilanasas e endoglucanases) podem ser aplicadas como aditivo em ração para ruminantes, no intuito de aumentar a digestibilidade de alimentos fibrosos e, conseqüentemente, o desempenho do animal. Essas enzimas atuam degradando os carboidratos ingeridos no alimento e fornecem açúcares menores para a microbiota presente no rúmen bovino. Na presença desses oligossacarídeos rapidamente assimiláveis, há uma maior e mais rápida proliferação das bactérias no rúmen aumentando a eficiência do processo de digestão (MARTINS, 2003; LOURES, 2004). Ainda, enzimas exógenas têm sido aplicadas em ruminantes para melhorar a digestibilidade da forrageira e, conseqüentemente, o consumo voluntário de alimento. Além disso, outros possíveis benefícios incluem a remoção de

fatores antinutricionais (taninos, alcalóides, inibidores de amilases), com a melhora na disponibilidade de certos nutrientes da planta.

O aditivo à base de enzima é caracterizado pelo extrato enzimático concentrado produzido pela fermentação fúngica (*Trichoderma longibrachiatum*, *Aspergillus niger* e *A. oryzae*) e/ou bacteriana (*Bacillus* spp. *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum* e *Streptococcus faecium*). Este concentrado não deverá conter células microbianas devido aos processos de filtração para a obtenção do produto final (BEAUCHEMIN et al., 2003).

Fungos do gênero *Aspergillus* são considerados bons produtores da enzima exógena fibrolítica xilanase utilizada na indústria de alimentos para animais. Esse gênero é comumente encontrado no ambiente, é cosmopolita, caracterizado pelo seu rápido crescimento e alta capacidade de utilizar diversos substratos.

A eficácia dessas enzimas como aditivo é parcial devida à hidrólise melhorada da fibra, o que frequentemente aumenta a digestibilidade (DE HAAN et al., 2007; DEGHAN-BANADAKY et al., 2007) e cede mais energia metabolizável para os ruminantes (TITI e TABBAA, 2004). Estas enzimas exógenas trabalham em sinergia com as enzimas endógenas microbianas do rúmen, hidrolisando a parede celular das forrageiras, aumentando a digestão dos carboidratos estruturais e a degradação de material da planta no intestino posterior do ruminante sendo benéfica ao equilíbrio total de energia no animal (EUN e BEAUCHEMIN, 2007a; MURRAY et al., 2007; KRUEGER e ADESOGAN, 2008). Muito da variabilidade da atuação destas enzimas são atribuídas a fatores tais como o tipo e a atividade da enzima, as condições de cultura empregada (EUN e BEAUCHEMIN, 2007a), nível de suplementação e enzima fornecida, estabilidade da enzima no aparelho digestivo (YANG et al., 2001; GIRALDO et al., 2008), composição da dieta, método de aplicação da enzima e o balanço energético dos animais testes.

Fisiologicamente, existe uma série de possíveis modos de ação das enzimas exógenas e, conforme descrito, esses efeitos podem ser tão simples como a liberação

de carboidratos solúveis ou tão complexos como a remoção de íons de barreiras estruturais. O grau de liberação dependerá do tipo de alimento e do tipo de enzima utilizada (KRUEGER e ADESOGAN, 2008).

### **1.6 Efeito das enzimas fibrolíticas na digestibilidade ruminal**

Os mecanismos pelos quais as enzimas fibrolíticas podem melhorar a digestibilidade, o desempenho e a lactação em ruminantes permanecem ainda pouco explorados, apesar de terem recebido maior enfoque nos últimos anos. Parte dessa contribuição vem de resultados de pesquisas que observaram o aumento da degradação da fibra pelos microrganismos ruminais (HRISTOV et al., 2000; EUN e BEAUCHEMIN, 2007a; KRUEGER e ADESOGAN, 2008; GIRALDO et al., 2008).

O método de aplicação das enzimas fibrolíticas nas dietas é um fator decisivo para a ação das enzimas em ruminantes, daí, a necessidade de determinar se as enzimas são mais efetivas quando adicionadas diretamente na forragem, no concentrado ou na mistura total de ração (YANG et al., 1999).

Uma técnica bastante usada para determinar a degradabilidade das frações do alimento e comparar os diferentes resíduos é a técnica de degradação *in situ*. Quando se conhece o comportamento do desaparecimento ruminal das entidades nutricionais, especialmente dos volumosos, há maior precisão no balanceamento de rações para ruminantes (MARTINS, 2003). Segundo Hristov et al. (2000) a suplementação intraruminal de enzimas que degradam polissacarídeos da parede celular aumentou a degradabilidade efetiva *in situ* e a fração solúvel da matéria seca (MS) da cevada em grão. Assim, são necessários estudos de forma a aprimorar a digestibilidade da fibra através de enzimas fibrolíticas exógenas.

Segundo Nsereko et al. (2000), o aumento da degradabilidade da fibra pode ser atribuído ao crescimento da população de microrganismos, o que contribuiria para maior degradação da fibra no rúmen. A provável explicação para este aumento da população seria a remoção das barreiras estruturais da parede celular pela ação das

enzimas fibrolíticas (xilanases e celulases), o que tornaria mais fácil a colonização da fibra pelas bactérias ruminais. Adicionalmente, as preparações enzimáticas poderiam agir como defaunadores, permitindo que a população bacteriana estivesse menos susceptível à predação de protozoários.

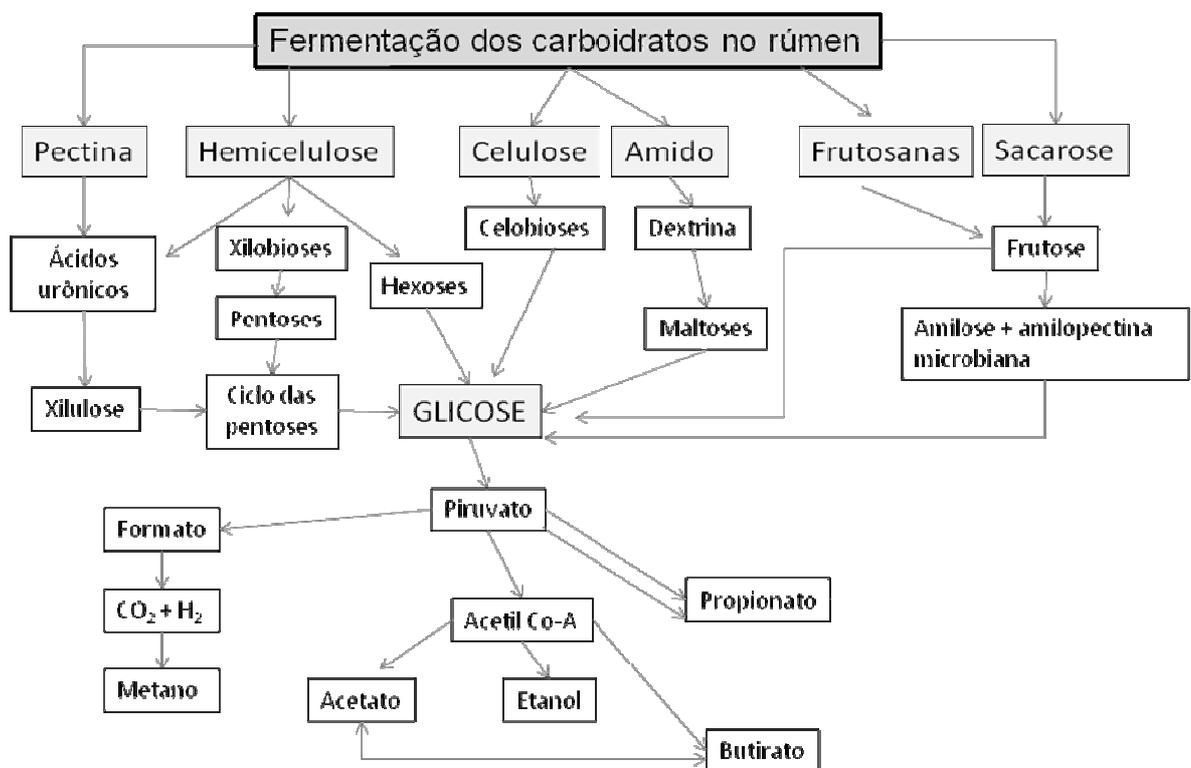
Alguns estudos têm sido desenvolvidos com a adição de preparados enzimáticos. Beauchemin e Rode (1996) informaram que ao adicionar um produto enzimático contendo atividade de xilanase e celulase ao feno de alfafa, o ganho médio diário e o crescimento do gado de corte aumentaram por até 30%. Nsereko et al. (2000) e Colombatto et al. (2003b) relataram que produtos enzimáticos contendo xilanases, esterases e proteases tiveram efeitos estimulatórios na degradação do feno de alfafa *in vitro*. Eun et al. (2006) mostraram que a alimentação com enzimas exógenas, no caso xilanase e celulase, levou a efeitos positivos em vacas lactantes e gado de corte melhorando a digestibilidade da fibra em detergente neutro (FDN), e da fibra em detergente ácido (FDA).

É válido ressaltar que a adição de xilanases pode, até mesmo, alterar as atividades fisiológicas da população bacteriana ruminal (COLOMBATTO et al., 2003b). Desta maneira, é comum observar aumento na produção de propionato e butirato e diminuição na de acetato (Figura 9), como resultado do emprego da enzima fibrolítica (EUN e BEAUCHEMIN, 2007b). Essas mudanças fisiológicas resultam do aumento na digestibilidade do alimento. Outra vantagem na adição de enzimas é a redução na liberação de gás metano pelo rebanho, que por seu um poluente preocupante, pois juntamente com o dióxido de carbono é responsável pelo efeito estufa, provoca retenção do calor e aquecimento da superfície da terra.

Portanto, a adição de enzimas fibrolíticas exógenas na dieta destes animais aumenta a atividade enzimática fibrolítica do rúmen, reforçando que enzimas exógenas atuam sinergisticamente com a microbiota do rúmen resultando em um aumento muito superior na digestão do alimento (EUN e BEAUCHEMIN, 2005).

No Brasil a maior parte dos bovinos é alimentada principalmente com forragens

e, devido a região tropical na qual se encontram, além de apresentarem qualidade nutricional inferior, em função de maiores teores de parede celular e lignina, também apresentam menores teores de proteínas, enquanto que nos Estados Unidos e Canadá, países onde foram realizados a maior parte dos estudos citados acima, as forrageiras são mais digestíveis pelos ruminantes. Assim, a busca por enzimas despolimerizantes de material vegetal e sua aplicação na digestibilidade ruminal é de fundamental importância nesses estudos.



**Figura 9** – Esquema ilustrativo da formação de propionato, butirato, acetato e metano a partir da fermentação de carboidratos.

## *2.OBJETIVOS*

Neste trabalho, objetivou-se:

- coleta de amostras para isolamento de fungos filamentosos para a produção de xilanases e celulases (CMCases);
- seleção de um bom produtor destas enzimas;
- otimização das condições de cultivo tanto em FES quanto em FSm, variando parâmetros físico-químicos e nutricionais;
- caracterização bioquímica dos extratos brutos produzidos;
- aplicação dos extratos na hidrólise de forrageiras tropicais tanto frescas quanto processadas;
- produção e aplicação do extrato bruto obtido na digestibilidade *in vitro* de ruminantes como aditivo em rações;
- verificação da produção de gás na digestibilidade *in vitro* utilizando diferentes concentrações de extrato;
- verificação da estabilidade do extrato enzimático em fluido ruminal *in vivo* em cabras fistuladas.

# *3. MATERIAL E MÉTODOS*

### 3.1 Coleta de fungos filamentosos

Este trabalho fez parte de um projeto temático junto à rede BIOTA-Bioprospecta (FAPESP). A coleta foi realizada em fazendas nos municípios de Água Vermelha e de Ubarana, e na FCAV - UNESP (Jaboticabal) (Figuras 10 A, B e C, respectivamente). Esta foi realizada em solos de pastagens, materiais em decomposição, gramíneas, estrume bovino, silagens e capim fresco e seco seguindo as normas estabelecidas pela FAPESP. Para um rigoroso controle e identificação do local de coleta utilizou-se georreferenciamento por GPS - "Global Positioning Systems" para determinação da latitude, longitude e altitude (Tabela 1). Outros dados como data, temperatura ambiente do momento da coleta foram sempre registrados de acordo com a ficha padrão para coletas e registro BIOTA/FAPESP, disponível no site: <http://sinbiota.cria.org.br>.

**Tabela 1** – Coletas realizadas em Agosto/2007 em diferentes locais de pastagens

Local da coleta	Precisão GPS (m)	Latitude (°)	Longitude (°)	Elevação (m)	T. (°C)
Água Vermelha	15	21° 47.598'	47° 50.215'	601	29
Ubarana	9	21° 09.977'	49° 43.521'	404	27
Jaboticabal	9	21° 14.263'	48° 17.488'	581	28

T. = temperatura

### 3.2 Isolamento e identificação dos microrganismos

O isolamento dos fungos filamentosos foi realizado por dois métodos diferentes: primeiro, segundo a metodologia de plaqueamento com diluições sucessivas, onde suspensões de solo, contendo traços de pentabiótico foram inoculadas em distintas diluições em placas de Petri contendo meio de cultura constituído por farinha de aveia Quaker® 4% e ágar bacteriológico 2% (EMERSON, 1941) e, segundo, o material foi espalhado pela superfície do meio sólido da placa com alça de Drigalski. As placas,

em seguida, foram incubadas em estufa bacteriológica, em temperaturas de 30 e 40°C.



**{A}**



**{B}**



**{C}**

**Figura 10** - Locais de coleta das amostras. **(A)** Curral em fazenda em Água Vermelha; **(B)** Sítio no município de Ubarana; **(C)** Silagem de milho na FCAV-UNESP (Jaboticabal). Fotografia: F.D.A.Facchini.

Decorridos alguns dias de incubação, diferentes fungos se desenvolveram nas placas (Figura 11), seguiu-se então, o isolamento dos espécimes através de inóculo em estrias utilizando-se alça de platina. Este procedimento foi realizado até obterem-se culturas homogêneas. O isolamento foi realizado de acordo com observação

macroscópica, quanto à cor dos esporos, mudança de cor do meio de cultura provavelmente devido à formação de metabólitos secundários, textura (liso, enrugado, hifas aéreas), etc.



**Figura 11** - Exemplo de fungos desenvolvidos em placa de Petri com meio sólido de Aveia após diluição do material coletado. Fotografia: F.D.A.Facchini.

### **3.3 Manutenção da cepa**

As cepas foram mantidas em laboratório, em meio complexo de aveia (composição item 3.2) ou em meio PDA (potato dextrose agar) fornecido por Acumedia®. Os repiques foram realizados periodicamente, com auxílio de uma alça de platina, e mantidos a 30°C ou 40°C durante 5 a 7 dias. Posteriormente, estes foram vedados e conservados em geladeira, à temperatura de 4°C.

A manutenção de todo o acervo de fungos utilizado foi também realizada em sílica gel, onde uma suspensão de esporos foi preparada em 5 mL de solução de leite Molico® desnatado (20 g/100 mL de água destilada). Desta suspensão, aproximadamente 1,2 mL foram misturados a 6 g de sílica-gel branca 1-4 mm contida em tubos de ensaio (16 x 100 mm) vedados com rosca. Foram armazenados dois tubos para cada espécime. Todos os passos foram conduzidos de forma asséptica. Outra forma de manutenção foi em óleo mineral no qual os tubos com a massa

micelial foram cobertos com 6 mL de água destilada autoclavada e 4 mL de óleo mineral à temperatura ambiente.

### **3.4 Seleção e identificação dos microrganismos produtores de xilanases e CMCases**

Logo após o isolamento, os fungos filamentosos foram submetidos à fermentação sólida com farelo de trigo durante 5 dias de crescimento a 30°C ou 40°C, em estufa com 70% de umidade relativa. Assim foram selecionadas quatro cepas, identificadas na Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Centro de Ciências Biológicas – Departamento de Micologia. Assim, as três cepas restantes foram submetidas à fermentação submersa em 5 diferentes meios líquidos (Vogel, SR, Adams, Khanna e Czapeck) para comparação da produção enzimática e seleção de apenas uma cepa.

### **3.5 Condições de cultivo**

#### **3.5.1 Fermentação submersa (FSm)**

Os conídios ( $3,0 \times 10^7$  conídios /mL), obtidos a partir de culturas estoques, foram raspados com alça de platina e suspensos em 12 mL de água destilada estéril. Um volume de 1 mL da suspensão de conídios foi inoculado em frascos Erlenmeyer de 125 mL, contendo 25 mL de meio líquido e incubados a 30°C, por 120 horas, em estufa bacteriológica (ou conforme especificado em cada experimento). Os meios testados e suas composições estão descritos a seguir:

#### **Meio Khanna (KHANNA et al., 1995)**

Solução de sais de Khanna [20x] .....	5,0 mL
Extrato de levedura .....	0,1 g
Fonte de carbono .....	1,0 g

Água destilada q.s.p.....100 mL

Solução de sais de Khanna [20X]

NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> .....2,0 g

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> .....1,3 g

MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O .....0,362 g

KCl .....0,098 g

ZnSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O.....0,007 g

MnSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O .....0,0138 g

Fe<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O .....0,0066 g

CuSO<sub>4</sub>.5 H<sub>2</sub>O.....0,0062 g

Água destilada q.s.p. .... 100 mL

**Meio Adams (ADAMS, 1990)**

Extrato de levedura. ....0,2g

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> .....0,1g

MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O .....0,05g

Fonte de carbono. ....1g

Água destilada q.s.p ..... 100mL

**Meio SR (RIZZATTI et al., 2001)**

Solução de sais SR [20x] .....5,0 mL

Peptona.....0,02 g

Extrato de levedura .....0,45 g

Fonte de carbono .....1,0 g

Água destilada q.s.p. .... 100 mL

Solução de sais SR [20X]

MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O .....0,24 g

---

$\text{KH}_2\text{PO}_4$ .....	0,3 g
$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ .....	1,0 g
Água destilada q.s.p. ....	100 mL

**Meio Vogel (VOGEL, 1964).**

Solução de sais de Vogel [50x] .....	2,0 mL
Solução de biotina.....	20 $\mu\text{L}$
Fonte de carbono .....	1,0 g
Água destilada q.s.p.....	100 mL

Solução de sais de Vogel [50X]

$\text{Na}_3(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7) \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ .....	15 g
$\text{KH}_2\text{PO}_4$ .....	25 g
$\text{NH}_4\text{NO}_3$ .....	10 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ .....	1,0 g
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ .....	0,5 g
Solução de traços de elementos .....	0,5 mL
Clorofórmio .....	0,2 mL
Água destilada q.s.p. ....	100 mL

Solução de traços de elementos

Ácido cítrico. $\text{H}_2\text{O}$ .....	5 g
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ .....	5 g
$\text{Fe}(\text{NH}_4)_2 \cdot (\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ .....	1 g
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ .....	0,25 g
$\text{H}_3\text{BO}_3$ .....	0,05 g
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ .....	0,05 g
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ .....	0,05 g
Clorofórmio .....	1 mL

Água destilada q.s.p. .... 100 mL

Solução de biotina

Biotina ..... 0,005 g

Etanol 50%..... 100 mL

**Meio Czapeck (WISEMAN, 1975).**

NaNO<sub>3</sub>..... 0,3 g

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ..... 0,1 g

MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O ..... 0,05 g

KCl ..... 0,05 g

FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O ..... 0,001 g

Fonte de carbono ..... 1,0 g

Água destilada q.s.p. .... 100 mL

**3.5.2 Fermentação em estado sólido (FES)**

Um volume de 1 mL de solução de conídios (descrito em 3.5.1) foi inoculado em Erlenmeyer de 125 mL contendo 2 g de substrato (resíduos agroindustriais), 3 mL de água destilada ou solução salina e 1 mL de inóculo suspenso em água destilada autoclavada. Os frascos foram incubados a 30°C por um período variável, em estufa bacteriológica com aproximadamente 70% de umidade relativa, controlada por higrômetro.

**3.6 Contagem dos conídios em Câmara de Neubauer**

Primeiramente, obteve-se uma solução adicionando água destilada asséptica ao tubo de ensaio, solubilizando os conídios do fungo com o auxílio de um bastão de vidro. Depois se procederam as diluições necessárias para a contagem de conídios

presentes na solução na Câmara de Neubauer. Para os inóculos utilizou-se uma solução com  $3,0 \times 10^7$  conídios por mL.

### **3.7 Obtenção das preparações enzimáticas**

#### **3.7.1 Fermentação Submersa**

As culturas, após crescimento nas condições padronizadas, foram filtradas a vácuo com auxílio de um funil de Büchner e papel de filtro. Para os ensaios enzimáticos extracelulares foi utilizado o filtrado.

#### **3.7.2 Fermentação em estado sólido**

Após o período de incubação, adicionou-se aos frascos 30 mL de água destilada fria. A mistura foi agitada a 100 rpm por 30 minutos, a 4°C para a extração das enzimas. As culturas foram inicialmente filtradas em gaze e, em seguida, filtradas a vácuo em funil de Büchner, com auxílio de papel de filtro para a obtenção de um filtrado livre de células e de substrato. Para os ensaios enzimáticos extracelulares foi utilizado o filtrado.

### **3.8 Dosagens enzimáticas**

#### **3.8.1 Xilanases e celulases (CMCase, FPase e Avicelase)**

A atividade foi detectada pela formação de açúcares redutores a partir de xilana Birchwood (Sigma), CM-celulose fibrous form (Sigma), Avicel (Cellulose D, Riedel-de Haën) ou papel de filtro Whatman nº 2 (KERSTERS-HILDERSON et al., 1982), pelo método do ácido 3',5'-dinitrosalicílico, DNS (MILLER, 1959). A mistura da reação foi composta de 0,2 mL de solução de substrato 1% (p/v) em tampão

Mcllvaine<sup>1</sup> para as xilanases ou tampão acetato de sódio 0,1M para as CMCases, ambos em pH 5,0 (inicialmente) e 0,2 mL do extrato enzimático. A reação foi realizada a 50-60°C e alíquotas de 0,1 mL foram retiradas em diferentes tempos e adicionadas a 0,1 mL de DNS. Para cada reação enzimática foi determinado um branco (tempo zero). Posteriormente, os tubos foram fervidos por 5 minutos e depois de resfriados, 1 mL de água destilada foi adicionado. As leituras espectrofotométricas foram realizadas a 540 nm, utilizando-se uma curva padrão de xilose ou de glicose (1 mg/mL) para xilanase e CMCases, respectivamente. A unidade de atividade (U/mL) foi definida como sendo a quantidade de enzima capaz de liberar 1  $\mu$ mol de açúcar redutor por minuto. A unidade enzimática total (U total) foi definida como a U/mL multiplicado pelo volume total obtido da fermentação de cada Erlenmeyer e, a U/g, obtida na FES, é referente ao valor da U total dividido pelo peso em gramas de substrato sólido utilizado em cada Erlenmeyer para a fermentação.

### **3.8.2 $\beta$ -xilosidase, acetil-xilanoesterase, arabinofuranosidase, $\alpha$ -glucuronidase e $\beta$ -glucosidase**

Para dosar a atividade destas enzimas utilizou-se o método descontínuo de Kersters-Hilderson et al. (1982) sendo o *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-xilopiranosídeo (PNP-xil) para a  $\beta$ -xilosidase, o *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-glicosídeo (PNPG) para a  $\beta$ -glucosidase, *p*-nitrofenil-acetato (PNP-acetato) para acetil-xilanoesterase, *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-arabinofuranosídeo (PNP-ara) para arabinofuranosidase, e 4-*o*-metil-D-glucurono-D-xilana para  $\alpha$ -glucuronidase, os substratos destas reações compostas de 0,05 mL de substrato 0,25% (p/v) em água destilada, 0,2 mL de tampão Mcllvaine pH 5,0 e 0,15 mL do extrato enzimático. As reações foram realizadas a 50°C e alíquotas de 0,1 mL foram retiradas em diferentes tempos e adicionadas a 1 mL de solução saturada de tetraborato de sódio. Para cada reação enzimática foi determinado um branco como

---

<sup>1</sup> Tampão contendo mistura em adequadas proporções de ácido cítrico, 0,1M e Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,2M

sendo o tempo zero de reação. As leituras espectrofotométricas foram realizadas a 405 nm, utilizando-se uma reta padrão de *p*-nitrofenol nas concentrações de 0 a 0,6  $\mu\text{mol/mL}$ , cuja absorvidade foi 2,94. A unidade de atividade (U/mL) foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar um  $\mu\text{mol}$  de *p*-nitrofenol por minuto.

Para acetil-xilanoesterase o ensaio foi contínuo, realizado em espectrofotômetro com banho termostatizado. O substrato sintético utilizado foi: *p*-nitrofenil-acetato (PNP-acetato). A reação foi composta de 0,1 mL de substrato 0,25% (p/v) em água destilada, 0,45 mL de tampão McIlvaine pH 5,0 e 0,45 mL do extrato enzimático e incubada a 50°C. Vale ressaltar que à mistura de reação não se adicionou tetraborato de sódio, uma vez que os ensaios eram contínuos.

### **3.8.3 Dosagem de outras enzimas**

A atividade de amilase e poligalacturonase (pectinase) foram detectadas pela formação de açúcares redutores a partir de amido e polipeptato de sódio 1% pelo método do ácido 3',5'-dinitrosalicílico, DNS (MILLER, 1959). A atividade de protease, tanase, lipase e fitase, foram dosadas segundo Wang e Hsu (2005), Sharma et al. (2000), Pencreac'h e Baratti (1996) e Yin et al. (2007) utilizando como substratos caseína, metil galato, *p*-nitrophenil palmitato e ácido fítico, respectivamente.

### **3.9 Dosagem de proteínas totais**

A quantificação de proteínas foi estimada pelo método de Lowry et al. (1951) que utiliza albumina de soro bovino (BSA) como padrão na concentração de 200  $\mu\text{g/mL}$ . A unidade foi definida como mg de proteína total, ou seja, mg/mL de proteína obtida multiplicado pelo volume final total da fermentação.

### **3.10 Padronização da produção enzimática**

#### **3.10.1 Efeito da temperatura**

A temperatura foi variada para verificar o crescimento do microrganismo em placas de Petri e para a produção nas fermentações sólida e submersa. Para o crescimento em placas de Petri foi utilizado o meio sólido de Aveia em temperaturas de 25°C a 50°C durante um período de 3 dias. Para ambas as fermentações o farelo de trigo foi utilizado como substrato e a temperatura foi variada de 25°C a 45°C, durante 3 dias sob 100 rpm de agitação para a FSm e, durante 5 dias para FES com 70% de umidade relativa.

#### **3.10.2 Efeito da fonte de carbono**

A variação da fonte de carbono tanto da FSm quanto da FES procedeu em duas etapas: primeiramente foram utilizados diferentes resíduos agroindustriais (bagaço de cana, farelo de trigo, farelo de soja, sabugo de milho, milho moído, casca de laranja, palha de arroz, palha de milho, serragem de eucalipto, silagem de Tifton seco, tipos de grama fresca, e etc.) como fonte de carbono (2 g para FES e 1% para FSm) para verificar a produção enzimática. Em seguida, as fontes que obtiveram os melhores valores de atividade foram selecionadas e misturadas em diferentes proporções (1:3, 2:2, e 3:1 g/g) para verificar a ocorrência de algum aumento na produção enzimática. Como controle foi considerada a fonte que indicou melhor produção de xilanase e CMCase na primeira etapa.

#### **3.10.3 Efeito da umidificação com diferentes soluções salinas em FES**

Aos 2 g de substrato foram acrescentados 4 mL de diferentes tipos de água (água destilada, de torneira e miliQ) ou diferentes soluções salinas (Khanna, SR e Vogel) para verificar seu efeito sobre a produção enzimática em FES.

### **3.10.4 Efeito da fonte de nitrogênio**

Tanto para a FSm quanto para a FES, foi variada a fonte de nitrogênio utilizando fontes orgânicas (peptona, extrato de levedura e uréia) e inorgânicas ( $\text{NH}_4\text{SO}_3$ ,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $\text{NH}_4\text{SO}_2$ , etc.) para verificar a influência destas na produção enzimática e no crescimento do fungo. Para a FSm, foram utilizados Erlenmeyers de 125 mL com 25 mL de meio líquido de cultivo SR previamente padronizado utilizando como fonte de carbono xilana Birchwood ou CM-celulose, de forma a não haver interferências da fonte de carbono no experimento e, como fonte de nitrogênio, apenas a que estava sendo testada. Os Erlenmeyers foram incubados a 30°C em condições estáticas. Para a FES foi verificada a influência da fonte de nitrogênio na ausência dos sais presentes na solução salina utilizada para umidificar o meio de cultivo.

### **3.10.5 Planejamento fatorial para a FSm na produção enzimática**

Esse experimento foi realizado com o auxílio do Prof. Dr. Luis Alexandre Pedro de Freitas, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo.

Foi testada a influência dos componentes peptona ( $X_1$ ), extrato de levedura ( $X_2$ ) e fonte de carbono ( $X_3$ ), na síntese de xilanase e CMCases pelo fungo *A. japonicus* em fermentação submersa utilizando o meio SR. Optou-se por um planejamento fatorial  $2^3$  (três fatores em dois níveis) composto por quatro pontos centrais (0), em um total de 12 experimentos (Tabela 2), todos realizados em triplicata obtendo, dessa forma, gráficos de superfície de resposta. O planejamento foi realizado utilizando-se o *software Statistica 7.0*.

As variáveis independentes foram codificadas segundo as relações:

$$X_1 = \frac{P - 0,055}{0,045}$$

$$X_2 = \frac{EL - 0,5}{0,3}$$

$$X_3 = \frac{FC - 1,25}{0,25}$$

Sendo, P = concentração de peptona; EL = concentração de extrato de levedura; FC = concentração de fonte de carbono.

**Tabela 2** - Planejamento fatorial  $2^3$ , com variáveis independentes codificadas.

Nº Experimentos	EL	P	FC
1	-	-	-
2	-	-	+
3	-	+	-
4	-	+	+
5	+	-	-
6	+	-	+
7	+	+	-
8	+	+	+
9	0	0	0
10	0	0	0
11	0	0	0
12	0	0	0

A fermentação foi incubada a 30°C e 100 rpm por 72 horas. As amostras do extrato bruto extracelular foram usadas para ensaios enzimáticos conforme descrito anteriormente, no item 3.8.1. A equação para o design experimental foi desenvolvida apenas com os fatores com significância maior que 5% ( $p < 0,05$ ).

Os níveis utilizados para a codificação das variáveis independentes encontram-se na Tabela 3.

**Tabela 3** - Valores reais das variáveis independentes codificadas.

	$X_i$		
	-1	0	1
P (g)	0,01	0,055	0,1
EL (g)	0,2	0,5	0,8
FC (g)	1,0	1,25	1,5

### 3.10.6 Efeito do tempo de cultivo de *A. japonicus* na produção enzimática

A variação do tempo de cultivo para a FES ocorreu durante 10 dias utilizando as condições padronizadas anteriormente, sendo que, a cada 24 horas as culturas eram retiradas para dosagem das atividades das enzimas. Para a FSm foi verificado o aumento da produção enzimática em duas condições utilizando as padronizações de cultivo determinadas nos experimentos anteriores: sob agitação, durante 6 dias e em condições estáticas, durante 10 dias, sendo retiradas as culturas a cada 24 horas para dosagem.

### 3.10.7 Concentração do número de conídios

A fim de verificar qual seria a melhor quantidade de conídios presente no inóculo para o crescimento fúngico em ambos os tipos de fermentação, cultivou-se o fungo com as seguintes concentrações:  $10^3$ ,  $5 \times 10^5$ ,  $3 \times 10^7$ ,  $5 \times 10^9$  conídios/mL, de inóculo devidamente contados em Câmara de Neubauer, obtidas inicialmente de uma concentração de  $5 \times 10^9$  de conídios, da qual foram feitas diluições sucessivas até obterem-se as concentrações desejadas. O microrganismo foi cultivado nas condições

determinadas anteriormente para cada tipo de fermentação, filtrado e dosadas as atividades de xilanase e CMCases.

### **3.10.8 Efeito do pH na produção enzimática**

O pH inicial do meio de cultivo foi verificado a fim de se determinar o pH adequado para a melhor produção enzimática. Assim, para FSm, em Erlenmeyers de 125 mL foram colocados 25 mL de meio de cultivo SR padronizado e o pH inicial foi modificado variando-o de 3,0 a 8,0 em pHmetro. As culturas foram incubadas a 30°C em condições estáticas. Para FES o pH foi variado de 4,0 a 8,0, ajustando-se a solução salina adicionada. As culturas foram incubadas a 30°C com 70% de umidade relativa.

### **3.10.9 Influência do Tween 80 na produção enzimática**

De forma a verificar se a presença do surfactante Tween 80 aumentava a atividade enzimática em FSm, variou-se diferentes concentrações deste entre 0 a 1%, utilizando-se o meio SR previamente padronizado. As culturas foram incubadas a 30°C sob condições estáticas.

## **3.11 Caracterização bioquímica dos extratos brutos obtidos**

Para a caracterização bioquímica foram avaliados alguns parâmetros dos extratos brutos produzidos por *Aspergillus japonicus* como pH e temperatura ótimos de reação, estabilidade a temperatura e pH e interferência de íons.

### **3.11.1 Efeito da temperatura na atividade enzimática**

A temperatura ótima de ensaio enzimático foi realizada através da dosagem de açúcares redutores segundo método de DNS, variando de 30 a 80°C.

### **3.11.2 Efeito da temperatura sobre a estabilidade enzimática**

Os extratos brutos obtidos foram incubados em diferentes temperaturas variando de 30 a 70°C em diferentes tempos durante 1 hora e 24 horas de incubação. Manteve-se a enzima solúvel, livre de substrato e em banho termostático, nas temperaturas e tempos pré-determinados para o processamento da reação. Após o período de incubação, as mesmas foram colocadas em banho de gelo e, em seguida, efetuou-se a dosagem enzimática.

### **3.11.3 Efeito do pH na atividade enzimática**

A influência do pH na atividade enzimática foi verificada solubilizando o substrato (xilana Birchwood ou CM-celulose) em tampão McIlvaine, composto por ácido cítrico 0,1M e Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,2M, e em tampões de fosfato de sódio, Tris-HCl e glicina em diferentes pHs, variado de 3,0 a 10,0. Posteriormente realizou-se a dosagem enzimática na temperatura ótima previamente encontrada de acordo com o método de açúcares redutores.

### **3.11.4 Efeito do pH sobre a estabilidade enzimática**

A estabilidade enzimática foi analisada em diferentes pHs a 4°C, incubando-se a enzima em tampão citrato-fosfato 100 mM (McIlvane), ajustado em cada valor de pH de 3,0 a 8,0, durante 2 e 24 horas de incubação. Em seguida, retirou-se 250 µL da amostra e acrescentou-se 250 µL de xilana Birchwood ou CM-celulose para dosagem enzimática à 55 e 60°C para xilanase e CMCases, respectivamente.

### **3.11.5 Influência de compostos iônicos na atividade enzimática**

Com o intuito de avaliar quais compostos iônicos influenciavam na atividade, foram testados diferentes íons metálicos: Zn(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> . 6H<sub>2</sub>O; NaCl, NH<sub>4</sub>Cl, BaCl<sub>2</sub>, MnCl<sub>2</sub> . 4H<sub>2</sub>O, CoCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub> . 6 H<sub>2</sub>O, AlCl<sub>3</sub> . 6H<sub>2</sub>O, CuSO<sub>4</sub> . 5H<sub>2</sub>O, CaCl<sub>2</sub>, HgCl<sub>2</sub>, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> . H<sub>2</sub>O, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, NaBr, KCl e β-mercaptoetanol. Inicialmente as enzimas foram dialisadas

contra EDTA e água destilada e, em seguida, determinada a atividade enzimática na presença dos íons a 5 mM. Nesse experimento, a amostra controle foi aquela dosada na ausência dos compostos testados.

### **3.11.6 Variação do substrato xilanolítico**

Neste experimento foram variados substratos xilanolíticos utilizados na reação enzimática. Os substratos testados foram: xilana Birchwood em tampão McIlvaine e em tampão acetato, xilana Larchwood, xilana Oat Spelt, xilana Beechwood e xilana de eucalipto. A reação se procedeu como descrito no item 3.8.1.

### **3.11.7 Efeito do tempo de armazenamento dos extratos enzimáticos**

As soluções enzimáticas obtidas nos cultivos de *A. japonicus* em FES foram congeladas em freezer a - 4°C. Ao longo de 1, 3 e 6 meses foram dosadas as atividades (de acordo com o descrito em 3.8.1) de CMCase e xilanase presentes nestes mesmos extratos e, como controle, foi utilizada a atividade enzimática obtida logo após a extração dos extratos brutos.

## **3.12 Estudos do potencial biotecnológico das enzimas na digestibilidade de ruminantes**

### **3.12.1 Citotoxicidade**

Para que um produto de origem fúngica seja de fato aplicado na indústria de ração é necessário que este não cause nenhum tipo de dano ao animal que vai ingeri-lo, nem tampouco ao ser humano (consumidor final). Assim, para inicializar os estudos biotecnológicos e complementar ainda mais este estudo sobre aplicação das enzimas produzidas por *Aspergillus japonicus*, determinou-se o potencial citotóxico do extrato bruto.

Os estudos de citotoxicidade foram realizados tratando-se linhagens de células de CHO (chinese hamster ovary) com os extratos brutos produzidos por *A. japonicus*, contendo as enzimas em estudo para aplicação em ruminantes. A etapa do trabalho foi realizada em colaboração com a Prof<sup>a</sup>. Dra. Elza Tiemy Sakamoto Hojo e a mestranda Giovana da Silva Leandro no Laboratório de Citogenética e Mutagênese da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

Para a realização deste experimento  $\pm 10^6$  células/frasco foram semeadas e tratadas com o extrato bruto durante 1 e 24 horas. Após o tratamento, as células tratadas foram lavadas com solução salina de Hanks e desprendidas por tripsinização, sendo transferidas para um microtubo, num volume de 1 a 2 mL de meio de cultura, para posterior contagem. As células foram contadas em Câmara de Neubauer e, para o ensaio, 300 dessas células foram semeadas em frasco de cultivo (25 cm<sup>2</sup>), sendo estes realizados em triplicata. Como controles positivos foram semeadas células que não passaram pelo tratamento com o extrato fúngico. As células CHO foram incubadas por 7 dias, sendo os frascos observados diariamente com o auxílio de um microscópio de luz com objetiva invertida.

Decorrido o período de cultivo, realizou-se a contagem das colônias. Para a realização das contagens, todas as soluções utilizadas (água destilada, PBS<sup>2</sup> e tampão fosfato monobásico de sódio 0,005%) foram previamente aquecidas a 37°C. O meio de cultura foi desprezado e as células lavadas com 5 mL de tampão PBS que, posteriormente, foi descartado. As colônias foram coradas com 5 mL de corante Giemsa diluído em tampão fosfato (1:20 v/v), respectivamente, durante 30 minutos. Após a coloração os frascos foram lavados com água para a retirada do excesso de corante. Foram consideradas na contagem aquelas colônias com mais de 50 células (aumento 16X).

---

<sup>2</sup> Composição tampão PBS: 0,20 g de diidrogênio fosfato de potássio anidro, 1,20 g de hidrogênio fosfato de sódio anidro, 8,0 g de cloreto de sódio, 0,20 g de cloreto de potássio, água deionizada q.s.p. 1 L.

Para o cálculo de determinação das frações de sobrevivência (FS), considerou-se 100% o número de colônias contadas no grupo controle (+). Portanto:

$$FS = (\text{n}^\circ \text{ de colônias contadas em cada tratamento} / \text{n}^\circ \text{ de colônias observadas no controle (+)}) \times 100.$$

### **3.12.2 Hidrólise enzimática de diferentes espécies de capim colhidos através de pastejo simulado**

A capacidade dos extratos enzimáticos de hidrolisar forrageiras que servem de alimento para animais mantidos em pastagens foi avaliada. Foi utilizado um *mix* de solução enzimática bruta de CMCase e xilanase, ambas obtidas por FES como previamente padronizado.

Para a hidrólise enzimática foram coletadas diferentes espécies de capins utilizadas na alimentação bovina e caprina na FCAV – UNESP em Jaboticabal, de maneira a simular o pastejo destes ruminantes. Os capins testados foram: Tifton-85 (*Cynodon sp.*), *Brachiaria brizantha*, *Brachiaria decumbens* e Tanzânia (*Panicum maximum* cv Tanzânia). Após a coleta, os capins foram lavados em água corrente, cortados em pequenos pedaços (0,5 x 1,0 cm), simulando a mastigação e, em seguida, dialisados contra água destilada por cerca de 6 horas para minimizar a quantidade de açúcares redutores na amostra.

O *mix* de extrato enzimático utilizado também foi previamente dialisado contra água destilada “overnigh” e dosada a atividade enzimática. Para a hidrólise, foram utilizados diferentes volumes deste extrato sendo devidamente diluídos em tampão fosfato pH 7,0 para obtenção de um volume total de 8 mL. A concentração enzimática nessas soluções foram enumerados de 1, 2 e 3 contendo em cada uma 15, 10 e 5 U/mL de atividade de xilanase e 0,53, 0,32 e 0,19 U/mL de atividade de CMCase, respectivamente. Posteriormente, foi adicionado a cada Erlenmeyer de 50 mL, 0,2 g

de capim, 8 mL da solução enzimática e colocados em estufa a 40°C com leve agitação durante 4 horas, sendo que a cada 1h eram retiradas alíquotas para medir a quantidade de açúcares redutores liberado segundo método de DNS, obtidos em µM/g de capim utilizado. Para controle foi utilizado o tempo zero em cada experimento e também o capim em solução tampão.

### **3.12.3 Análise bromatológica dos capins**

A determinação da proteína bruta (PB) e nitrogênio total (N) foram realizados de acordo com A.O.A.C., Association of Official Analytical Chemists (1999), a matéria mineral (MM) segundo descrito por Silva (1990), enquanto que a determinação de fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente ácido (FDA) e lignina (LIG), foi realizada através do método seqüencial segundo Van Soest (1994).

### **3.12.4 Efeito da hidrólise enzimática no capim seco e processado**

Para estas análises foram utilizados silagem de milho (*Zea mays* L.) e ainda as mesmas variedades de capim utilizadas no item 3.12.2. Estas amostras de capim foram previamente secas, para retirada parcial da água sem prejudicar a composição da fibra, em estufa a 65°C, trituradas (1 mm) e utilizadas como substrato enzimático. Foram pesados 0,05 g de cada amostra e a concentração de extrato bruto foi variada em torno de 5, 10, 15 e 20 U/mL de xilanase e 0,3; 0,64; 0,92 e 1,18 U/mL de CMCase devidamente diluídos em tampão McIlvaine pH 4,0. A reação se deu a 60°C para xilanase durante 10 minutos e a 55°C para a CMCase durante 15 minutos pelo método de açúcar redutor descrito em 3.8.1. O branco das amostras consistiu em 0,05 g de capim e tampão incubado nas mesmas condições de reação.

Posteriormente, com o intuito de avaliar o perfil de degradação enzimática destas amostras, foi realizada uma hidrólise das mesmas durante 150 min de reação utilizando a melhor concentração enzimática testada anteriormente.

### **3.12.5 Aplicação das enzimas fibrolíticas em ruminantes**

Para avaliar o efeito do “pool” enzimático na digestibilidade de alimentos em ruminantes, foram realizados três testes, sendo o primeiro uma avaliação dos efeitos da concentração do preparado de extrato bruto na digestibilidade *in vitro* dos alimentos; o segundo correspondeu a uma segunda digestibilidade *in vitro*, porém, avaliando-se a quantidade de gás liberada durante o experimento; enquanto que no terceiro teste foi realizada uma avaliação do comportamento da enzima no fluido ruminal em laboratório após a coleta do fluido e em ambiente ruminal de caprinos, adicionando diretamente o extrato no rúmen.

#### **3.12.5.1 Avaliação da digestibilidade *in vitro* de diferentes volumosos na presença de enzimas fibrolíticas**

Para a avaliação da melhor concentração de enzima, empregou-se o método da digestibilidade *in vitro* que simula a digestão dos nutrientes em ruminantes. As quantidades de extrato bruto inoculados foram: 4, 8 e 16 mL e um controle sem adição de enzima. Foram utilizados quatro tipos de alimentos: feno de Tifton-85 (*Cynodon* sp.), cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.), capim brachiaria (*B. decumbens*) e silagem de milho (*Zea mays* L.). Este procedimento foi realizado em duas etapas segundo metodologia descrita por Tilley e Terry (1963).

Primeiramente, há uma fermentação anaeróbia (introduziu-se CO<sub>2</sub> para manter o meio de fermentação anaeróbio) onde se adicionaram 5 mL de líquido ruminal, as diferentes quantidades de enzima testadas, 40 mL de solução tampão (saliva artificial McDougall <sup>3</sup>) e 0,5 g dos volumosos analisados, mantidos a 39°C, pH 6,9 por 48 horas. Frequentemente, no período de 48 horas desta primeira fase de digestão, as unidades eram agitadas lentamente. Posteriormente, na segunda etapa do experimento,

---

<sup>3</sup> A solução tampão de McDougall foi preparada em um litro de água destilada contendo 9,8 g de NaHCO<sub>3</sub>, 7g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> . 7 H<sub>2</sub>O, 0,57 g de KCl, 0,47 g de NaCl, 0,12 g de MgSO<sub>4</sub> . 7 H<sub>2</sub>O, 0,04 g de CaCl<sub>2</sub> e 0,2 a 0,8 g de uréia.

promoveu-se a digestão ácida adicionando 2 mL de HCl 40% e 5 mL de solução aquosa de pepsina a 4,0% (atividade 1:10.000) por 24 horas em BOD a 39°C, simulando a digestão ácida que ocorre no estômago verdadeiro do ruminante. A quantidade de matéria seca ou matéria orgânica dos alimentos foi medida inicialmente, possibilitando a determinação da quantidade de forragem que desapareceu após os dois estágios, que foi considerada com tendo sido digerida. Depois de realizadas as duas etapas, o resíduo da digestão foi filtrado a vácuo e lavado com água destilada em cadinhos de *Gooch*.

O líquido ruminal utilizado nas análises foi obtido de um bovino da raça Nelore, macho, cirurgicamente fistulado no rúmen. Assim que se procedeu a coleta, este líquido foi transportado para o laboratório em garrafa térmica e filtrado em quatro camadas de gaze, sendo a fração obtida por esta filtração usada para os experimentos de digestibilidade.

As análises estatísticas foram realizadas através do *software* SAS (2002) em colaboração com o Prof. Dr. Daniel Rume Casagrande da Universidade Federal do Amazonas – ICSEZ (Instituto de Ciências Sociais, Educação e Zootecnia).

### **3.12.5.2 Avaliação da atividade enzimática na degradação *in vitro* através da produção de gás**

Os volumosos analisados corresponderam a amostras de capim *Brachiaria*, cana-de-açúcar e feno de Tifton-85, empregando a técnica de produção de gás descrita por Theodorou et al. (1994).

Os tratamentos foram avaliados em duas concentrações diferentes de enzima: 4 e 8 mL, adicionados no momento da incubação, sendo o controle ausente de extrato.

Para o processo de incubação e determinação da produção de gás foram utilizados frascos de vidros com capacidade de 115 mL, contendo 30 mL de solução de incubação com 30 mL de fluido ruminal tamponado, 0,2 g de amostra e 0, 4 ou 8

mL de extrato enzimático. Os experimentos foram realizados em quadruplicata e as amostras de líquido ruminal foram retiradas de bovinos canulados.

Foi preparada a solução de incubação como descrito por Menke e Steingass (1988), adicionada de líquido ruminal sendo realizada manualmente em cada frasco mediante utilização de seringa graduada. Os frascos com a solução foram vedados com rolhas de borracha (14 mm), lacrados com lacre de alumínio e mantidos em banho termostático a 39°C. O período de incubação foi de 72 horas. As medidas de pressão de gás foram feitas em 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 26, 28, 30, 32, 36, 48, 52, 56, 60 e 72 horas por meio de leituras de pressão (Figura 12).

Os resultados foram corrigidos para o branco (garrafa contendo fluido ruminal tamponado, sem a presença de amostra) e para o padrão (feno de Tifton-85), às 24 e 48 horas de incubação e, juntamente com os níveis dos componentes químicos do alimento (cinzas, proteína e extrato etéreo), foram utilizados para predizer o valor energético e a digestibilidade *in vitro* da matéria orgânica das amostras incubadas. A transformação dos dados das leituras de pressão ( $\psi$ ) para volume (mL) foi feita através da equação descrita abaixo, obtida com leituras de pressão de diferentes quantidades conhecidas de volume de gás nas garrafas (MOTA et al., 2005), mantendo as mesmas condições de temperatura da incubação.

Equação da transformação das leituras de pressão:  $Y = 5,9829X - 0,3635$ ,

em que, Y é o volume de gás (mL) e X é a pressão ( $\psi$ ).

A digestibilidade *in vitro* da matéria orgânica (DIVMO) e nutrientes digestíveis totais (NDT) foram calculadas utilizando as equações preconizadas por Menke e Steingass (1988) sendo o NDT função da energia metabolizável (EM):

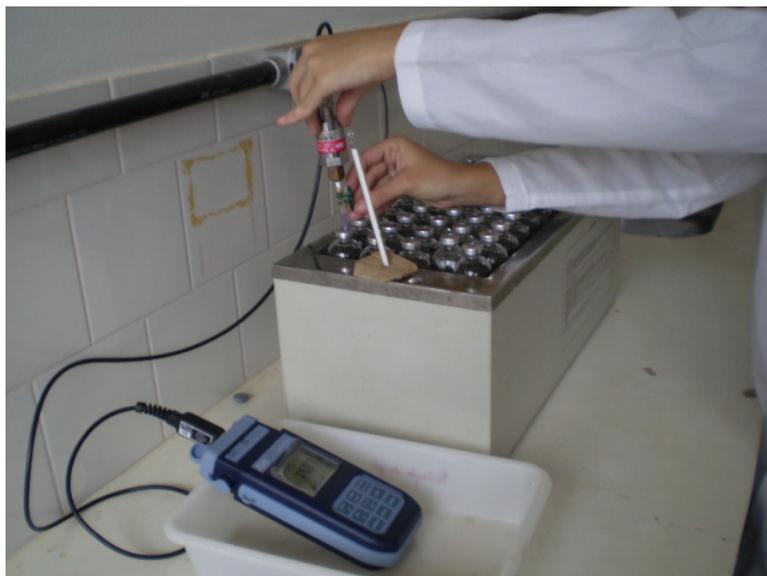
$$EM: (\text{MJ/kg MS}) = 2,20 + (0,136 * \text{gás}_{24}) + (0,0057 * \text{PB}) + (0,00029 * \text{EE})$$

$$\text{NDT: (\%)} = [\text{EM}/4.184 * 0.82 * 4,409] * 100$$

$$\text{DIVMO: (\%)} = [14,88 + (0,889 * \text{gás}_{24}) + (0,045 * \text{PB}) + (0,065 * \text{MM})] * 100$$

Em que, gás 24 é a produção de gás *in vitro* em 24 horas de incubação (ml/0,2g MS) e os valores de proteína bruta (PB), extrato etéreo (EE) e matéria mineral (MM) são expressos em g/kg de MS.

Os resultados obtidos foram analisados através do *software* SAS (2002) por meio do teste de Tukey em colaboração com o Prof. Dr. Daniel Casagrande.



**Figura 12** – Pressão de gás sendo registrada em frascos experimentais vedados, lacrados e incubados a 39°C com solução de incubação. Fotografia: F.D.A.Facchini.

### **3.12.5.3 Avaliação da atividade da xilanase e CMCase no fluido ruminal**

No rúmen há um fluxo constante de matéria, com intensa taxa de renovação. Dessa forma, foi necessário verificar se a atividade xilanásica e CMCásica persistia a essas condições “adversas” dentro do rúmen do animal e, portanto, foi muito importante determinar se a xilanase e CMCase mantinham (ou não) suas atividades *in vivo*.

Dessa forma, o fluido ruminal foi coletado de cabra da raça Saanen, fêmea, fistulada no rúmen e com dieta a base de feno de milho, em seguida filtrado e levado para o laboratório. Para os testes de avaliação da atividade enzimática no fluido em bancada, 1 mL do extrato enzimático de *A. japonicus* foi adicionado a 1 mL do líquido

ruminal e incubados em banho termostático a 40°C. A atividade enzimática foi dosada como descrito em 3.8.1.

Testes *in vivo* também foram realizados utilizando quatro cabras, nas mesmas condições utilizadas no teste em bancada, (Figura 13 A). Adicionou-se diretamente no rúmen dos animais 15 mL de extrato enzimático contendo atividade xilanásica de 19,2 U/mL e atividade CMCásica de 0,55 U/mL.

Neste experimento foram colhidas amostras de líquido ruminal (Figura 13 B), de hora em hora, no período de 6 horas, para observação dos níveis de atividade enzimática presentes no fluido ruminal e verificar a estabilidade das enzimas no ambiente ruminal.



(A)

(B)

**Figura 13 - (A)** Cabras da raça Saanen, fêmeas, fistuladas no rúmen e com dieta a base de feno de milho; **(B)** Coleta do fluido ruminal. Fotografia: F.D.A.Facchini.



## *4. RESULTADOS*

*Parte I: Prospecção, isolamento e  
seleção de fungos filamentosos*

## **4.1 Prospecção de fungos filamentosos**

### **4.1.1 Coleta e seleção dos microrganismos**

Foram coletadas 17 amostras em diversas áreas de pastagens (6 frascos em Ubarana, 6 em Água Vermelha e 5 em Jaboticabal) de diferentes fontes: estrume de bovinos, solo, silagem, capim, etc. (Figura 14 A, B e C). As amostras foram levadas ao laboratório para que os microrganismos presentes nestes materiais pudessem ser cultivados. Conforme descrito em Material e Métodos o isolamento foi realizado em duas temperaturas diferentes (30 e 40°C) com o objetivo de selecionar também fungos termofílicos e/ou termotolerantes. Porém a maioria apresentou melhor crescimento a 30°C e aqueles crescidos a 40°C eram muito semelhantes entre si. No total, foram isolados 27 fungos (Tabela 4 e Figura 15).

Após o isolamento, todos os fungos isolados foram incubados nas duas temperaturas 30 e 40°C para verificar seu crescimento e, posteriormente foram colocados na presença de luz para notar alguma mudança de cor do micélio, devido a pigmentação dos esporos. Notou-se apenas pequeno escurecimento na cor dos esporos de algumas cepas. Em relação à temperatura, todos os fungos cresceram a 30°C e apenas oito não se desenvolveram a 40°C (Tabela 5).



(A)

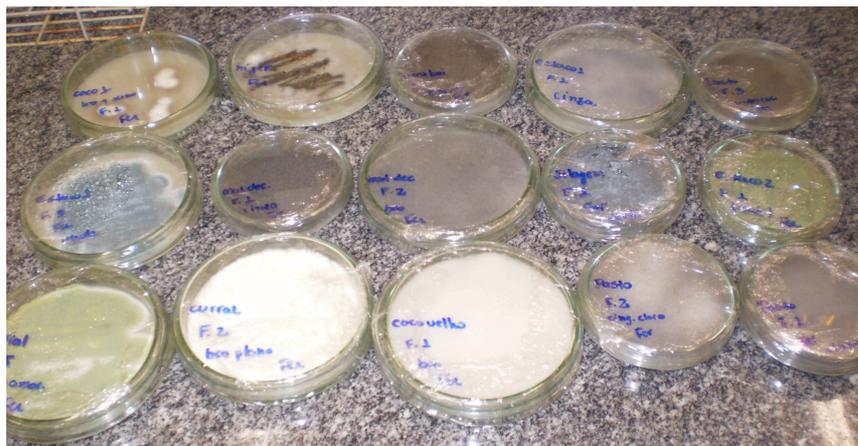


(B)



(C)

**Figura 14** - Amostras coletadas em diferentes localidades. Amostras coletadas em: (A) Água Vermelha (B) Ubarana (C) Jaboticabal. Fotografia: F.D.A.Facchini.



**Figura 15** - Exemplos de fungos isolados em placas de Petri em meio de aveia. Fotografia: F.D.A.Facchini.

**Tabela 4** – Fungos filamentosos isolados de coletas em diferentes áreas de pastagens.

Localização	Fungos isolados a 30°C	Fungos isolados a 40°C
Água Vermelha	Esterco 1 F.1	Esterco 1 F.2
	Esterco 1 F.3	
	Esterco 2 F.1	
	Esterco 2 F.2	
	1.6 CBoi	
	1.7 Silagem	
	Pasto F.1	
	Pasto F.2	
	Pasto F.3	
	Matdec F.1	
Matdec F.2		
Ubarana	2.1 Curral	2.4 Curral
	2.2 Curral	
	2.3 Curral	
	2.5 CCB	
	2.6 laranja	
	2.7 Branco	
FCAV-UNESP	3.4 Milho	3.1 Cana
	3.5 BraqH 1	3.2 Cana
	3.6 BraqSeco	3.3 Milho
	3.8 TifH	3.7 BraqH 2

**Tabela 5** - Características dos fungos isolados quanto ao crescimento em relação à temperatura.

Local	Cepas	Crescimento em relação à temperatura*	
		30°C	40°C
Água Vermelha	Esterco 1 F.1	+	+
	Esterco 1 F.2	+++	+++
	Esterco 1 F.3	++	++
	Esterco 2 F.1	+++	-
	Esterco 2 F.2	++	++
	1.6 CBoi	+++	-
	1.7 Silagem	++	-
	Pasto F.1	+++	+++
	Pasto F.2	+++	+++
	Pasto F.3	+	-
	Matdec F.1	++	+
	Matdec F.2	+++	+++
Ubarana	2.1 Curral	+++	+++
	2.2 Curral	++	-
	2.3 Curral	+++	++
	2.4 Curral	+++	+++
	2.5 CCB	++	++
	2.6 laranja	+++	-
	2.7 Branco	+++	-
FCAV-UNESP	3.1 Cana	++	+++
	3.2 Cana	++	+++
	3.3 Milho	+++	+++
	3.4 Milho	++	++
	3.5 BraqH 1	+++	++
	3.7 BraqH 2	++	+++
	3.6 BraqSeco	+	-
	3.8 TifH	++	++

\* Observação visual: (-) não apresentou crescimento, (+) crescimento regular, (++) bom crescimento, (+++) ótimo crescimento em meio de Aveia.

#### 4.1.2 Screening de fungos filamentosos

A seleção de microrganismos que produzissem níveis de enzimas xilanolíticas e celulolíticas consideráveis constituiu-se em uma etapa importante deste trabalho. Para tanto, foram realizadas duas etapas de isolamento: a primeira consistiu na fermentação em estado sólido e dosagem enzimática das enzimas xilanolíticas e celulolíticas e, a segunda em fermentação submersa na qual se variou o meio de cultivo.

Dos 27 fungos isolados, foram selecionados 15 para o *screening* em FES (Tabela 6), pois estes apresentaram características morfológicas distintas quanto à cor dos esporos, produção de pigmentação extracelular e aspecto micelial.

Analisando a Tabela 6, observou-se que os fungos nomeados 2.4 Curral e 2.3 Curral proporcionaram maior produtividade de xilanases (37,2 e 36,0 U/mL, respectivamente), enquanto que o 2.1 Curral apresentou maior produção de endoglucanase (CMCase), com cerca de 2,12 U/mL. A produção de FPase para os fungos fermentados foi próxima de zero para a maioria, se destacando apenas 3.3 Milho e Pasto F.2 com atividade em torno de 0,9 U/mL. Atividade de avicelase não foi detectada.

Desse modo, foi considerada para seleção dos melhores produtores destas enzimas fibrolíticas, a produção de xilanase e de CMCase, as quais foram detectadas em 4 fungos: 2.1 Curral, 2.3 Curral, 2.4 Curral e 2.7 Branco, todas elas isoladas da zona rural do município de Ubarana, local onde apresentou maior diversidade de fungos. Em seguida, os espécimes foram identificados pela Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) como *Aspergillus terreus* Thom, *Aspergillus japonicus* Saito *Aspergillus flavus* Link e *Fusarium equiseti* (Corda) Sacc., respectivamente. O *Aspergillus flavus* por apresentar toxicidade conhecida (produção de aflatoxina) foi descartado.

**Tabela 6** - Dosagem das enzimas extracelulares e de proteínas produzida pelos fungos isolados.

<b>Cepa</b>	<b>Xilanase (U/mL)</b>	<b>CMCase (U/mL)</b>	<b>FPase (U/mL)</b>	<b>Proteínas (mg/mL)</b>	<b>Fermentação*</b>
Esterco 1 F.2	16,71	1,85	0,21	1,46	+
Esterco 1 F.3	20,07	1,83	0,15	1,48	+++
Esterco 2 F.2	13,35	1,52	0,33	3,13	+++
Pasto F.1	29,17	0,71	0,00	1,93	+
Pasto F.2	11,00	1,89	1,01	1,95	+
Matdec F.2	1,92	0,94	0,32	1,69	+++
2.1 Curral	34,46	2,13	0,68	1,77	+++
2.3 Curral	36,03	1,86	0,76	1,78	+++
2.4 Curral	37,17	1,59	0,82	1,10	+++
2.5 CCB	9,57	1,64	0,97	1,81	++
2.6 laranja	31,28	1,35	0,11	1,28	+++
2.7 Branco	32,89	0,70	0,00	2,67	++
3.2 Cana	13,92	0,97	0,00	2,25	++
3.3 Milho	10,32	1,86	1,03	1,36	+
3.7 BraqH 2	7,25	1,58	0,52	2,87	++

\* Observação visual: (+) crescimento razoável, (+ +) bom crescimento, (+ + +) ótimo crescimento. Microrganismos cultivados em FES (farelo de trigo) durante 72h, a 30°C, com 70% de umidade relativa.

Contudo, para selecionar o melhor produtor dentre os três selecionados, foi realizada uma fermentação submersa em diferentes meios líquidos: Vogel, Czapeck, SR, Adams e Khanna, como descrito em 3.5.1.

Foram utilizados como fonte de carbono CM-celulose e papel de filtro Whatman nº. 2 para a produção de CMCases, entretanto não foi detectada atividade significativa nos extratos obtidos (não houve bom crescimento dos fungos). Para xilanase, foi utilizada xilana Birchwood (Tabela 7).

**Tabela 7** - Produção de xilanase por FSm em diferentes meios de cultivo para os fungos selecionados.

<b>Microrganismo</b>	<b>Meio líquido</b>	<b>Proteínas (mg total)</b>	<b>Xilanase (U/mL)</b>
<i>A. japonicus</i>	Vogel	40,88	22,39
	Czapeck	7,28	5,49
	Khanna	4,95	28,13
	Adams	5,76	5,30
	SR	22,28	<b>29,05</b>
<i>A. terreus</i>	Vogel	52,03	11,15
	Czapeck	7,45	7,10
	Khanna	5,19	<b>26,10</b>
	Adams	9,87	4,60
	SR	20,34	24,03
<i>F. equideci</i>	Vogel	48,04	10,56
	Czapeck	6,94	0,00
	Khanna	8,11	2,90
	Adams	31,83	6,85
	SR	22,65	<b>16,62</b>

A fermentação foi realizada utilizando xilana Birchwood sob 100 rpm de agitação, a 30°C, durante 72 horas. Em negrito estão indicadas as melhores atividades em U/mL obtidas.

Os resultados da Tabela 7 indicaram que o *A. japonicus* e o *A. terreus* foram os melhores produtores de xilanase em meio líquido que o *F. equideci* sendo, portanto, o alvo de estudos posteriores.

Em vista do decorrido, o *A. japonicus* foi estabelecido como melhor produtor de xilanases, sendo o meio SR ideal para a produção enzimática. Este fungo foi também um dos melhores produtores de xilanase e celulase (CMCase) em fermentação sólida, além de não constar na literatura grande produção de toxinas por este (como consta para o *A. terreus*) nem de aplicações de suas enzimas em ração animal, como é o propósito deste estudo. Desse modo, o fungo filamentoso *Aspergillus japonicus* foi escolhido para dar continuidade aos trabalhos.

Seguiram-se os trabalhos de otimização das condições de cultivo do fungo selecionado nesta etapa do trabalho para aumentar a produção de xilanase e CMCase tanto em FES quanto em FSm, de modo que a produção destas enzimas seja maximizada para posterior aplicação em nutrição de ruminantes.

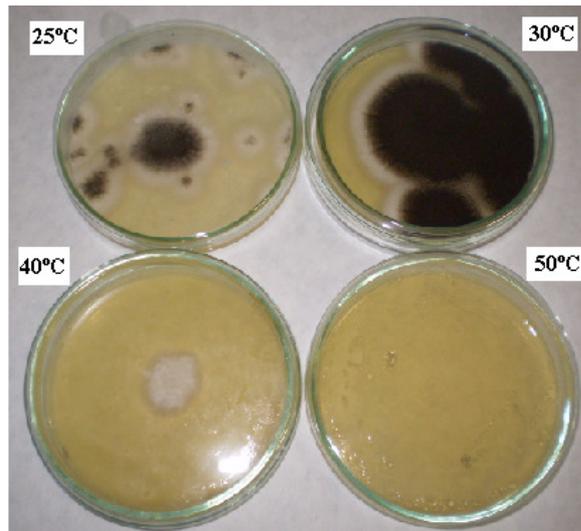
*Parte II: Otimização das  
condições de cultivo para  
produção de xilanases e CMCases  
em fermentação sólida e  
submersa*

#### 4.2 Efeito da temperatura no cultivo de *Aspergillus japonicus*

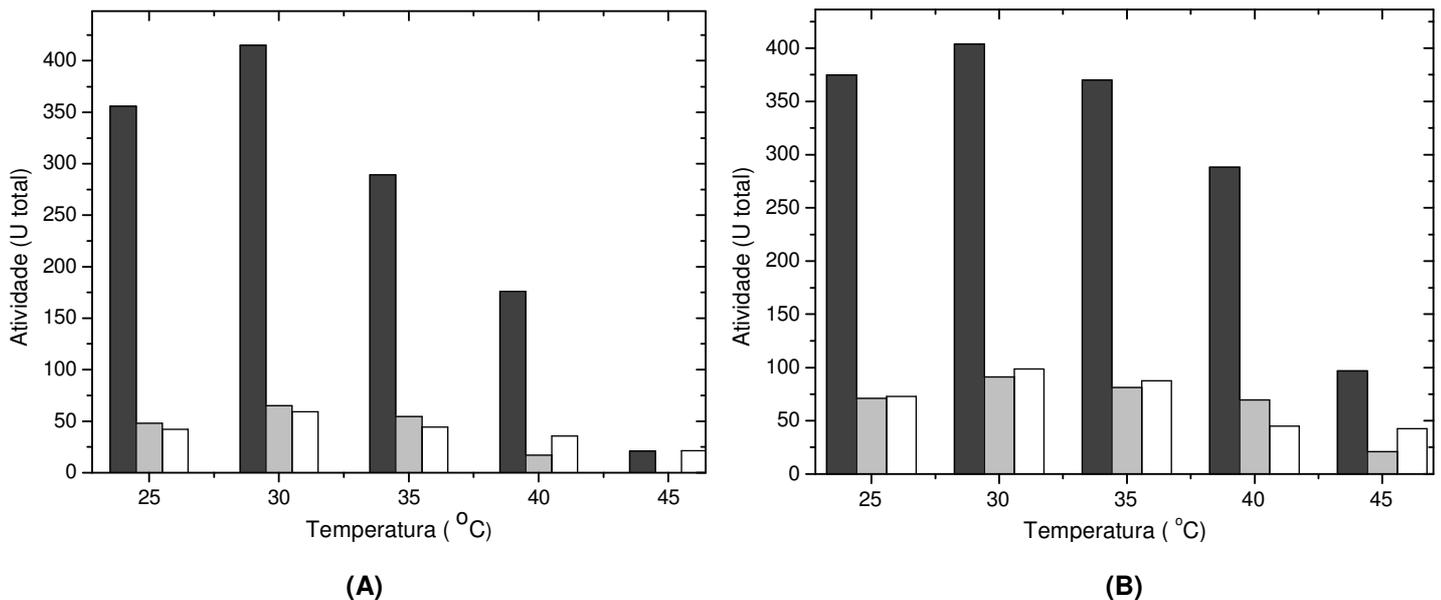
Com o objetivo de verificar qual a melhor temperatura de crescimento do *A. japonicus*, esta foi variada de 25°C a 50°C para o crescimento em placas com meio sólido PDA (potato dextrose ágar), durante 3 dias, e de 25°C a 45°C para a fermentação sólida (5 dias) e líquida (3 dias em agitação a 100 rpm) (Figuras 16 e 17).

Observa-se que na Figura 16, *A. japonicus* teve um ótimo crescimento a 30°C em relação às demais temperaturas, apresentando dificuldade de crescimento a partir de 40°C e nenhum a 50°C.

Quanto a produção enzimática, a melhor temperatura encontrada foi 30°C, apresentando atividade xilanolítica de 62,5% e 30% maior que a 40°C, para FES e FSm, respectivamente (Figuras 17 A e B). Da mesma forma, a produtividade celulásica obteve níveis mais elevados em FES a 30°C, concordando assim com o valor obtido para a xilanase. Foi verificado (visualmente e por meio do resultado encontrado para as proteínas totais) um melhor crescimento também a 30°C em ambas as fermentações sendo que, após esta temperatura, não foi observado bom desenvolvimento do fungo. A 45°C percebeu-se crescimento fúngico, porém não houve boa produção de enzimas em ambos os tipos de fermentação. Contudo, esta linhagem pode ser considerada mesofílica segundo COONEY e EMERSON (1964), sendo que suas enzimas extracelulares podem ser termotolerantes, o que será confirmado na etapa de caracterização.



**Figura 16** - Crescimento do *Aspergillus japonicus* em placas de Petri em meio de PDA em diferentes temperaturas. Fotografia: F.D.A.Facchini.



**Figura 17** – Representação gráfica em colunas da variação da temperatura de cultivo (A) em fermentação sólida utilizando farelo de trigo como substrato durante 5 dias (B) em fermentação submersa, em meio SR, durante 3 dias em agitação. Colunas: ■: xilanase; ■ : CMCase e □ : proteínas totais. As atividades de CMCases e de xilanase estão indicadas em U totais e a proteína em mg totais.

### 4.3 Padronização das condições de cultivo para produção enzimática em fermentação em estado sólido (FES)

#### 4.3.1 Avaliação de diferentes fontes de carbono

Com o objetivo de avaliar a influência da fonte de carbono sobre a produção das enzimas, foram realizadas dosagens enzimáticas nos extratos extracelulares provenientes de cultivos com diferentes fontes de carbono. A temperatura de incubação foi de 30°C conforme previamente definido para a produção das duas enzimas em questão. Dentre os resíduos agrícolas e gramíneas testados têm-se: farelo de trigo, farelo de soja, bagaço de cana, palha de milho, palha de arroz, sabugo de milho, milho moído, tifton-85 (capim fresco), *Brachiaria* sp. (gramíneas alta e baixa), serragem de eucalipto, casca de laranja e silagem de feno tanto para verificar a produção de xilanase quanto para a de CMCase. (Tabela 8).

**Tabela 8** – Seleção da melhor fonte de carbono para a produção de xilanase e CMCase extracelular em FES.

Substrato	Xilanase (U/g)	CMCase (U/g)	Proteína (mg total)
Bagaço de cana	101,77 ± 0,32	13,25 ± 0,03	9,68
Farelo de soja	224,62 ± 1,38	8,84 ± 0,02	77,57
Farelo de trigo	155,50 ± 0,30	19,38 ± 0,16	49,19
Tifton-85	147,05 ± 0,94	12,54 ± 0,10	11,88
Silagem de feno	96,92 ± 1,35	10,61 ± 0,15	15,27
<i>Brachiaria</i> sp. alta	87,44 ± 1,38	10,07 ± 0,05	26,20
<i>Brachiaria</i> sp. baixa	106,15 ± 0,73	11,13 ± 0,01	17,28
Milho moído	101,23 ± 0,89	7,74 ± 0,04	13,38
Sabugo de milho	112,82 ± 0,84	7,26 ± 0,04	14,83
Palha de arroz	92,31 ± 0,67	1,00 ± 0,02	1,65
Palha de milho	8,62 ± 0,01	1,02 ± 0,06	22,42
Casca de laranja	31,59 ± 0,17	2,23 ± 0,00	5,97
Serragem de eucalipto	26,51 ± 0,22	4,76 ± 0,23	38,33

Microrganismo cultivado a 30°C, por 5 dias com umidade relativa de 70%.

A Tabela 8 mostra a atividade de CMCases e xilanase produzidas por *A. japonicus* em U/g (U totais dividida pela quantidade de substrato sólido utilizado na FES). Observa-se uma maior produção de xilanases em farelo de soja, que chegou a ser aproximadamente 30% maior quando comparada com a segunda melhor fonte de carbono testada, o farelo de trigo. Porém, as celulases foram melhores secretadas em meio com farelo de trigo, seguido de bagaço de cana e Tifton-85.

Em todos os substratos testados, exceto em palha de arroz, o fungo apresentou bom crescimento, o que torna difícil de inferir apenas pela dosagem de proteínas totais, uma vez que as fontes de carbono utilizadas são ricas em proteínas e, estas acabam interferindo no método de dosagem. Contudo, pode-se observar que o *A. japonicus* apresentou excelente crescimento tanto em farelo de soja quanto em farelo de trigo, tanto por observação macroscópica quanto pela dosagem de proteínas totais. Já em relação ao substrato palha de arroz e casca de laranja o microrganismo em estudo apresentou um baixo crescimento.

Para aumentar a produção enzimática, foi verificado se a mistura entre as melhores fontes de carbono testadas anteriormente acarretaria em um aumento dos níveis de produção enzimática. Dessa forma, fez-se a mistura entre as fontes de carbono que apresentaram melhores resultados para cada uma das enzimas, sendo elas: farelo de soja (controle), farelo de trigo, bagaço de cana e sabugo de milho, para verificar a produção de xilanase, e farelo de trigo (controle), bagaço de cana e tifton-85 para a produção de CMCases, em diferentes proporções (1:3, 2:2, 3:1). Para este experimento, as culturas foram incubadas a 30°C, durante 5 dias, em estufa com umidade relativa de 70% (Tabelas 9 e 10).

**Tabela 9** - Efeito da mistura entre fontes de carbono na produção de xilanase.

Fonte de carbono	Proporção (g/g)	Xilanase (U/g)	Proteína (mg totais)
FS	Controle	372,00 ± 1,13	37,0
	(1:3)	299,65 ± 0,22	45,8
FS + FT	(2:2)	313,24 ± 2,24	50,3
	(3:1)	271,28 ± 0,34	54,4
FS + SM	(1:3)	403,77 ± 0,25	38,5
	(2:2)	234,00 ± 0,39	38,3
	(3:1)	260,71 ± 0,01	67,2
FS + BC	(1:3)	375,38 ± 0,59	62,5
	(2:2)	349,74 ± 1,03	50,0
	(3:1)	280,38 ± 0,37	38,0

FT: farelo de trigo; FS: farelo de soja; BC: bagaço de cana; SM: sabugo de milho. Microrganismo cultivado em estado sólido composto por fonte de carbono e água destilada. Incubação a 30°C durante 5 dias, U. R. 70%.

**Tabela 10** - Efeito da mistura entre fontes de carbono na produção de CMCases.

Fonte de carbono	Proporção (g/g)	CMCases (U/g)	Proteína (mg totais)
FT	Controle	24,29 ± 0,03	79,29
	(1:3)	23,21 ± 0,03	94,29
FT + BC	(2:2)	20,54 ± 0,05	69,29
	(3:1)	24,64 ± 0,13	90,71
FT + T	(1:3)	16,43 ± 0,07	53,57
	(2:2)	21,25 ± 0,05	43,57
	(3:1)	20,89 ± 0,02	48,57

FT: farelo de trigo; BC: bagaço de cana; T: tifton-85. Microrganismo cultivado em meio sólido composto por fonte de carbono e água destilada. Incubação a 30°C durante 5 dias, U. R. 70%.

Níveis enzimáticos maiores que o controle foram observados nas culturas compostas por farelo de soja e sabugo de milho nas proporções de 1:3 para as xilanases (Tabela 9), e farelo de trigo com bagaço de cana nas proporções de 3:1, para as CMCases (Tabela 10), sendo que nesta última, a diferença entre o controle e

a mistura não foi tão pronunciada, obtendo atividade com cerca de apenas 7% maior para a xilanase e 1% para a CMCases. Contudo, estas misturas foram padronizadas para os experimentos posteriores.

#### 4.3.2 Efeito de diferentes soluções salinas na produção enzimática

Nesse experimento, foram adicionados a 2 g de fonte de carbono, 1 mL de inóculo e 3 mL de diferentes soluções de sais e qualidade de água: SR, Vogel e Khanna (descritos em Material e Métodos) e água mili-Q, água destilada e água de torneira, a fim de aumentar a produtividade enzimática, utilizando a água destilada como controle. As culturas foram incubadas a 30°C, por 5 dias com 70% de umidade relativa. O resultado encontra-se na Tabela 11.

**Tabela 11**– Variação do tipo de solução na FES para produção enzimática.

Líquido	Xilanase (U/g)	CMCase (U/g)	Proteína (mg total)
Água destilada	313,92 ± 0,43	11,64 ± 0,01	41,56
Água de torneira	292,50 ± 1,72	6,59 ± 0,13	72,82
Água mili-Q	302,40 ± 0,32	13,13 ± 0,04	43,50
Sais Khanna	413,81 ± 4,45	14,48 ± 0,03	57,63
Sais Vogel	123,84 ± 1,99	13,63 ± 0,03	61,65
Sais SR	303,75 ± 3,63	14,75 ± 0,05	66,01

Microrganismo cultivado em estado sólido composto por farelo de soja e sabugo de milho e farelo de trigo e bagaço de cana, para xilanas e CMCase, respectivamente. Incubados a 30°C durante 5 dias, U. R. 70%.

O melhor resultado obtido foi ao utilizar sais Khanna para a xilanase e sais SR para a CMCases, obtendo um aumento na produção de 24% para xilanase e de 21% para a CMCases em relação ao controle (água destilada), assim foram utilizados para dar continuidade aos experimentos.

#### 4.3.3 Efeito da fonte de nitrogênio na produção enzimática

A fonte de nitrogênio assim como a de carbono influencia tanto no crescimento como na produção enzimática. Com a finalidade de determinar a melhor fonte de nitrogênio para a produção das enzimas, foi testada a suplementação do meio sólido com aqueles resíduos agroindustriais definidos anteriormente e com diferentes fontes orgânicas e inorgânicas de nitrogênio: sulfato de amônio, cloreto de amônio, carbonato de amônio, fosfato de amônio monobásico, acetato de amônio, nitrato de amônio, uréia, peptona e extrato de levedura. Aos 2 g de fonte de carbono foram acrescentados 3 mL de água destilada estéril com 0,25% de fonte de nitrogênio e mais 1 mL de solução de esporos de *A. japonicus*. As culturas foram incubadas a 30°C, em estufa com 70% de umidade por 5 dias. Para o controle foi utilizado apenas fonte de carbono e água destilada, sem adição de fonte de nitrogênio. A Tabela 12 demonstra o resultado obtido para as atividades em U/g de xilanase e CMCases e em mg totais de proteína, respectivamente.

**Tabela 12** – Efeito de compostos nitrogenados na produção enzimática em FES

Compostos nitrogenados	Xilanase		CMCase	
	U/g	mg proteína	U/g	mg proteína
Sulfato de amônio	218,08 ± 0,33	57,60	13,65 ± 0,42	27,71
Cloreto de amônio	219,23 ± 0,11	58,30	19,04 ± 0,05	28,30
Carbonato de amônio	156,92 ± 0,33	56,60	0,00	26,36
Fosfato de amônio monobásico	240,00 ± 0,76	55,10	12,50 ± 0,24	25,10
Acetato de amônio	244,62 ± 0,11	50,00	5,00 ± 0,11	40,13
Nitrato de amônio	217,50 ± 0,38	42,00	11,92 ± 0,18	31,99
Uréia	255,00 ± 0,22	70,70	16,35 ± 0,24	60,79
Peptona	255,58 ± 1,47	82,80	28,85 ± 0,22	72,88
Extrato de levedura	246,92 ± 1,31	77,50	24,42 ± 0,09	57,51
Controle	228,46 ± 0,11	70,30	22,31 ± 0,11	54,07

Microrganismo cultivado em estado sólido composto por farelo de soja e sabugo de milho e farelo de trigo e bagaço de cana, para xilanase e CMCases, respectivamente. Incubados a 30°C durante 5 dias, U. R. 70%.

Observou-se um aumento na atividade de xilanase nos meios com uréia, extrato de levedura, peptona, fosfato de amônio e acetato de amônio em relação ao controle. A quantidade de proteína total não teve grande variação, exceto para o extrato de levedura e peptona. Já para a CMCases, observa-se um aumento da atividade apenas para a peptona e extrato de levedura e, ainda, verifica-se um maior crescimento para as fontes orgânicas em relação ao controle. Com a adição de carbonato de amônio, não foi observada produção enzimática, talvez por alterar o pH do meio de 6,0 para 8,5 (verificado através de pHmetro antes e após o cultivo).

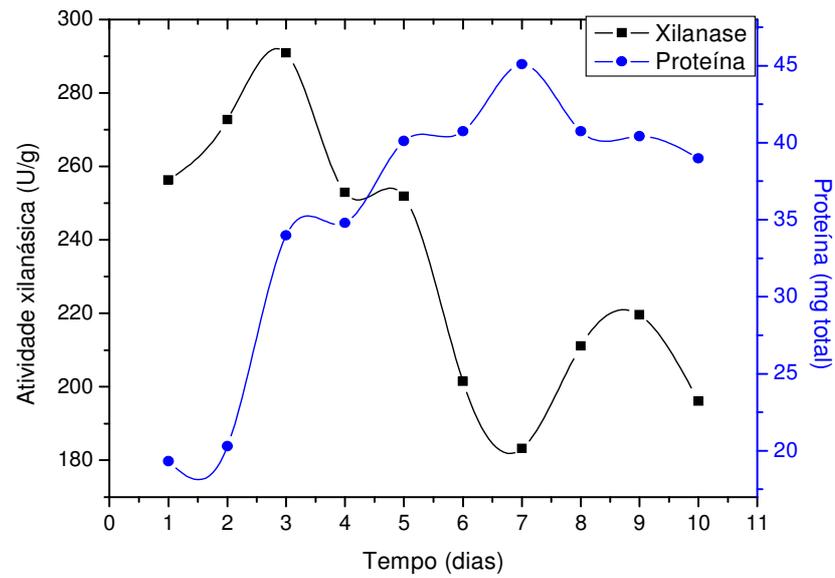
A peptona adicionada aos sais Khanna e SR no cultivo do fungo, aumentou em cerca de 5% a produção, sendo utilizada como adicional nos próximos experimentos.

#### **4.3.4 Determinação do tempo de cultivo**

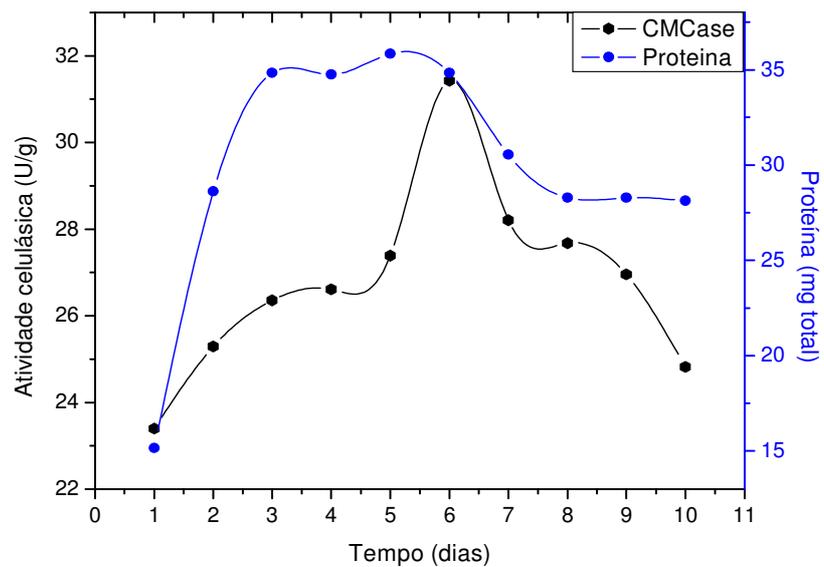
Os experimentos anteriores padronizaram os componentes do meio de cultivo em fermentação em estado sólido adequados à produção enzimática pelo fungo *Aspergillus japonicus* e, nesta etapa do trabalho, o objetivo foi verificar se o tempo de incubação do cultivo que vinha sendo utilizado (5 dias) era o mais apropriado.

Os meios foram incubados a 30°C, por um período de 2 a 10 dias, em estufa com umidade relativa ao redor de 70%, utilizando as fontes de carbono e nitrogênio previamente padronizadas, ou seja, para a xilanase foi utilizado farelo de soja e sabugo de milho (1:3 g/g) com sais Khanna adicionado de 0,25% de peptona; e para a CMCases foi utilizado farelo de trigo e bagaço de cana (3:1 g/g), com sais SR adicionado de 0,25% de peptona. O resultado está ilustrado nas Figuras 18 A e B.

Níveis significantes de produção foram maiores em 3 dias para as xilanases e 6 dias para as CMCases.



(A)



(B)

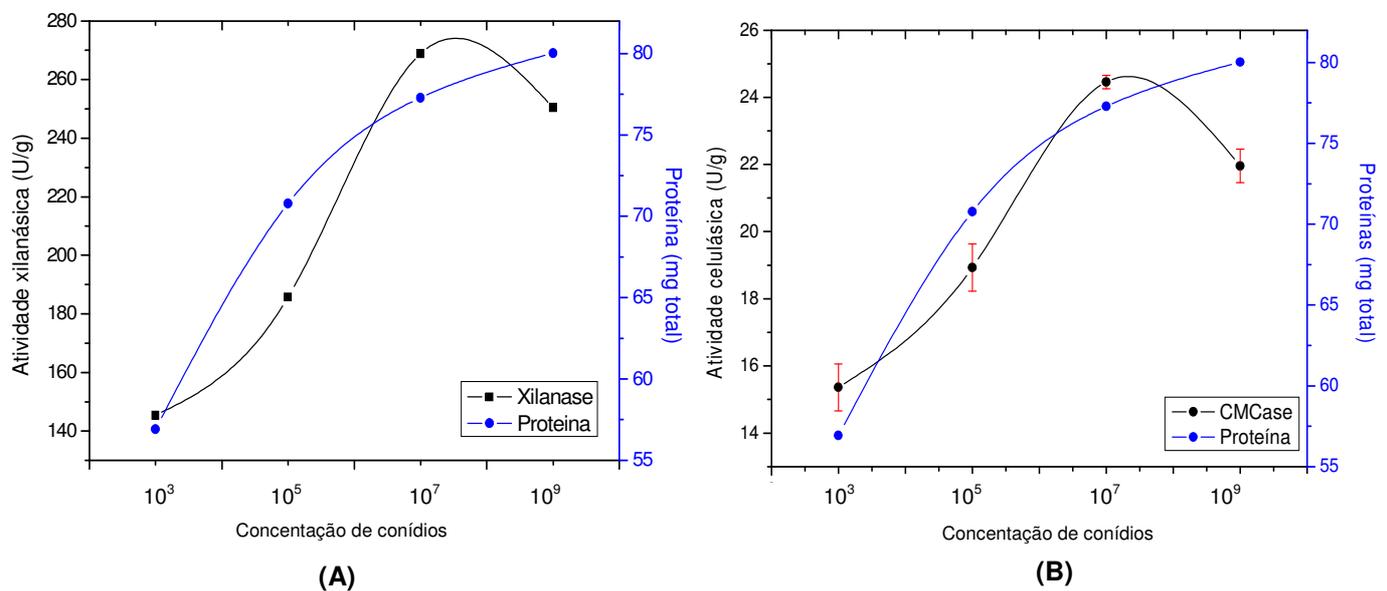
**Figura 18** - Efeito do tempo de cultivo para o fungo *A. japonicus* sobre a produção de (A) xilanase e (B) CMCases extracelulares e sobre seus respectivos crescimentos.

#### 4.3.5 Efeito da concentração de inóculo sobre a produção enzimática e sobre o crescimento de *A. japonicus*

A quantidade de inóculo também foi variada de forma a avaliar seu efeito na produção enzimática. Assim, foi acrescentado à cultura sólida 1 mL de inóculo,

variando a concentração de conídios de  $10^3$  a  $10^9$  conídios/mL. As culturas foram incubadas a  $30^\circ\text{C}$ , em estufa com umidade relativa de 70% durante o tempo previamente determinado para cada enzima. O resultado está ilustrado nas Figuras 19 A e B.

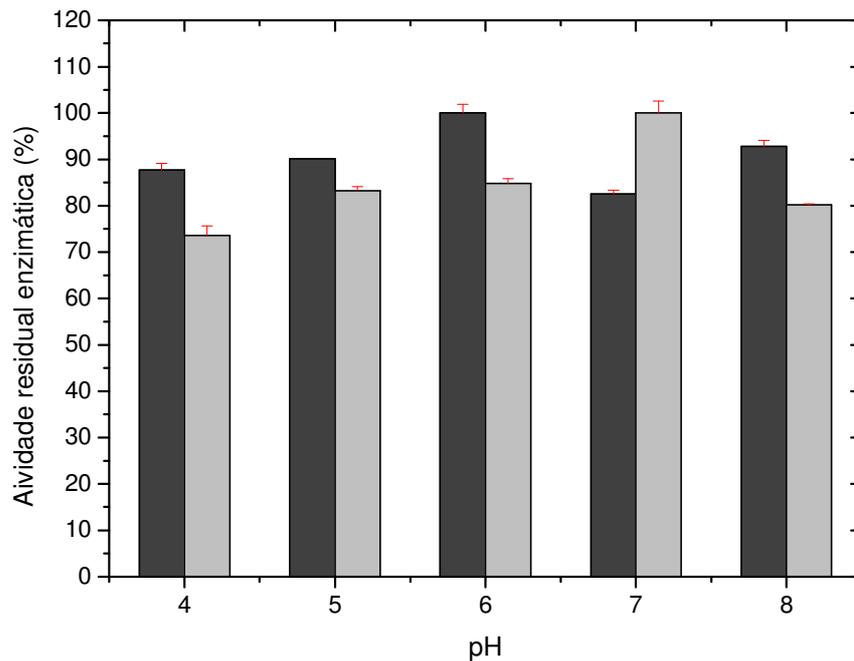
A concentração de  $10^7$  conídios/mL foi a melhor obtida dentre as analisadas. Foi verificada maior produção de ambas as enzimas conforme aumentou a concentração de conídios, semelhante ao observado para o crescimento medido através das proteínas totais.



**Figura 19** - Efeito da concentração de conídios obtidas em conídios/mL. Concentração referente à produção de **(A)** xilanase e **(B)** CMCase em U/g.

#### 4.3.6 Influência do pH inicial na produção enzimática em FES

Neste experimento verificou-se a influência do pH inicial na produção das enzimas alterando-se o pH da solução salina adicionada ao meio. De acordo com a Figura 20, podemos concluir que o melhor pH inicial para a produção de xilanase foi de 6,0 e para produção de CMCase foi de 7,0. O pH final do extrato enzimático obtido ficou em torno de 6,5 em todas as culturas.



**Figura 20** – Efeito do pH inicial na produção enzimática em FES de xilanase e CMCase por *A. japonicus*. Colunas: ■: xilanase e □: CMCase.

#### 4.4 Padronização das condições de cultivo para produção enzimática em fermentação submersa (FSm)

##### 4.4.1 Avaliação de diferentes fontes de carbono

Para avaliar a influência da fonte de carbono sobre a produção das enzimas foram realizadas dosagens enzimáticas nos extratos extracelulares provenientes de cultivos com diferentes fontes de carbono (as mesmas utilizadas na FES, incluindo glicose, xilana, farinha de aveia, algodão, papel filtro e fibra de trigo) em meio líquido SR com 1 mL de inóculo ( $3,0 \times 10^7$  conídios/ml). A temperatura de incubação foi de 30°C, sob 100 rpm de agitação, durante 3 dias.

Através da Tabela 13, observa-se uma maior produção de xilanases em farelo de soja e sabugo de milho (dentre os resíduos agrícolas) e em xilana Birchwood que obtiveram níveis de atividades cerca de 3 vezes maiores em relação à glicose. A

dosagem de proteínas mostrou maiores valores para serragem de eucalipto, farinha de aveia, xilana e glicose.

A produção das CMCases foi mais expressiva em farelo de trigo e sabugo de milho, as quais apresentaram valores cerca de 9 e 8 vezes maiores, respectivamente quando comparados à glicose e, estas foram acompanhadas pelo crescimento, obtendo valores de proteína também maiores para estes resíduos. O meio sem adição de fonte de carbono, como se esperava, não apresentou atividade enzimática, todavia pode-se observar crescimento fúngico devido aos nutrientes presentes no meio SR.

Da mesma forma que para a FES foram utilizadas misturas entre as melhores fontes de carbono testadas em FSm. Assim, para a padronização do meio de cultivo de xilanases foram utilizados farelo de soja, farelo de trigo, sabugo de milho e bagaço de cana e, para a CMCases, foram utilizados farelo de trigo, sabugo de milho, serragem de eucalipto e bagaço de cana.

Analisando a Tabela 14, observou-se que níveis enzimáticos maiores, na produção de xilanase, foram encontrados em culturas compostas por farelo de soja e sabugo de milho na proporção 1:3 e farelo de soja e bagaço de cana também na proporção 1:3, ambos sendo aproximadamente duas vezes maiores que o controle. E para as CMCases (Tabela 15), as misturas entre farelo de trigo e bagaço de cana e entre farelo de trigo e serragem de eucalipto, nas proporções de 3:1, foram 10,7 e 11% maiores que o controle, respectivamente.

Portanto, devido ao aumento notável nas produções enzimáticas, foram adotadas as seguintes misturas de fontes de carbono: farelo de soja com sabugo de milho (1:3 g/g) para produção de xilanase e, farelo de trigo com bagaço de cana (3:1 g/g) para de CMCase. Este resultado concorda com os dados obtidos para FES, nas quais foram utilizadas as mesmas misturas de fontes de carbono nas mesmas proporções.

**Tabela 13** - Seleção da melhor fonte de carbono para a produção de xilanase e CMCase extracelular em fermentação submersa.

<b>Resíduo</b>	<b>Xilanase (U total)</b>	<b>CMCase (U total)</b>	<b>Proteínas (mg total)</b>
Bagaço de cana	266,36 ± 4,191	13,00 ± 0,02	24,43
Farelo de soja	369,62 ± 3,536	9,41 ± 0,02	35,03
Farelo de trigo	185,77 ± 0,329	17,08 ± 0,02	36,55
Fibra de trigo	159,23 ± 0,111	9,20 ± 0,04	31,19
Tifton-85	163,69 ± 0,369	7,35 ± 0,02	14,43
Silagem de feno	263,08 ± 0,800	10,76 ± 0,03	32,55
<i>Brachiaria sp. alta</i>	254,87 ± 0,886	10,21 ± 0,02	11,71
<i>Brachiaria sp. baixa</i>	215,00 ± 1,024	7,54 ± 0,04	25,21
Sabugo de milho	364,31 ± 0,346	14,76 ± 0,04	15,33
Palha de arroz	123,54 ± 0,623	7,37 ± 0,04	21,93
Palha de milho	121,54 ± 1,910	6,34 ± 0,09	32,41
Serragem de eucalipto	122,05 ± 3,643	14,06 ± 0,01	62,81
Algodão	35,54 ± 0,295	1,57 ± 0,02	43,56
Papel filtro	242,05 ± 0,113	5,48 ± 0,02	44,84
Glicose	142,15 ± 0,114	1,77 ± 0,10	65,42
Xilana Birchwood	357,74 ± 0,911	-	68,62
CM-celulose	-	8,95 ± 0,05	20,59
Avicel	-	4,98 ± 0,03	17,49
CM-celulose + Papel filtro (1:1)	-	10,52 ± 0,03	17,22
Sem adição de fonte	0,00	0,00	12,76

(-) Não foi verificada produção enzimática.

Microrganismo cultivado em meio SR, incubados a 30°C durante 3 dias sob 100 rpm de agitação.

**Tabela 14** - Efeito da mistura entre fontes de carbono na produção de xilanase em fermentação submersa.

Mistura	Proporção (g/g)	Xilanase (U total)	Proteínas (mg total)
FS	Controle	232,9 ± 2,9	50,2
	(1:3)	383,9 ± 0,25	66,1
FS + FT	(2:2)	197,0 ± 0,36	58,1
	(3:1)	190,4 ± 0,77	39,4
FS + SM	(1:3)	457,7 ± 0,31	45,7
	(2:2)	174,3 ± 2,56	41,5
	(3:1)	251,1 ± 9,2	45,2
FS + BC	(1:3)	435,0 ± 1,66	60,6
	(2:2)	342,3 ± 1,54	55,9
	(3:1)	392,3 ± 7,40	54,7

FT: farelo de trigo; FS: farelo de soja; BC: bagaço de cana; SM: sabugo de milho. Incubação a 30°C durante 3 dias, sob 100 rpm de agitação.

**Tabela 15** - Efeito da mistura entre fontes de carbono na produção de CMCase em fermentação submersa.

Mistura	Proporção (g/g)	CMCase (U total)	Proteínas (mg total)
FT	Controle	17,9 ± 0,042	50,2
	(1:3)	11,8 ± 0,034	39,4
FT + SM	(2:2)	14,5 ± 0,051	58,2
	(3:1)	11,2 ± 0,009	66,1
FT + SE	(1:3)	11,6 ± 0,076	45,2
	(2:2)	11,8 ± 0,017	41,5
	(3:1)	19,2 ± 0,084	45,7
FT + BC	(1:3)	17,4 ± 0,042	54,8
	(2:2)	17,1 ± 0,025	55,9
	(3:1)	20,0 ± 0,017	60,6

FT: farelo de trigo; SE: serragem de eucalipto; BC: bagaço de cana; SM: sabugo de milho. Incubação a 30°C durante 3 dias, sob 100 rpm de agitação.

#### 4.4.2 Efeito da fonte de nitrogênio na produção enzimática

Com a finalidade de determinar a melhor fonte de nitrogênio para a produção das enzimas em FSm, foram testadas diferentes fontes orgânicas e inorgânicas de nitrogênio no meio líquido SR, porém as fontes originais de nitrogênio presentes nesse meio como peptona, extrato de levedura e fosfato de amônio monobásico, foram substituídas por apenas uma delas, na mesma concentração da original ( $\Sigma$  0,5%) e, como fonte de carbono, foram utilizadas xilana Birchwood e CM-celulose, de modo que estas não interferissem com fonte de nitrogênio extra, como é o caso dos resíduos agrícolas. O meio SR original descrito em Material e Métodos foi utilizado como controle.

O fungo *A. japonicus* em estudo não apresentou considerável crescimento em meio utilizando CM-celulose como fonte de carbono. Assim, não foi possível determinar a melhor fonte de nitrogênio para a CMCases. Contudo, o resultado para a xilanase está ilustrado na Tabela 16.

**Tabela 16** – Efeito de compostos nitrogenados na produção de xilanase em FSm.

<b>Compostos nitrogenados</b>	<b>Xilanase (U total)</b>	<b>Proteínas (mg total)</b>
Sulfato de amônio	74,48 $\pm$ 0,20	6,19
Cloreto de amônio	106,24 $\pm$ 0,13	8,55
Carbonato de amônio	63,52 $\pm$ 0,40	3,17
Fosfato de amônio monobásico	221,24 $\pm$ 1,14	6,19
Acetato de amônio	171,95 $\pm$ 0,81	9,46
Nitrato de amônio	168,67 $\pm$ 1,21	15,79
Uréia	131,43 $\pm$ 1,82	5,52
Peptona	246,43 $\pm$ 0,74	23,69
Extrato de levedura	217,95 $\pm$ 0,27	20,92
Controle	219,05 $\pm$ 0,86	14,61

Microrganismo cultivado a 30°C, por 72h, a 100 rpm.

De acordo com os resultados da Tabela 16, para a maioria das fontes de nitrogênio o *A. japonicus* apresentou bom crescimento. Observou-se um aumento na produção de xilanase utilizando peptona e fosfato de amônio, os quais apresentaram valores maiores de atividade em relação ao controle. Os compostos nitrogenados que obtiveram melhores resultados na produção enzimática compõem o meio líquido SR, utilizado previamente para os estudos e, por conseguinte, estes compostos podem ser continuamente usados para produção no meio SR.

Portanto, como os resultados aumentaram a produção em apenas 1,12 vezes comparados ao controle, foi interessante verificar se diferentes concentrações destes compostos (extrato de levedura e peptona) concomitantemente a diferentes concentrações da mistura de fonte de carbono agrícola acarretariam em melhores produções através de análises estatísticas.

#### **4.4.3 Avaliação do efeito da concentração de peptona, extrato de levedura e fonte de carbono sobre a produção enzimática em FS<sub>m</sub> utilizando design experimental**

Variáveis independentes e contínuas podem ser estudadas em conjunto através de planejamentos fatoriais. Experimentos delineados em esquemas fatoriais envolvem combinações entre os níveis de dois ou mais fatores (RODRIGUES e IEMMA, 2005). Diferentes métodos estatísticos de otimização de meio de cultura têm sido usados por diversos autores como Wen et al. (2005), Alam et al. (2008) e Meshram et al. (2008). Nestes experimentos, foi utilizado um planejamento fatorial completo  $2^3$  (três fatores em dois níveis), com a finalidade de verificar como a interação entre os 3 principais componentes do meio líquido SR (extrato de levedura, peptona e mistura de fonte de carbono previamente padronizada), age sobre a produção de xilanase e CMCases e analisar os efeitos da variação da concentração destes componentes. As análises estatísticas foram realizadas através do *software Statistica 7.0*.

#### 4.4.3.1 Planejamento fatorial sobre a produção de xilanase

Os resultados experimentais foram realizados através da análise de regressão em decorrência de uma equação de produção de xilanase (U/mL) em função de peptona (P), extrato de levedura (EL) e fonte de carbono (FC):

$$\text{Xilanase (U/mL)} = 14,4 - 0,59*(\text{EL}-0,5/0,3) - 0,33*(\text{P}-0,055/0,045) + 0,28*(\text{FC} - 1,25/0,25) + 0,55*(\text{EL}-0,5/0,3)*(\text{FC}-1,25/0,25) - 0,63*(\text{P}-0,055/0,045)*(\text{FC}-1,25/0,25) + 0,41*(\text{EL}-0,5/0,3)*(\text{P}-0,055/0,045)*(\text{FC}-1,25/0,25).$$

O valor de R e R<sup>2</sup> para a equação é de 0,9420 e 0,8874 respectivamente.

O resultado da produção de xilanase está representado na Tabela 17 indicando a média e o desvio padrão da atividade enzimática obtida através do planejamento realizado em triplicata. Verificou-se que a maior produção de xilanase foi destacada no experimento 2, em torno de 17 U/mL.

O valor de *p* é uma ferramenta que avalia a significância e contribuição de cada parâmetro do modelo equacional estatístico e, a interação entre as variáveis é indicada através desses coeficientes os quais estão indicados na Tabela 18. O teste F mostrou significância de *p* < 0,05 entre as interações, o que indica que o modelo utilizado reflete em uma relação entre os componentes do meio SR na produção de xilanase.

Os valores encontrados na Tabela 18 sugerem que o efeito da peptona e do extrato de levedura são significantes a 0,01 e, da fonte de carbono a 0,05. A maioria das interações foram significantes com valores de 0,01, com exceção da interação entre fonte de carbono e extrato de levedura o qual indicou um valor de *p* de 0,093 (não sendo favorável ao modelo). Ainda as interações entre P-FC, P-EL e P-EL-FC foram significantes afetando a produção de xilanase.

**Tabela 17** - Resultado de atividade xilanólítica produzida por *A. japonicus* através de planejamento fatorial.

Nº Experimentos	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	Xilanase (U/mL)
1	-	-	-	14,4 ± 0,81
2	-	-	+	17,4 ± 0,96
3	-	+	-	14,7 ± 0,40
4	-	+	+	13,5 ± 0,05
5	+	-	-	13,3 ± 0,17
6	+	-	+	13,9 ± 0,61
7	+	+	-	14,2 ± 0,15
8	+	+	+	13,9 ± 0,20
9	0	0	0	14,0 ± 0,08
10	0	0	0	13,9 ± 0,17
11	0	0	0	14,2 ± 0,33
12	0	0	0	14,2 ± 0,61

Extrato de levedura (-) 0,2 g, (0) 0,5 g e (+) 0,8 g; peptona (-) 0,01 g, (0) 0,055 g e (+) 0,1 g; fonte de carbono (-) 1,0 g, (0) 1,25 g e (+) 1,5 g, sendo composta por farelo de soja e sabugo de milho (1:3). Experimentos realizados em triplicata.

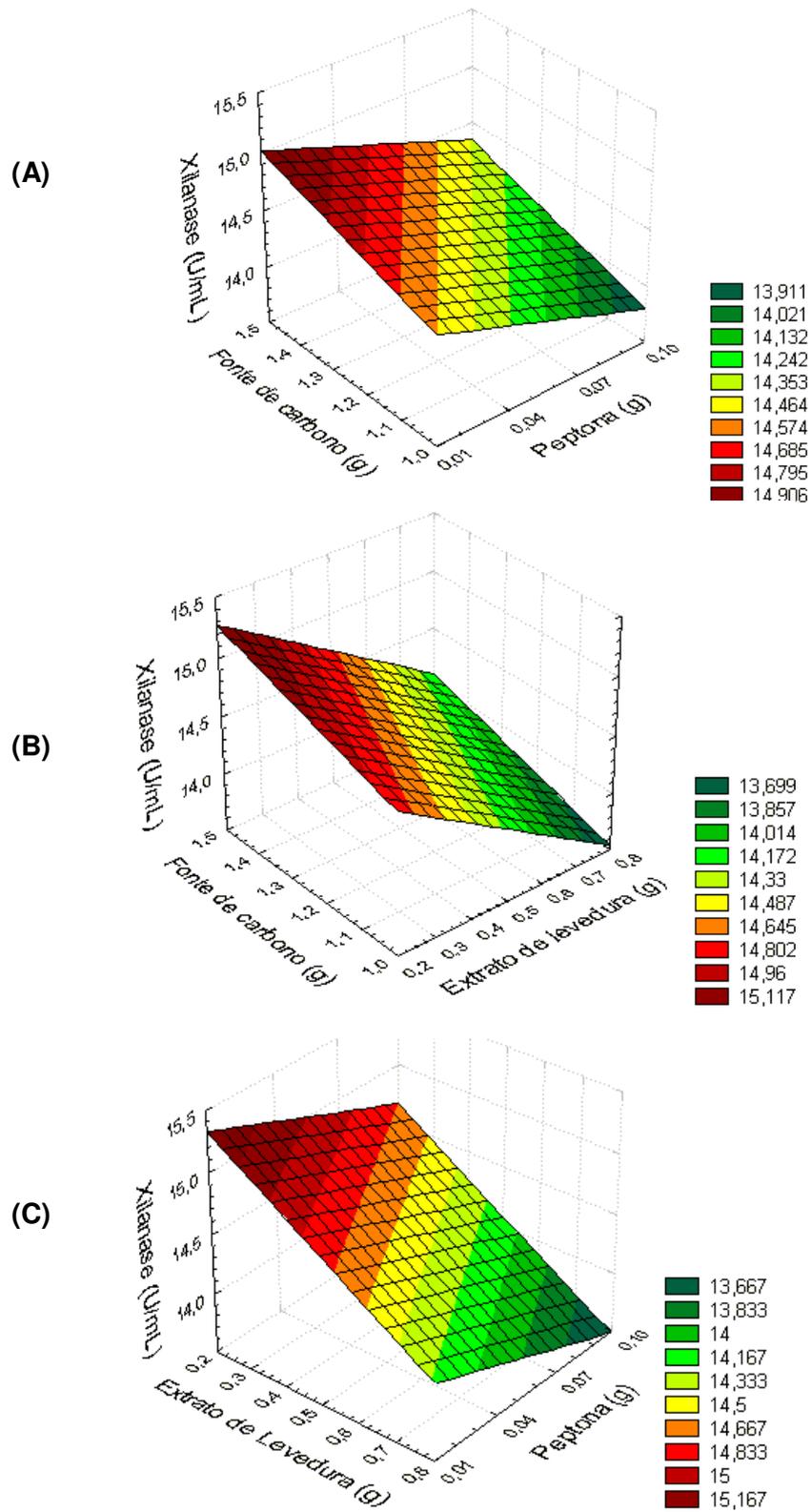
**Tabela 18** - Análise de variância para produção de xilanase por *A. japonicus* em fermentação submersa.

Efeito	Soma de quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F	p
EL	8,402	1	8,402	30,41	0,00001
P	2,667	1	2,667	9,65	0,0068
FC	1,815	1	1,815	6,57	0,0208
EL*P	7,260	1	7,260	26,28	0,0001
EL*FC	0,882	1	0,882	3,19	0,0930
P*FC	9,627	1	9,627	34,85	0,0000
EL*P*FC	4,167	1	4,167	15,08	0,0013
Erro	4,420	16	0,276		

EL = Extrato de levedura; P = Peptona; FC= Fonte de carbono. Em vermelho estão indicadas as interações significativas ( $p < 0,05$ ).

Os gráficos de superfície de resposta mostram uma superfície tridimensional que conectam um conjunto de pontos de dados e, dessa forma, apresentam a resposta (produção) relacionada à interação entre 2 fatores. Os gráficos referentes à produção de xilanase estão representados nas Figuras 21 A, B e C e demonstraram que a variação das concentrações foi significativa, uma vez que quanto menor é a concentração de peptona e extrato de levedura maior atividade enzimática é obtida, e o inverso para a fonte de carbono. Enquanto que a Tabela 18 nos mostra que quando se analisam todos os compostos tanto individualmente quanto em conjunto há influência positiva na atividade da xilanase, exceto para a interação entre extrato de levedura e fonte de carbono. Dessa forma, esta análise é de grande importância nesse contexto, pois mostra que se fossem realizados experimentos sequenciais (não utilizando o recurso da estatística através do planejamento fatorial) a interação entre os componentes não seria visualizada.

Contudo, de acordo com a equação, se aumentar apenas o extrato de levedura ou peptona, o efeito na atividade será negativo, enquanto que aumentando apenas a fonte de carbono provoca um efeito positivo. Ainda pode-se observar que se houver aumento em conjunto do extrato de levedura e peptona ou dos três fatores em estudo, ocorre também um aumento na atividade xilanásica. No entanto, considerando todos os resultados, partindo da equação obtida como parâmetro principal e visando aumentar a produtividade utilizando menor custo, o novo meio de cultivo utilizado foi composto por 0,01% de peptona, 0,2% de extrato de levedura e 1,5% de fonte de carbono para a produção de xilanases, uma vez que este meio é adequado para a produção, além de utilizar menores quantidades de peptona e extrato de levedura e de indicar um aumento de aproximadamente 16,3% em relação as outras combinações (Tabela 17).



**Figura 21** - Superfície de resposta para o planejamento delineado para as variáveis do meio SR na produção de xilanase **(A)** em função de peptona e fonte de carbono **(B)** em função do extrato de levedura e fonte de carbono **(C)** em função do extrato de levedura e peptona.

#### 4.4.3.2 Planejamento fatorial sobre a produção de celulase

Foi realizada uma análise de regressão em decorrência da equação de produção de CMCases (U/mL) em função de peptona (P), extrato de levedura (EL) e fonte de carbono (FC):

$$\text{CMCases (U/mL)} = 1,58 - 0,19*(P-0,055/0,045)*(FC-1,25/0,25) + 0,18*(EL-0,5/0,3)*(P-0,055/0,045)*(FC-1,25/0,25).$$

O valor de R e R<sup>2</sup> para a equação é de 0,6859 e 0,4705 respectivamente. O resultado da produção de CMCases está representado na Tabela 19 indicando a média e o desvio padrão da atividade enzimática obtida através do planejamento realizado em triplicata. Verificou-se que a maior produção de CMCases foi destacada no experimento 2, em torno de 2,0 U/mL. As interações entre as variáveis dos componentes do meio SR estão indicadas na Tabela 20.

**Tabela 19** - Resultado de atividade celulolítica produzida por *A. japonicus* através de planejamento fatorial.

Nº Experimentos	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	CMCases (U/mL)
1	-	-	-	1,4 ± 0,31
2	-	-	+	1,9 ± 0,21
3	-	+	-	1,8 ± 0,25
4	-	+	+	1,3 ± 0,42
5	+	-	-	1,5 ± 0,21
6	+	-	+	1,6 ± 0,10
7	+	+	-	1,4 ± 0,16
8	+	+	+	1,7 ± 0,96
9	0	0	0	1,6 ± 0,19
10	0	0	0	1,4 ± 0,27
11	0	0	0	1,8 ± 0,42
12	0	0	0	1,6 ± 0,33

Extrato de levedura (-) 0,2 g, (0) 0,5 g e (+) 0,8 g; peptona (-) 0,01 g, (0) 0,055 g e (+) 0,1 g; fonte de Carbono (-) 1,0 g, (0) 1,25 g e (+) 1,5 g, sendo composta por farelo de trigo com bagaço de cana. Experimentos realizados em triplicata.

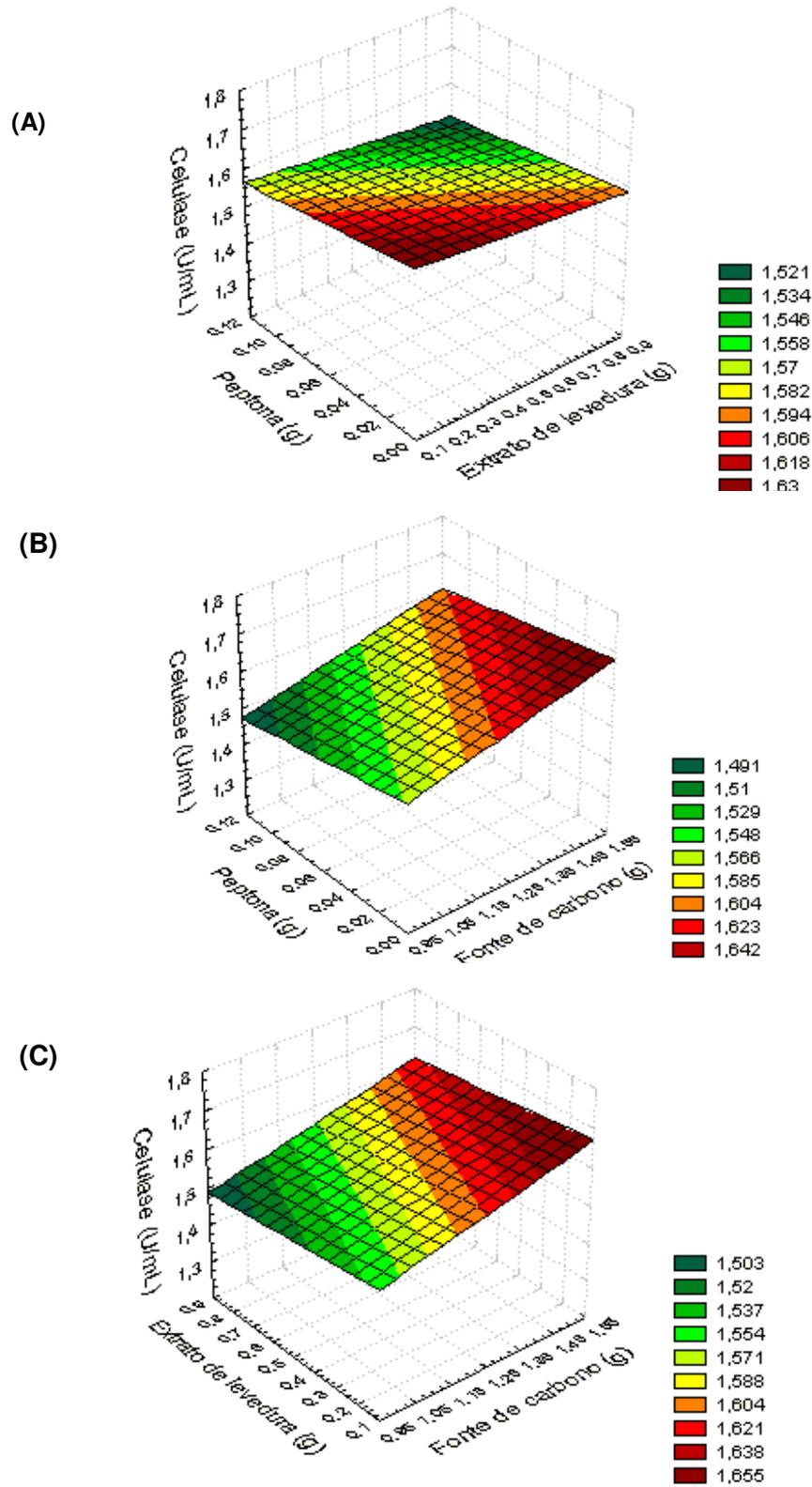
**Tabela 20** - Análise de variância para a produção de CMCases por *A. japonicus* em fermentação submersa.

Efeito	Soma de	Graus de	Quadrado	F	p
	quadrados	liberdade	médio		
EL	0,0260	1	0,2604	1,7806	0,2008
P	0,0204	1	0,0204	0,1396	0,7136
FC	0,0204	1	0,0204	0,1396	0,7136
EL*P	0,0938	1	0,0938	0,6410	0,4351
EL*FC	0,0704	1	0,0704	0,4815	0,4977
<b>P*FC</b>	<b>0,0843</b>	<b>1</b>	<b>0,0844</b>	<b>5,7693</b>	<b>0,0288</b>
<b>EL*P*FC</b>	<b>0,7704</b>	<b>1</b>	<b>0,7704</b>	<b>5,2678</b>	<b>0,0356</b>
Erro	2,34	16	0,1463		

EL = Extrato de levedura; P = Peptona; FC= Fonte de carbono. Em vermelho estão indicadas as interações significativas ( $p < 0,05$ ).

Os valores encontrados na Tabela 20 sugerem que o efeito dos componentes individuais e as interações entre P-EL e EL-FC não satisfizeram o modelo utilizado, obtendo valores de  $p > 0,05$ . Porém, as interações entre P-FC e EL-P-FC foram significativas para o aumento da produção enzimática, obtendo um valor de  $p$  menor que 0,05 estando dessa forma, dentro do nível de significância do programa utilizado.

Os gráficos de superfície de resposta estão indicados na Figura 22 A, B e C, contudo é importante ressaltar que estes não mostram a interação entre os três componentes, como visto na Tabela 20. No entanto, indicam que a variação da concentração de peptona e extrato de levedura não proporcionou grande aumento de atividade, uma vez que quanto menores são suas concentrações maior atividade enzimática é obtida, já em relação à fonte de carbono quanto maior a concentração maior atividade é observada, assim como o resultado anterior obtido para a xilanase.



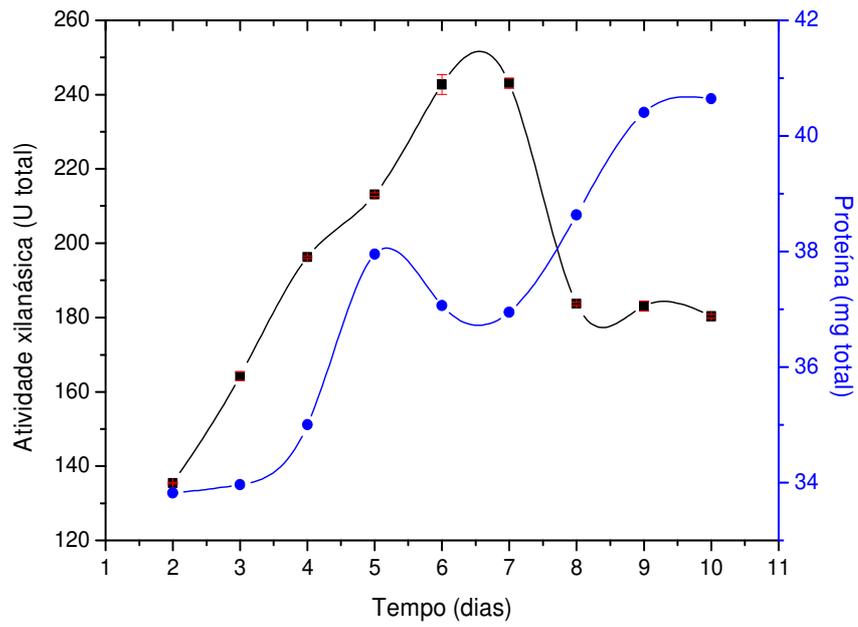
**Figura 22** - Superfície de resposta para o planejamento delineado para as variáveis do meio SR na produção da CMCase **(A)** em função do extrato de levedura e peptona, **(B)** em função de peptona e fonte de carbono **(C)** em função do extrato de levedura e fonte de carbono.

De acordo com a equação descrita, a interação entre peptona e fonte de carbono influenciou negativamente na atividade de CMCases enquanto que a interação entre os três fatores foi muito positiva para a atividade de CMCases. Assim sendo, ao modificarmos os três fatores simultaneamente, podemos obter uma melhora da produção CMCásica.

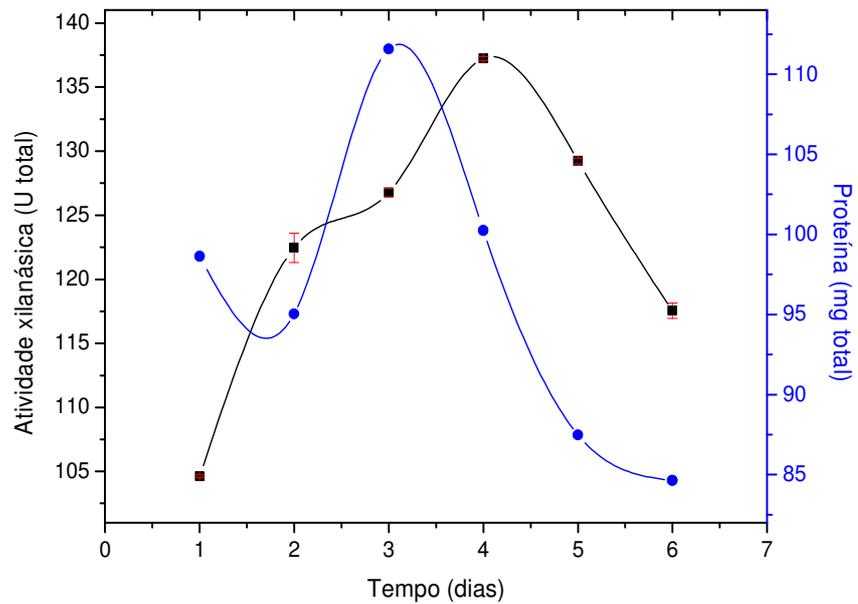
#### **4.4.4 Determinação do tempo de cultivo**

Em vista de aperfeiçoar o processo de produção enzimática, foi variado o tempo de cultivo sob 100 rpm de agitação e em condições estáticas a fim de determinar a melhor condição de produção. Desse modo, as culturas padronizadas foram incubadas a 30°C, por um período de 2 a 10 dias, em crescimento estático, e de 1 a 6 dias sob agitação (Figuras 23 e 24 A e B).

Em conclusão deste experimento, a produção enzimática em condições estáticas foi a melhor encontrada para xilanase, obtendo uma atividade de aproximadamente 2 vezes maior durante 6 dias quando comparada durante 4 dias sob agitação, enquanto que na produção celulásica não foi verificado aumento quando comparadas as duas condições descritas, ambas apresentando atividade aproximada de 26 U totais. Em crescimento sob agitação, os melhores resultados foram durante 3 dias para celulase e 4 dias para xilanase, porém, a condição de cultivo padronizada para prosseguir com os próximos experimentos, foi durante 6 dias para a xilanase e 5 dias para a celulase, ambas em condições estáticas.

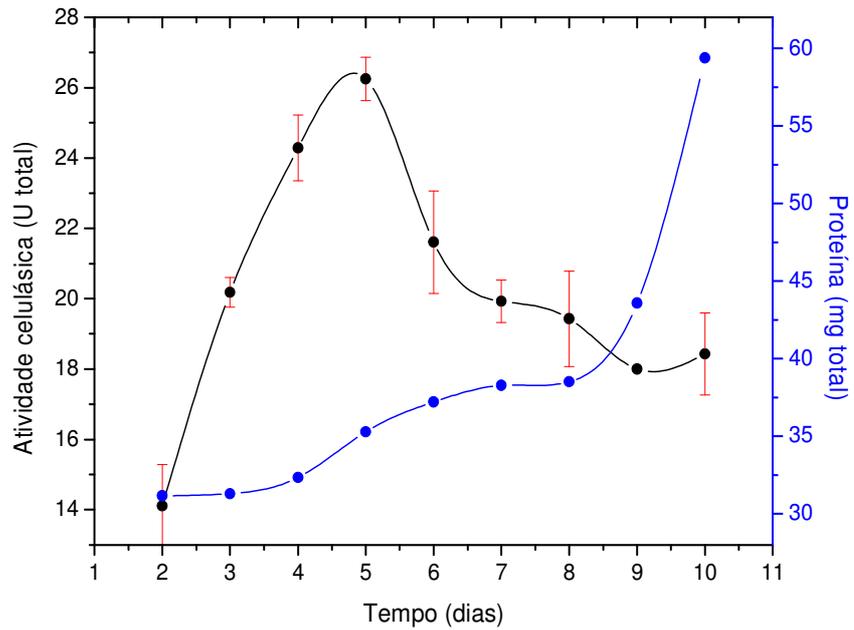


(A)

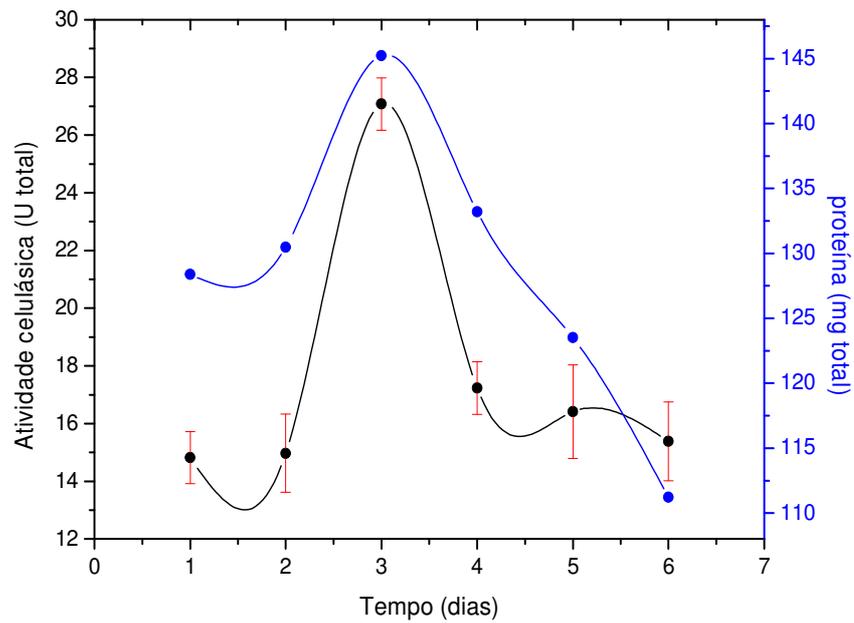


(B)

**Figura 23** - Efeito do tempo de cultivo na produção de xilanase e proteínas totais produzidas em fermentação submersa **(A)** condições estáticas **(B)** sob 100 rpm de agitação. Símbolos: (■) xilanase e (●) proteínas totais.



(A)

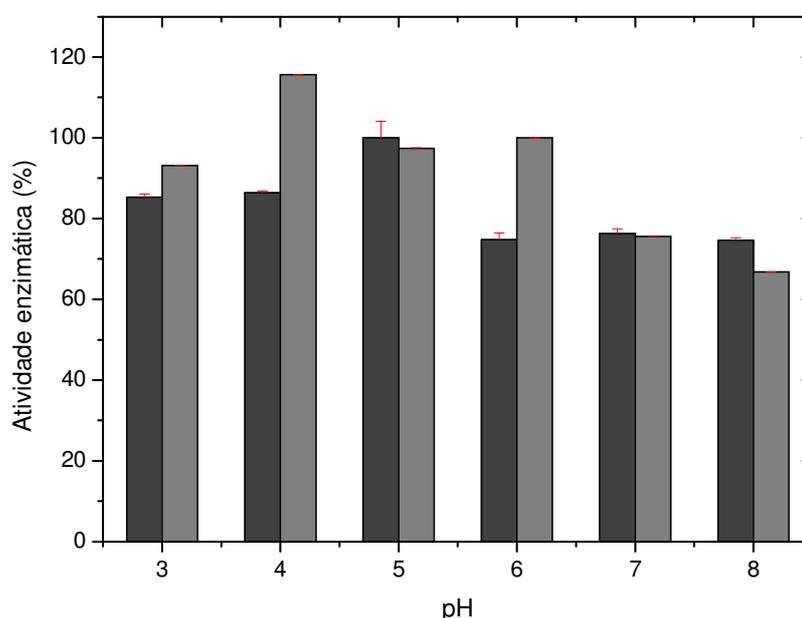


(B)

**Figura 24** - Efeito do tempo de cultivo na produção de CMCase e proteínas totais produzidas em fermentação submersa **(A)** condições estáticas **(B)** sob 100 rpm de agitação. Símbolos: (●) CMCase e (●) proteínas totais.

#### 4.4.5 Efeito do pH inicial do meio de cultivo sobre a produção enzimática por *A. japonicus*

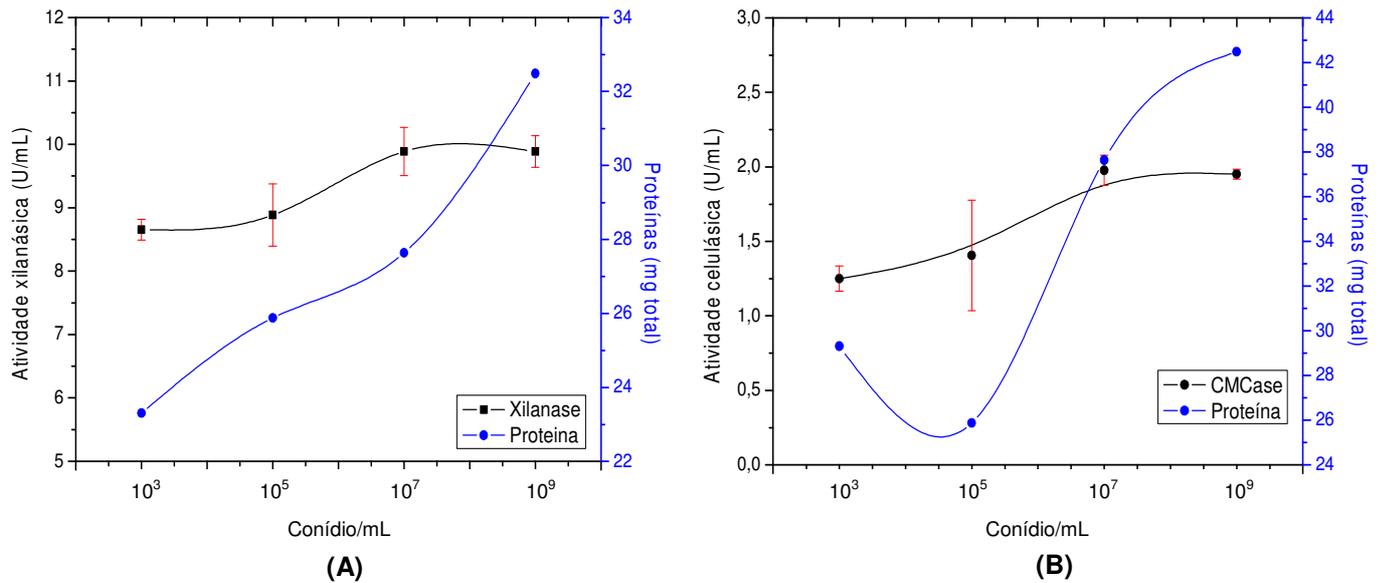
Neste experimento, verificou-se a influência do pH inicial no meio de cultivo na produção das enzimas. Como resultado, obteve-se 4,0 e 5,0 como melhores pHs iniciais, para CMCases e xilanases, respectivamente (Figura 25). No entanto, vale ressaltar que em todos os cultivos o pH final encontrado ficou em torno de 6,5-7,0, sem que a enzima perdesse atividade neste pH.



**Figura 25** - Efeito do pH inicial sobre a produção das enzimas por *A. japonicus*. Colunas: ■ : xilanase e ■ : CMCases.

#### 4.4.6 Efeito da concentração de inóculo sobre a produção enzimática

Neste experimento, a densidade de inóculo foi alterada de forma a analisar o efeito de diferentes concentrações na produção enzimática em FSm. Assim, foi acrescentado 1 mL de inóculo às culturas, variando a concentração de  $10^3$  a  $10^9$  conídios/mL. Estas foram incubadas a 30°C, em condições estáticas durante o tempo previamente determinado para cada enzima em estudo (Figuras 26 A e B).



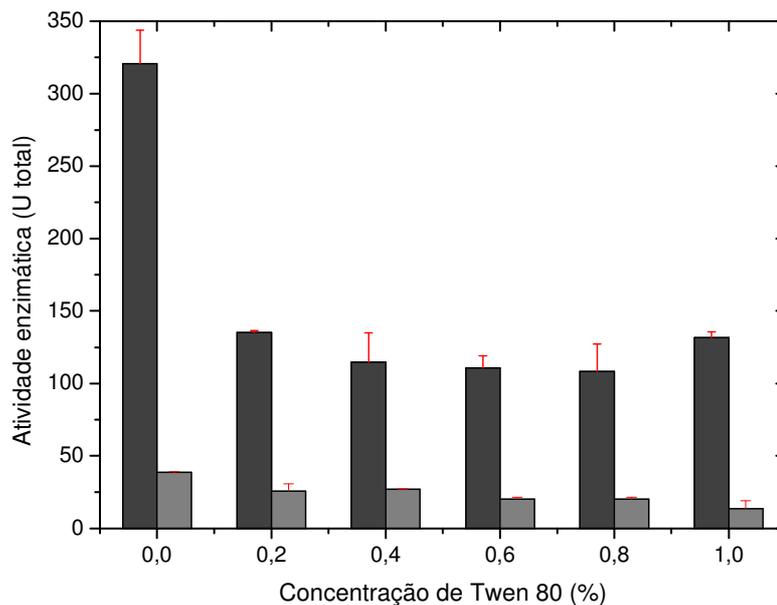
**Figura 26** - Efeito da concentração de conídios na produção de **(A)** xilanase e **(B)** CMCases obtidas em U/mL.

Observando-se a Figura 26 verificou-se que a concentração de  $10^7$  conídios/mL foi a melhor obtida para ambas as produções enzimáticas (aumentando cerca de 1,3 u/mL). Para as CMCases observou-se um aumento de atividade conforme aumentou a concentração de conídios, porém quando atingiu a concentração de  $10^7$ , houve um aumento de atividade permanecendo constante a  $10^9$  conídios/mL. Em relação ao crescimento, foi maior quando se utilizou a concentração de  $10^9$  e observa-se que o valor de proteínas totais foi aumentando conforme o aumento da concentração de conídios/mL em ambas as culturas.

#### 4.4.7 Efeito da adição de Tween 80 na produção enzimática

Para finalizar os experimentos de padronização e otimização do meio submerso, foi variada a concentração de Tween 80 de 0% a 1% com intervalos de 0,2 para verificar seu efeito na produção. Os meios utilizados foram os padronizados anteriormente. A incubação deu-se em estufa a  $30^\circ$ , em condições estáticas em tempos pré-estabelecidos.

O filtrado enzimático, obtido após a fermentação, foi dialisado contra água deionizada durante 24 horas para retirada do detergente. A Figura 27 indica que o Tween 80 causou um efeito negativo na produção enzimática. Para a xilanase houve decréscimo de mais de 50% na atividade e, para a CMCases, de aproximadamente 35%. Quanto ao crescimento (gráfico não mostrado), não foram observadas alterações. Contudo, para a produção destas enzimas o Tween 80 não deve ser acrescentado às culturas.



**Figura 27** - Variação da concentração de Tween 80 na produção enzimática. Colunas: ■ xilanase e ■ : CMCases.

#### 4.5 Comparação entre as produções padronizadas dos meio de fermentação (FES e FSm)

As condições padronizadas e os respectivos resultados das produções enzimáticas em U totais<sup>4</sup> estão indicados na Tabela 21. Em todas as culturas a incubação foi a 30°C e com 10<sup>7</sup> conídios/mL.

Verificou-se que tanto a produção de xilanases quanto de CMCases obtiveram melhores resultados na FES em aproximadamente 25% quando comparada a

<sup>4</sup> U totais: U/mL multiplicada pelo volume total de FSm em cada Erlenmeyer ou U/g multiplicada pela quantidade em gramas de substrato sólido utilizado na FES

produção em FSm. Portanto, uma vez que a FES produz melhores níveis enzimáticos, em maior volume (30 mL) e em menor período, esta foi utilizada para produção das enzimas com a finalidade de aplicação em nutrição de ruminantes.

**Tabela 21:** Comparação entre as atividades de xilanases e CMCases obtidas na produção em FES e FSm.

Fermentação	Condições	Atividade (U total)	
		Xilanase	CMCases
FSm	Meio SR, FS+SM (1:3), 6 dias, pH <sub>in</sub> 5,0.	582	-
	Meio SR, FT+BC (3:1), 5 dias, pH <sub>in</sub> 4,0.	-	70
FES	FS+SM (1:3), sais Khanna com 0,25% peptona, 3 dias, pH <sub>in</sub> 6,0.	716	-
	FT+BC (3:1), sais SR com 0,25% peptona, 6 dias, pH <sub>in</sub> 7,0.	-	87

FS: farelo de soja; SM: sabugo de milho; FT: farelo de trigo e BC: bagaço de cana.

#### 4.6 Dosagens de algumas enzimas extracelulares presentes no extrato bruto obtido por *A. japonicus*

Em ambos os extratos brutos obtidos das otimizações há presença de xilanases e CMCases. Assim, visando à aplicação biotecnológica em ruminantes é interessante conhecer outras possíveis enzimas presentes neste extrato bruto obtido a partir de FES, como proteases, amilases, fitases, pectinases, etc., que são importantes na dinâmica do rúmen. Abaixo segue a Tabela 22 a qual mostra as enzimas dosadas e os níveis de atividade em U/mL encontrados.

Observou-se presença de protease, fitase, pectinase (poligalacturonase), amilase e xilanase em maiores quantidades. Em relação ao complexo celulolítico encontrou-se  $\beta$ -glucosidase em maiores quantidades, como descrito na literatura por Sanyal et al. (1988), assim como também  $\beta$ -xilosidase descrita por Wakiyama et al. (2008).

**Tabela 22:** Atividade enzimática em U/mL de diferentes enzimas contidas no extrato bruto.

<b>Enzimas</b>	<b>Atividade (U/mL)</b>
Protease	26,98
Tanase	0
Pectinase	12,9
Amilase	38,1
Fitase	26,2
Lipase	0,02
CMCase	1,96
Avicelase	0,063
$\beta$ -glicosidase	1,21
Fpase	0,062
Xilanase	26,2
$\beta$ -xilosidase	0,45
$\alpha$ -arabinofuranosidase	0,4
$\alpha$ -glucuranosidase	0,01
acetilxilanoesterase	1,0

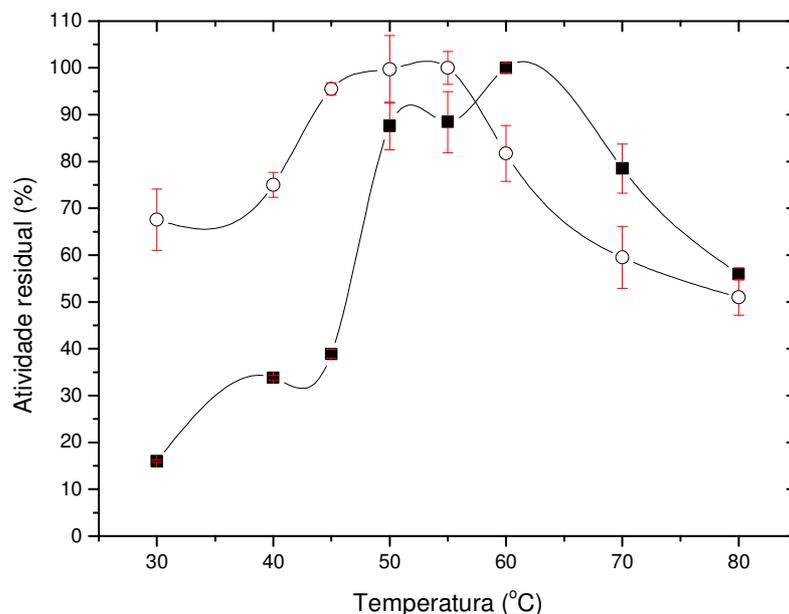
*Parte III: Caracterização  
bioquímica dos extratos brutos  
de Aspergillus japonicus*

## 4.7 Caracterização da xilanase e CMCase produzidas por fermentação em estado sólido

### 4.7.1 Efeito da temperatura no ensaio enzimático

Para verificar o efeito da temperatura no ensaio enzimático, esta foi variada de 30 a 80°C. O resultado ilustrado na Figura 28 indica que a temperatura ótima de atividade da xilanase foi a 60°C e, a CMCase apresentou uma temperatura ótima em torno de 55°C. Para ambas as enzimas observou-se decréscimo de aproximadamente 20% quando a temperatura foi aumentada 10°C a partir da temperatura estipulada como ótima.

Ainda, é importante ressaltar que a xilanase possuiu baixa atividade em 30°C, atuando a 10% de sua atividade apenas, enquanto que a CMCase obtida da mesma cepa, apresentou cerca de 70% de sua atividade na mesma temperatura. Estes resultados denotam uma boa aplicabilidade industrial destas enzimas sob temperaturas relativamente altas em torno de 45 a 60°C.



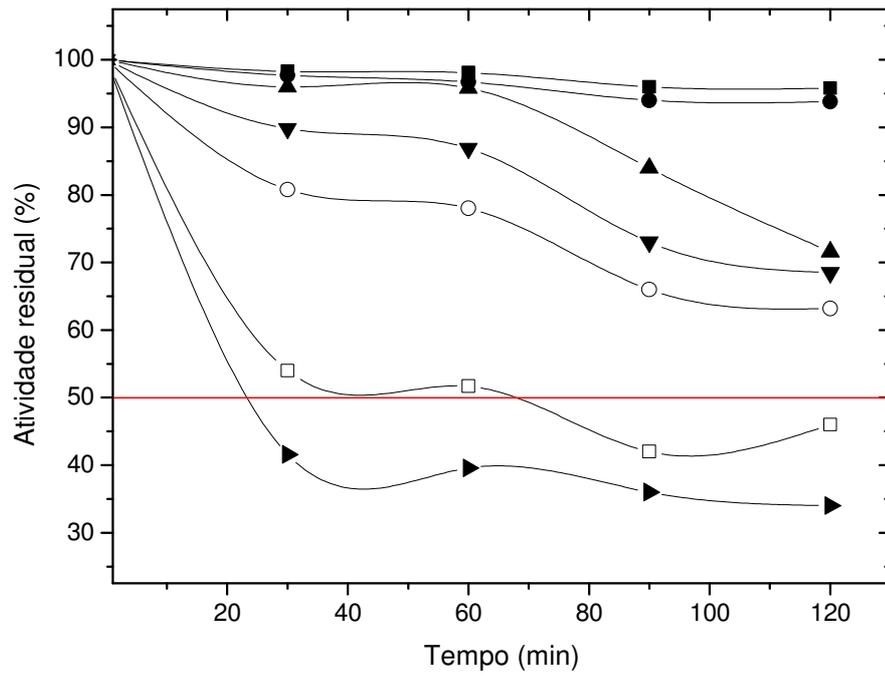
**Figura 28** – Efeito da temperatura no ensaio enzimático para xilanase e CMCase produzidas em FES por *A. japonicus*. Símbolos: (■) Xilanase e (○) CMCase.

#### **4.7.2 Estabilidade térmica das enzimas nos ensaios enzimáticos**

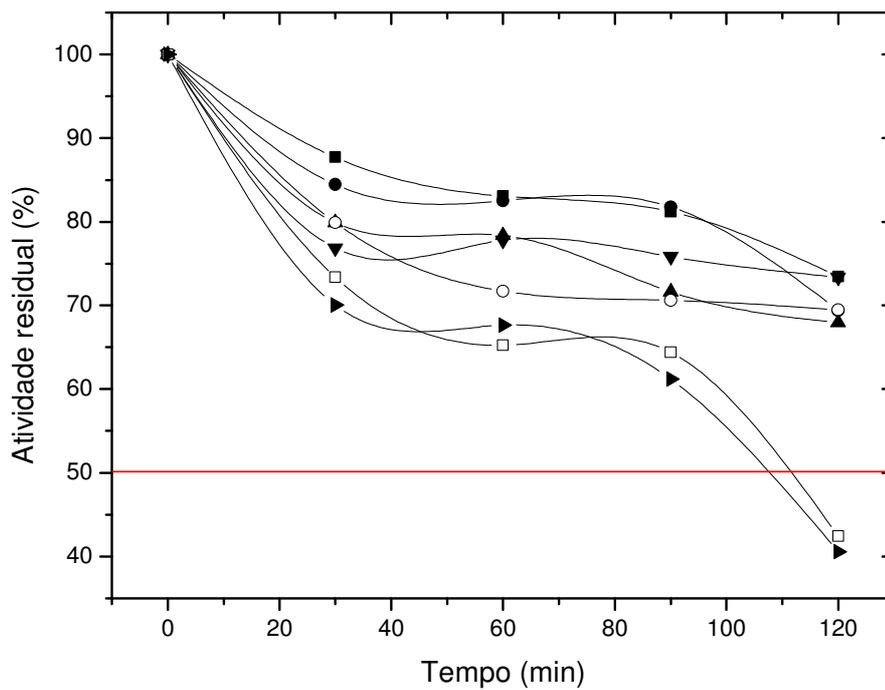
Um dos parâmetros mais importantes a ser investigado quando se estuda uma enzima com aplicação industrial é a termoestabilidade da mesma. Dessa forma, a enzima foi incubada na ausência de substrato (xilana ou CM-celulose), por 120 minutos em diferentes temperaturas.

Na Figura 29A observou-se que a xilanase em estudo foi 100% estável durante os 120 minutos a 30 e 40°C, porém conforme o aumento da temperatura esta estabilidade decaiu, observando um declínio de 60% em 30 minutos a 70°C. Já para a CMCases, até 60°C a estabilidade manteve-se com cerca de 70% de atividade residual nos 120 minutos, porém da mesma forma, quando se aumentou a temperatura, a estabilidade da mesma decresceu, obtendo a 70°C uma atividade residual de 40%. Este resultado é bastante satisfatório, pois além de mostrar boa estabilidade das enzimas, indica grande potencial biotecnológico.

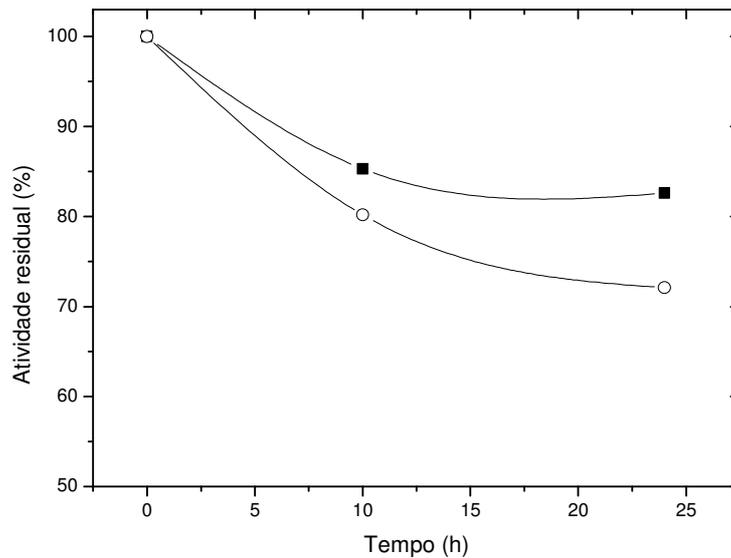
Outro ensaio realizado foi a estabilidade enzimática de ambas a uma temperatura próxima à temperatura do rúmen durante 24 horas, que segundo descrito por Teixeira (1992) é em torno de 38 – 40°C (Figura 30). Este resultado é satisfatório, uma vez que indica que ambas as enzimas foram em torno de 80% estáveis a 40°C durante 24 horas, o que denota uma aplicabilidade industrial em processos que utilizam temperaturas amenas, como por exemplo, em indústrias têxteis e de lavagem industrial e, principalmente, no foco deste trabalho, em digestibilidade de ruminantes.



(A)



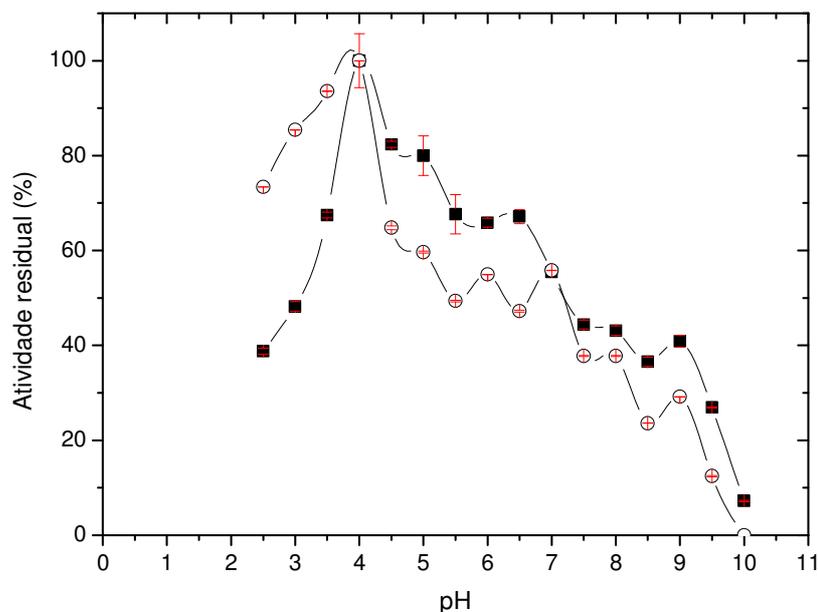
**Figura 29** – Estabilidade térmica em diferentes temperaturas de **(A)** Xilanase e **(B)** CMCase, pré-incubadas durante 120 minutos. Símbolos: (■) 30°C, (●) 40°C, (▲) 50°C, (▼) 55°C, (○) 60°C, (□) 65°C e (►) 70°C.



**Figura 30** – Estabilidade térmica da xilanase e CMCases a 40°C durante 24 horas. Símbolos: (■) Xilanase e (○) CMCase.

#### 4.7.3 Efeito do pH no ensaio enzimático

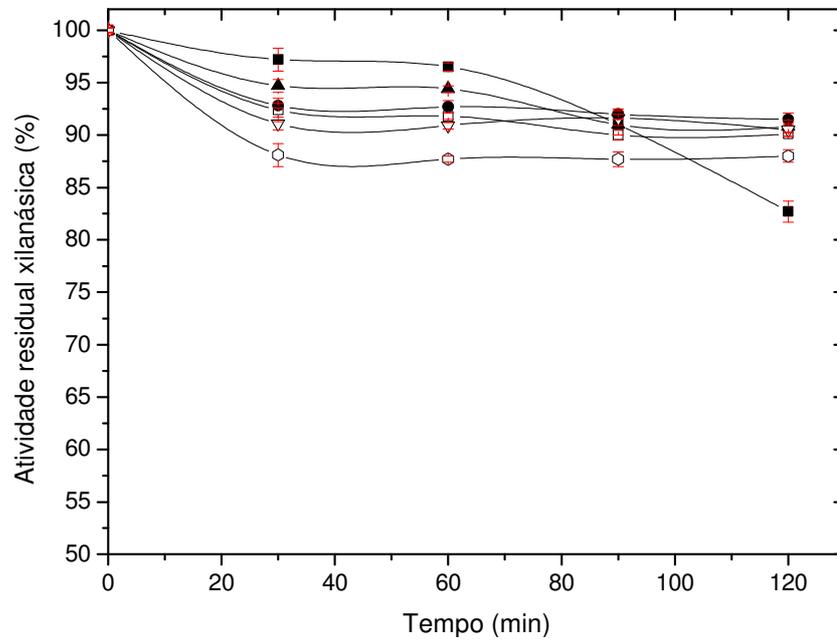
Outro parâmetro analisado foi o efeito do pH na atividade enzimática. De acordo com a Figura 31, verificou-se que ambas as enzimas do extrato bruto apresentaram um pH ótimo de 4,0 o que indica bom potencial em aplicações biotecnológicas ácidas.



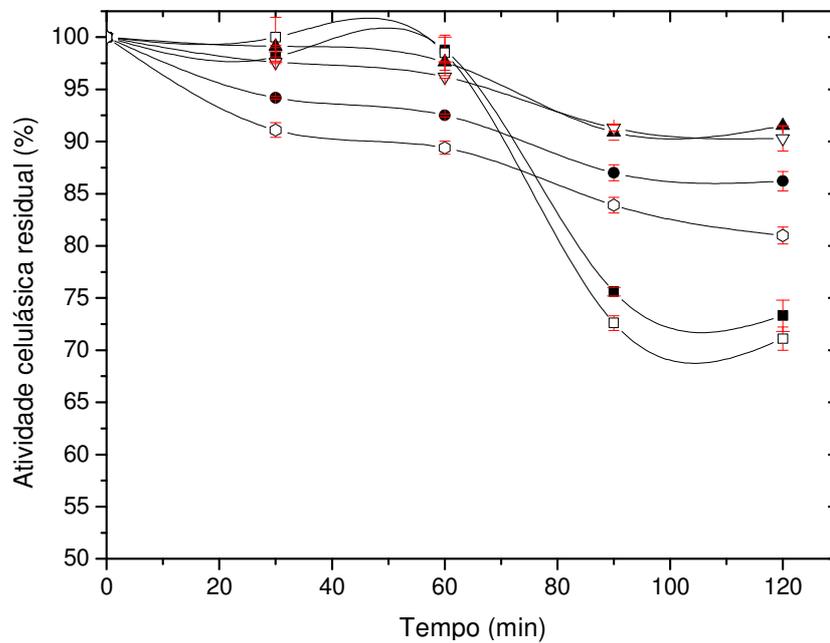
**Figura 31** – Influência do pH na atividade de xilanase e CMCases produzida por *A. japonicus* utilizando tampão McIlvaine, fosfato de sódio, Tris-HCl e glicina. Símbolos: (■) xilanase e (○) CMCase.

#### 4.7.4 Estabilidade ao pH no ensaio enzimático

Os extratos foram incubados em tampões na faixa de pH 3,0 a 8,0, durante 120 minutos a 4°C (Figura 32).



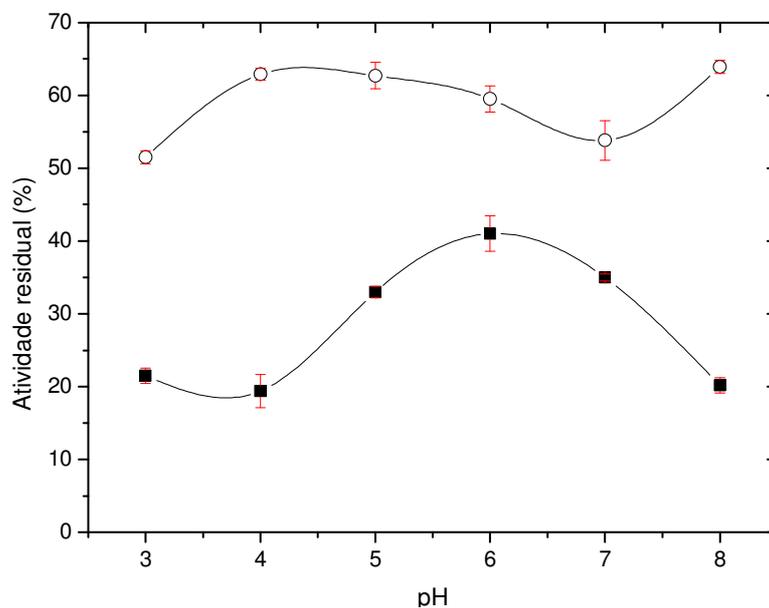
(A)



(B)

**Figura 32** – Estabilidade em relação ao pH da (A) Xilanase e (B) CMCCase pré-incubadas durante 120 minutos. Símbolos dos pHs: (■) 3, (□) 4, (▲) 5, (△) 6, (●) 7 e (○) 8.

De acordo com o resultado obtido, a xilanase foi estável na faixa de pH entre 4,0 a 7,0 com atividade em torno de 90% durante os 120 minutos, porém o resultado obtido para a CMCase em estudo, indica menor estabilidade em pHs mais ácidos a partir de 90 minutos e, boa estabilidade em pHs 5,0 e 6,0 estando em torno de 90% de sua atividade. Em pH próximo ao encontrado para o ambiente ruminal (7,0) ambas as enzimas apresentaram valores estáveis de 80-90% de atividade, o que indica um resultado satisfatório para a aplicação na digestibilidade de ruminantes. A Figura 33 ilustra o resultado da estabilidade ao pH das enzimas até 24 horas de pré-incubação em geladeira. O valor de 100% refere-se ao tempo inicial (zero) em cada pH.

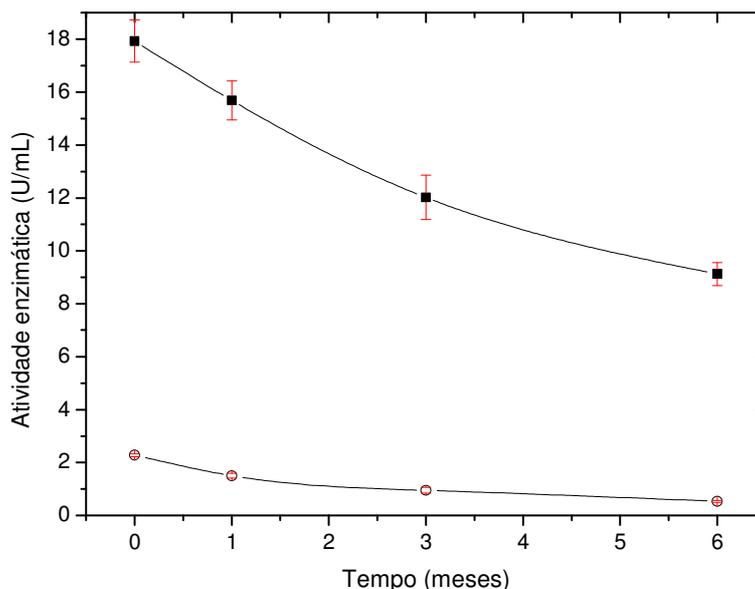


**Figura 33** – Estabilidade ao pH das enzimas em estudo durante 24 horas de pré-incubação. Símbolos: (■) Xilanase e (○) CMCase.

A Figura 33 nos indica uma estabilidade acima de 50% para a CMCase após 24 horas de incubação e, uma baixa estabilidade na atividade da xilanase em todos os pHs testados (menor que 50% de atividade).

#### 4.7.5 Estabilidade dos extratos enzimáticos armazenados por 6 meses

As soluções obtidas nos cultivos de *A. japonicus* armazenadas em freezer a  $-2^{\circ}\text{C}$  durante 1, 3 e 6 meses, foram dosadas como descrito em 3.8.1.



**Figura 34** – Estabilidade enzimática quando armazenadas após cultivo em estado sólido e congeladas durante 6 meses. Símbolos: (■) xilanase e (○) CMCase.

A Figura 34 mostra que as enzimas ainda possuem atividade enzimática aceitáveis até 3 meses, porém ocorreu perda de 50% de atividade da xilanase e de quase 80% da atividade de CMCases, ambas após um período de 6 meses congelada. Dessa forma, os resultados obtidos indicaram que o tempo de estoque enzimático pode ser mantido por até 3 meses em congelamento.

#### 4.7.6 Efeito da adição de íons à reação enzimática sobre a atividade enzimática

A atividade de muitas enzimas pode ser fortemente afetada pela presença de diferentes íons durante a reação, podendo agir como co-fatores ou inibidores. Em virtude deste fato, verificou-se a influência de vários íons e alguns compostos na atividade da xilanase e CMCase presentes nos extratos brutos. Para tanto, o extrato foi dialisado contra água destilada e EDTA antes do experimento. O ensaio procedeu normalmente com a adição de uma solução de íons ou outros compostos em uma concentração final de 5 mM, seguido pelo método de dosagem de açúcares redutores.

**Tabela 23** – Efeito da adição de íons e compostos na reação enzimática sobre a atividade de CMCases e xilanases brutas.

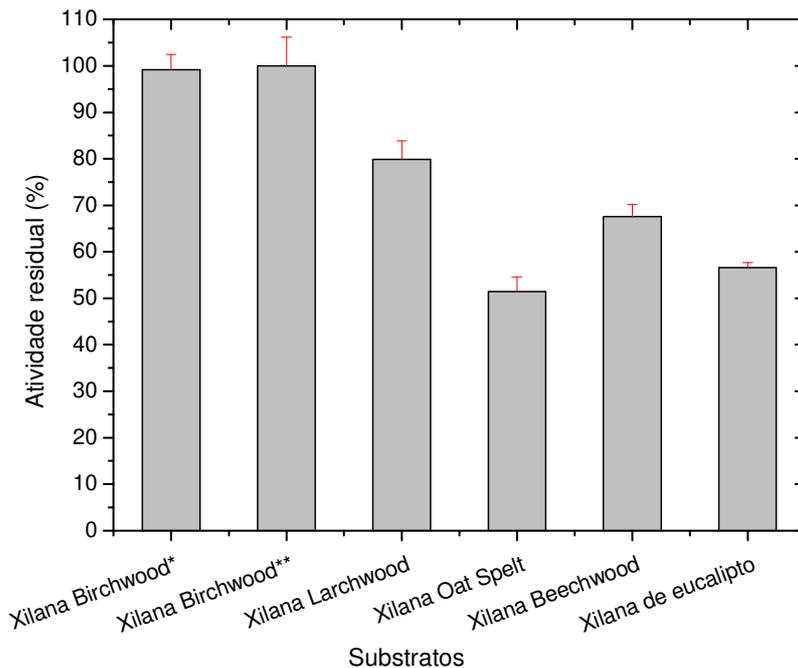
<b>Íons/Compostos (5 mM)</b>	<b>Xilanase (AR* %)</b>	<b>CMCase (AR* %)</b>
BaCl <sub>2</sub>	82,3 ± 1,63	98,0 ± 0,09
β-mercaptoetanol	93,3 ± 2,26	92,8 ± 0,16
CuSO <sub>4</sub>	110,0 ± 0,21	92,2 ± 0,08
MgCl <sub>2</sub>	56,3 ± 0,42	64,7 ± 0,24
AlCl <sub>3</sub>	76,7 ± 0,28	98,7 ± 0,20
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	62,6 ± 0,35	72,5 ± 0,21
HgCl <sub>2</sub>	54,1 ± 0,07	58,2 ± 0,20
NaBr	54,1 ± 0,64	69,9 ± 0,05
Zn(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	63,0 ± 0,07	83,0 ± 0,17
NaCl	48,0 ± 0,07	68,6 ± 0,11
NH <sub>4</sub> Cl	49,5 ± 0,35	81,0 ± 0,16
CaCl <sub>2</sub>	58,2 ± 1,13	57,5 ± 0,06
KCl	49,7 ± 0,85	41,8 ± 0,19
MnCl <sub>2</sub>	73,4 ± 0,49	164,1 ± 0,33
CoCl <sub>2</sub>	76,5 ± 0,78	113,7 ± 0,33
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	59,5 ± 2,33	88,9 ± 0,01
Controle	100,0 ± 0,21	100,0 ± 0,08

\* Atividade residual

A Tabela 23 ilustra os efeitos provocados pelos diferentes compostos, onde se destaca o aumento da atividade CMCásica na presença de Mn<sup>++</sup> em cerca de 64%. Em relação à xilanase não foi observado grande aumento da atividade (apenas o sulfato de cobre apresentou 10% de aumento), sendo que para a maioria dos compostos testados observou-se efeito inibitório.

#### 4.7.7 Hidrólise de diferentes tipos de xilana por xilanase produzida por *A. japonicus*

A hidrólise da xilanase foi testada em algumas xilanas como: Birchwood (madeira de videiro), Beechwood (madeira de pinheiro), Larchwood (madeira de faia), Oat Spelt (aveia) e xilana de eucalipto (Figura 35). A metodologia de reação foi a mesma descrita em 3.8.1 pelo método de açúcares redutores.



**Figura 35** – Atividade residual de xilanase em diferentes substratos. Todos os ensaios foram realizados em pH 4,0 a 60°C. (\*) Xilana Birchwood em tampão acetato e (\*\*) Xilana Birchwood em tampão McIlvane.

O resultado indica uma boa atuação da xilanase nos substratos xilana Birchwood (100%), Beechwood (68%) e Larchwood (80%). O valor de 100% foi atribuído ao controle, que, no caso, foi a xilana Birchwood que estava sendo anteriormente utilizada como substrato, a qual apresentou maior resposta de hidrólise. As xilanas Oat Spelt e de eucalipto obtiveram os menores valores de atividade entre 50 e 60%. Este fato pode ser atribuído às diferentes fontes de extração destes substratos, variando assim o grau e o tipo de grupos substituintes. O uso de diferentes tampões em pH 4,0 (acetato e McIlvane) não interferiu na atividade enzimática, apresentando o acetato uma diferença de apenas 0,8% em relação ao McIlvane.

*Parte IV: Estudo do potencial de  
aplicação dos extratos brutos  
obtidos por Aspergillus japonicus  
em ruminantes*

## 4.8 Estudo da aplicação enzimática na hidrólise de forrageiras

### 4.8.1 Estudo da citotoxicidade do extrato bruto produzido por *A. japonicus*

Os extratos enzimáticos produzidos por *A. japonicus* foram testados quanto à sua citotoxicidade em diferentes concentrações (Tabela 24).

Os resultados mostraram que tanto as células tratadas com o extrato bruto quanto os controles que não receberam o extrato apresentaram o mesmo número de colônias formadas, tanto após 1 hora de incubação quanto após 24 horas, significando que o preparado enzimático não apresentou caráter citotóxico. Portanto, este extrato pode ser utilizado em ruminantes.

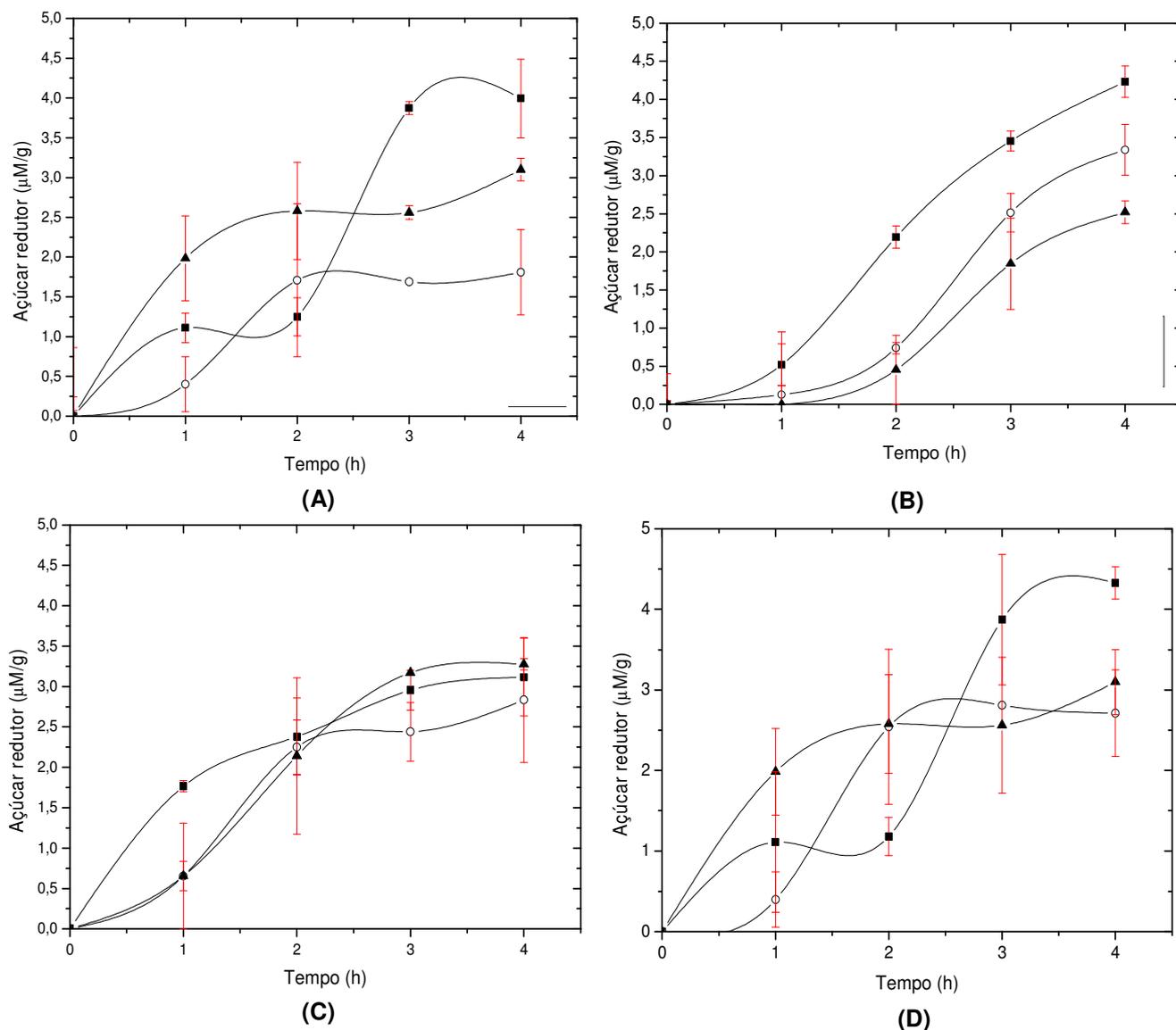
**Tabela 24** – Determinação da citotoxicidade do extrato bruto de *A. japonicus*

Tempo de incubação (h)	Colônias formadas (%)	
	Controle	Extrato enzimático
1	93 ± 1,2	91 ± 1,9
24	98 ± 1,5	97,5 ± 1,3

### 4.8.2 Avaliação do preparado enzimático na hidrólise de forrageiras simulando pastejo animal

A hidrólise enzimática das forrageiras, realizada a 39-40°C a partir de diferentes concentrações do *mix* dos extratos brutos obtidos por *A. japonicus*, resultou na Figura 36, cuja análise evidencia que a formação de açúcares redutores, obtida em µM/g, a partir da ação do preparado enzimático foi quatro vezes maior que quando não se utilizou o extrato sendo, portanto, considerada adequada, uma vez que as forrageiras não passaram por pré-tratamentos químicos.

No controle avaliado apenas com água destilada, todos os capins testados não apresentaram liberação de açúcares redutores (resultado não mostrado).



**Figura 36** – Hidrólise enzimática de capins em diferentes concentrações de extrato enzimático durante 4 horas de incubação, a 40°C com agitação. O experimento foi realizado em triplicata. **(A)** Tifton-85 **(B)** *Brachiaria brizantha* **(C)** Tanzânia **(D)** *Brachiaria decumbens*. Símbolos: -■- dose 1, -○- dose 2 e -▲- dose 3. As doses 1, 2 e 3 referem-se às concentrações enzimáticas de xilanase e CMCase, nas quais continham 15, 10, 5 U/mL e 0,53, 0,32, 0,19 U/mL, respectivamente. O controle realizado com tampão, não apresentou liberação de açúcar redutor.

Quando se acrescentou a solução enzimática, as forrageiras *B. decumbens* e *B. brizantha* apresentaram melhor resposta de hidrólise, tendo o primeiro, liberado 4,32 µM/g e, o segundo, 4,23 µM/g de açúcar redutor utilizando a maior concentração enzimática (dose 1). Nos outros capins testados, os melhores resultados foram de 3,9

$\mu\text{M/g}$  de açúcar redutor no Tifton-85 e de  $3,0 \mu\text{M/g}$  de açúcar redutor no Tanzânia testado. Pode-se inferir a partir destes resultados que, se o Tifton-85 e o *B. decumbens* fossem expostos a um maior período de tempo, talvez a liberação de açúcares redutores na maior concentração enzimática seria mais bem pronunciada.

Apesar da pequena diferença (30% a menos de liberação) entre *Brachiaria* e Tanzânia, este resultado é compreensível quando se observa a parede celular das diferentes forrageiras, uma vez que os capins Tanzânia e Tifton-85 apresentaram teores de lignina maiores quando comparado ao gênero *Bachiaria* o que pode dificultar a hidrólise enzimática destas forrageiras (Tabela 25).

**Tabela 25** – Análise bromatológica das forrageiras testadas na hidrólise enzimática

Amostra	MS (%)	FDN (%MS)	FDA (%MS)	LIG (%MS)	MM (%MS)	PB (%MS)	H (%MS)	C (%MS)
<i>B.brizantha</i>	94,15	63,84	38,07	4,22	8,45	9,84	25,78	33,84
<i>B.decumbens</i>	93,55	60,30	32,89	4,44	8,27	9,43	27,41	28,45
Tanzânia	93,83	74,53	51,26	9,99	7,51	7,55	23,27	41,27
Tifton-85	94,20	70,88	42,57	6,17	7,51	12,23	28,31	36,41

FDN = fibra em detergente neutro; FDA = fibra em detergente ácido; LIG = lignina; MM = material mineral; PB = proteína bruta; MS = matéria seca; H = hemicelulose; C = celulose.

A Tabela 25 refere-se aos experimentos realizados com as forrageiras segundo metodologia de Van Soest (1994), a qual permite um melhor fracionamento da fração fibrosa em FDN (celulose, hemicelulose e lignina), FDA (celulose e lignina) e outras frações. Com essas informações pode-se discernir melhor sobre os resultados obtidos nos gráficos.

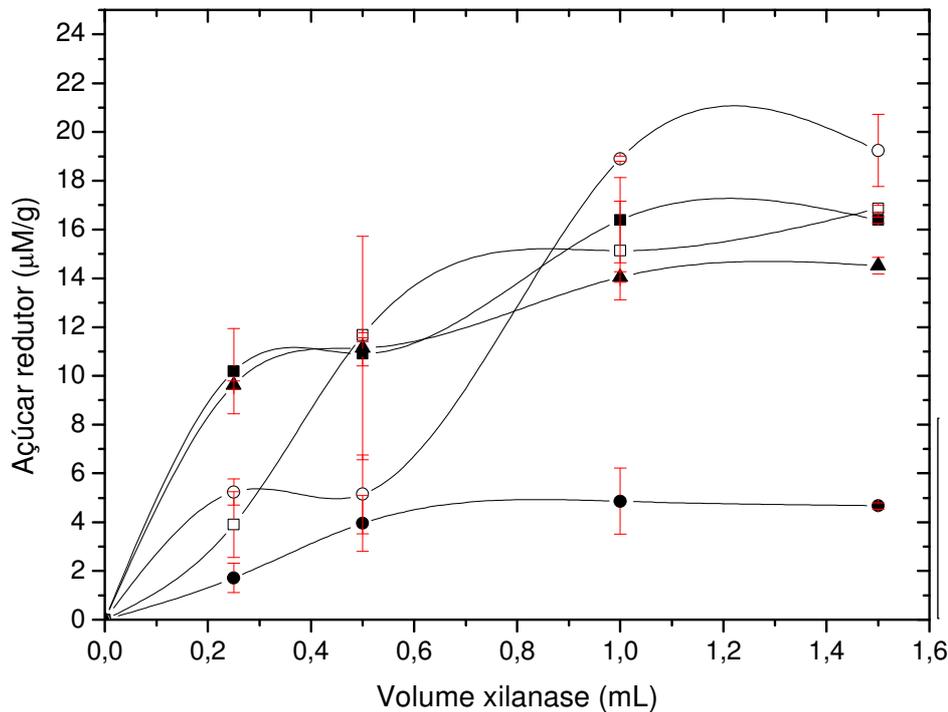
Uma maior quantidade de MM e PB são observadas nos capins do gênero *Brachiaria* o que reflete em menores valores de FDN e FDA em aproximadamente 20% quando comparado às outras forrageiras. Dessa forma, podem possuir maior valor nutritivo e mais fácil acesso à hidrólise enzimática, uma vez que esse menor

valor de FDN representa também menores quantidades de lignina e de celulose. Isto pode ser comprovado ao observar a coluna LIG (%MS), a qual indica que ambos os capins *B. decumbens* e *B. brizantha* apresentaram os menores teores de lignina, ao contrário do capim Tanzânia o qual apresentou grande quantidade, sendo cerca de 60% maior que nos capins do gênero *Brachiaria* e 38% maior quando comparado ao Tifton-85 (que possuiu o segundo maior teor de lignina), e as colunas H (%MS) e C (%MS) que apresentaram maiores valores de celulose e para Tifton-85 e Tanzânia, porém menor valor de hemicelulose para Tanzânia, como esperado.

Dessa forma, pode-se considerar a suposição de que os capins do gênero *Brachiaria* apresentam, em sua parede celular, a hemicelulose melhor exposta de forma que a enzima tenha mais fácil acesso à hidrólise. Outros fatores que também podem ser levados em consideração na hidrólise são a área superficial e a presença de cutícula nas gramíneas.

#### **4.8.3 Efeito da hidrólise enzimática utilizando capim seco e processado como substrato**

Nesta etapa do trabalho foram utilizadas as forrageiras processadas de acordo com a metodologia de Van Soest (1994). Resumidamente, nesse tratamento as amostras de capim foram secas a 65°C para retirada parcial da água e trituradas a 1 mm em moinho Willey. Dessa forma, diferentes volumes do preparado enzimático foram acrescentados às amostras de capim processadas juntamente com tampão adequado (pH 4,0), obtendo um volume final fixo, da mesma forma que descrito em Material e Métodos (3.8.1), sendo em seguida, medida a liberação de açúcares redutores em  $\mu\text{M/g}$  (Figura 37).

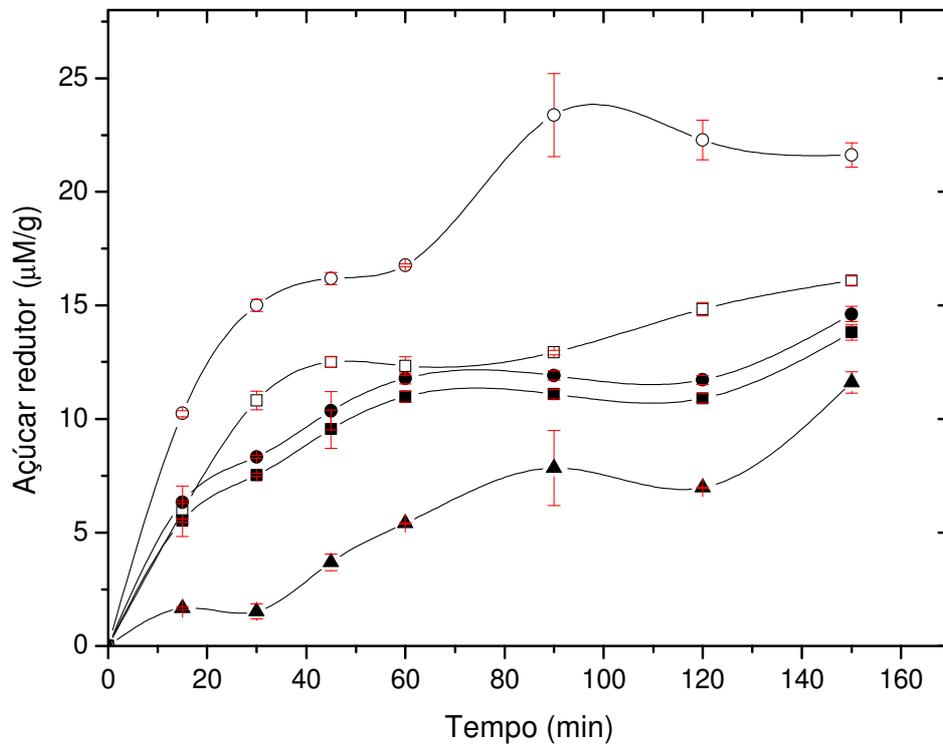


**Figura 37** – Efeito da hidrólise enzimática em diferentes forrageiras processadas utilizando diferentes volumes de extrato bruto. Símbolos: (■) *B. brizantha*; (□) Tifton-85; (●) Tanzânia; (○) *B. decumbens* e (▲) silagem de milho.

Observou-se pelo resultado da Figura 37 que todas as forrageiras testadas foram melhores degradadas conforme aumento da concentração de extrato bruto, exceto no Tanzânia que apresentou máxima liberação de açúcar redutor com 1,0 mL de extrato bruto e 1,0 mL de tampão. A melhor resposta de hidrólise obtida foi no *B. decumbens* e *B. brizantha* (com 1,0 mL de extrato), confirmando o resultado do experimento anterior, apresentando uma liberação de açúcar redutor de 16,8  $\mu\text{M/g}$  e 19,2  $\mu\text{M/g}$  para *B. brizantha* e *B. decumbens*, respectivamente. O capim Tanzânia apresentou a menor liberação de açúcar redutor assim como no experimento anterior, podendo dessa forma, utilizar o mesmo raciocínio.

Os resultados obtidos nesse experimento foram muito satisfatórios e indicaram hidrólise pelo preparado de extrato bruto utilizado. Portanto, foi interessante avaliar o perfil de hidrólise enzimática utilizando a maior concentração de extrato bruto (1,5 mL)

nos mesmos capins testados anteriormente durante 150 minutos de reação (Figura 38).



**Figura 38** – Cinética enzimática durante 150 minutos utilizando diferentes forrageiras processadas como substratos. Símbolos: (□) *B. brizantha*; (■) Tifton-85; (●) Tanzânia; (○) *B. decumbens* e (▲) silagem de milho.

De acordo com os resultados obtidos, verificou-se na Figura 38 que os capins *B. decumbens* e *B. brizantha* apresentaram as melhores respostas de hidrólise enzimática, com valores de formação de açúcar redutor aproximadamente 3 e 2 vezes maiores comparados à silagem de milho em 90 minutos, a qual obteve a menor resposta. Observou-se ainda, que a quantidade de açúcar redutor aumentou com o tempo, indicando atuação enzimática, podendo ser um fator positivo ao utilizar esse extrato enzimático na alimentação de ruminantes, de forma que este libere maiores quantidades de açúcares fermentescíveis para a microbiota ruminal acarretando em um melhor aproveitamento da fração fibrosa da forragem pelo animal.

#### **4.9 Adição de enzimas fibrolíticas em ruminantes**

A partir do “pool” enzimático do extrato de *A. japonicus* Saito contendo atividades de xilanase (10,7 U/mL), CMCase (0,55 U/mL), amilase (38,6 U/mL), poligalacturonase (12,6 U/mL) e fitase (21 U/mL) foi determinada a digestibilidade *in vitro* de diferentes forrageiras utilizadas na alimentação de ruminantes.

##### **4.9.1 Avaliação da digestibilidade *in vitro* de diferentes volumosos na presença de enzimas fibrolíticas**

Esse teste de aplicabilidade biotecnológica foi realizado com o extrato bruto de *A. japonicus* e também com um segundo extrato bruto produzido por *A. niveus* contendo atividade de ligninases (manganês peroxidase, lignina peroxidase e lacase), previamente padronizado em nosso laboratório por Peixoto-Nogueira (2008) produzido por meio de fermentação em estado sólido utilizando farelo de trigo como substrato, a 45°C e com 70% de umidade relativa durante 1, 3 e 5 semanas para lacase, manganês peroxidase e lignina peroxidase, respectivamente. Assim, as enzimas foram utilizadas como aditivos em diferentes volumosos para observar se propiciava (ou não) um aumento na digestibilidade do alimento.

Assim, *A. japonicus* foi cultivado nas condições ótimas e aplicado nos experimentos *in vitro*. A composição químico-bromatológica dos alimentos testados também foram previamente determinadas (Tabela 26). Nos resultados mostrados nas Tabelas de 27 e 28, os valores estão em porcentagem (%) e correspondem à quantidade de matéria seca (MS) que foi consumida durante a digestibilidade *in vitro*.

**Tabela 26** – Composição químico-bromatológica dos alimentos avaliados (g/kg).

Item	Cana-de-açúcar	Silagem de milho	Feno Tifton-85	<i>Brachiaria decumbens</i>
Matéria seca	234,6	241,0	906,5	198,1
Matéria orgânica	952,3	929,6	945,9	902,2
Proteína bruta	31,1	60,9	138,7	110,9
Material Mineral	45,6	70,5	54,1	97,8
FDN	509,9	593,1	771,4	673,0
FDA	295,7	315,2	361,0	322,5
Hemicelulose	213,9	277,9	410,5	350,5
Celulose	246,1	247,3	308,1	295,9
Lignina	48,7	51,7	48,0	27,0
EB (Mcal/kg)	40,9	41,9	45,1	43,8

\* FDN = fibra em detergente neutro; FDA = fibra em detergente ácido; EB = energia bruta.

**Tabela 27** – Digestibilidade *in vitro* da matéria seca e da FDN (%) de diferentes volumosos na presença de extrato bruto obtido por *A. japonicus*.

Alimento	Doses de extrato (mL)				Média
	0	4	8	16	
<b>DIVMS (%)</b>					
Silagem de milho	57,45Aa	56,02Aa	58,36Aa	55,24Aa	56,77A
Feno de Tifton-85	39,59Ba	43,87Ba	46,70Ba	43,90Ba	43,52B
Cana-de-açúcar	45,86Ba	48,72ABa	47,91ABa	48,52ABa	47,75B
<i>Brachiaria</i>	59,06Aa	60,15Aa	59,61Aa	57,60Aa	59,11A
<b>Média</b>	50,49a	52,19a	53,14a	51,31a	
<b>DIVFDN (%)</b>					
Silagem de milho	33,58Ba	33,42Ba	34,20Ba	32,66Ba	33,46C
Feno de Tifton-85	35,51Ba	39,15Aa	39,05Aa	38,35Aa	38,01B
Cana-de-açúcar	12,44Ca	13,15Ca	11,06Ca	12,42Ca	12,27D
<i>Brachiaria</i>	40,04Aa	40,12Aa	40,72Aa	40,53Aa	40,35A
<b>Média</b>	30,39a	31,46a	31,26a	30,99a	

Médias seguidas da mesma letra minúscula não diferem entre si na linha e da mesma letra maiúscula não diferem entre si na coluna a 5% de probabilidade (teste de Tukey).

Apesar de estatisticamente não se observar efeito entre as doses ministradas em nenhum alimento (letras minúsculas iguais), os valores de MS e FDN indicam maior digestibilidade da MS no Tifton-85 em 15,2% ao adicionar 8 mL de enzima quando comparado ao controle, sendo também maior a digestibilidade da FDN nesse mesmo alimento (9%), o que concorda com a Tabela 26 a qual indica que esta forrageira apresenta maiores quantidades de hemicelulose e celulose em sua composição, podendo assim disponibilizar melhor esses carboidratos para hidrólise enzimática, de forma a liberar oligossacarídeos que são assimiláveis pela microbiota ruminal. Observa-se ainda que a adição de maiores volumes de extrato enzimático (16 mL) não contribuiu para o aumento da digestibilidade. Este resultado concorda com o encontrado na literatura como descrito por Jalilvand et al. (2008) e Beauchemin et al. (1997) cujos resultados com maiores concentrações também não proporcionaram aumento na digestibilidade.

Porém, através das análises estatísticas por meio do teste de Tukey ( $p > 0,05$ ), os resultados sem adição e com adição dos diferentes volumes de extrato enzimático tanto na digestibilidade da MS quanto da FDN não diferiram entre si, obtendo dessa forma a mesma letra minúscula em todas as linhas. No entanto, quando se utilizou a mesma dose nos diferentes alimentos (comparação entre as linhas de uma mesma coluna) observou-se que os alimentos capim *Brachiaria* e silagem de milho apresentaram valores de MS maiores que o Tifton-85 e a cana-de-açúcar e, na FDN a digestibilidade do *Brachiaria* foi cerca de 70% maior que em cana-de-açúcar.

A diferença entre os resultados obtidos em cada um dos alimentos deve-se provavelmente, à diferença na composição entre os diferentes alimentos testados.

**Tabela 28** – Digestibilidade *in vitro* da matéria seca e da FDN (%) de diferentes volumosos na presença de extrato de ligninases obtidas por *A. niveus*.

Alimento	Doses de ligninases (mL)				Média
	0	4	8	16	
<b>DIVMS (%)</b>					
Silagem de milho	51,12ABa	54,23Aa	54,72Aa	44,87Aa	51,23A
Feno de Tifton-85	39,27Ba	40,87Aa	41,14Aa	43,54Aa	41,20B
Cana-de-açúcar	48,97ABa	49,29Aa	49,94Aa	45,55Aa	48,44A
<i>Brachiaria</i>	57,36Aa	56,33Aa	54,66Aa	45,32Aa	53,42A
<b>Média</b>	49,18a	50,18a	50,11a	44,81a	
<b>DIVFDN (%)</b>					
Silagem de milho	23,54Aa	32,93Aa	31,16ABa	27,02ABa	28,66B
Feno de Tifton-85	31,99Aa	35,20Aa	36,08Aa	35,58Aa	34,71AB
Cana-de-açúcar	11,86Ba	13,68Ba	14,43Ba	15,21Ba	13,80C
<i>Brachiaria</i>	37,58Aa	37,44Aa	30,47ABa	37,80Aa	35,82A
<b>Média</b>	26,24a	29,81a	28,03a	28,90a	

Médias seguidas da mesma letra minúscula não diferem entre si na linha e da mesma letra maiúscula não diferem entre si na coluna a 5% de probabilidade (teste de Tukey).

Na Tabela 28, também não foi observado aumento significativo estatisticamente da digestibilidade da MS e FDN e, da mesma forma, observou-se diferença entre os volumosos. Na digestibilidade da MS o melhor resultado foi encontrado na degradação da silagem de milho, obtendo valor de digestibilidade 6,5% maior quando adicionado 8 mL de extrato comparado ao controle. Na digestibilidade da FDN observou-se diferença entre os volumosos sendo que apenas a cana-de-açúcar se diferenciou dos demais.

#### **4.9.2 Avaliação da atividade enzimática na degradação *in vitro* através da produção de gás**

Visando ainda verificar o efeito do extrato enzimático de *A. japonicus* na digestibilidade de volumosos, foi realizado outro experimento de digestibilidade *in vitro* Com produção de gás. Visto que o tempo de produção das ligninases é bastante elevado (mais de uma semana) e diferente para cada uma delas e, lembrando que a quantidade de enzima requerida para esses experimentos é grande, neste estudo não foi testado o extrato de *A. niveus* contendo ligninases.

As condições para a digestão dos volumosos corresponderam às mesmas utilizadas no experimento descrito anteriormente, entretanto a concentração de enzima foi variada em 4 e 8 mL, uma vez que o resultado com 16 mL no experimento anterior não foi viável. Analisaram-se também as quantidades totais de gases produzidas em consequência da digestão dos alimentos. Os dados referentes à produção de gases foram convertidos em mL/gMS. Nos tempos de 24, 48 e 72 horas foram calculadas a digestibilidade *in vitro* da matéria orgânica (DIVMO) e a quantidade de nutrientes digestíveis totais (NDT), apresentados nas Tabelas de 29 e 30, a partir de valores previamente obtidos de proteína bruta, cinzas e energia digestível dos alimentos testados.

Os dados referentes à produção de gases em 72 horas apresentaram valores maiores que 100 sendo, portanto, desconsiderados.

**Tabela 29** – Porcentagem de DIVMO dos diferentes volumosos testados na produção de gás na ausência e presença de extrato bruto em 24 e 48 horas.

<b>Alimento</b>				
<b>24 h</b>	<b>Doses de extrato (mL)</b>			<b>Média</b>
	<b>0</b>	<b>4</b>	<b>8</b>	
<i>Brachiaria</i>	54,52Ab	60,79Aba	66,30ABa	60,53B
Cana-de-açúcar	66,26Aa	71,29Aa	73,96Aa	70,50A
Feno de Tifton-85	54,73Aa	58,23Ba	61,31Ba	58,09B
<b>Média</b>	58,50b	63,44ab	67,19a	
<b>48 h</b>				
<i>Brachiaria</i>	82,22Aa	90,43Aa	95,88Aa	89,51A
Cana-de-açúcar	82,80Ab	94,74Aab	98,20Aa	91,91A
Feno de Tifton-85	84,33Aa	90,57Aa	91,91Aa	88,93A
<b>Média</b>	83,11b	91,91 <sup>a</sup>	95,33a	

Médias seguidas da mesma letra minúscula não diferem entre si na linha e da mesma letra maiúscula não diferem entre si na coluna a 5% de probabilidade (teste de Tukey).

**Tabela 30** – Porcentagem de NDT dos diferentes volumosos testados na produção de gás na ausência e presença de extrato bruto em 24 e 48 horas.

<b>Alimento</b>				
<b>24 h</b>	<b>Doses de extrato (mL)</b>			<b>Média</b>
	<b>0</b>	<b>4</b>	<b>8</b>	
<i>Brachiaria</i>	47,33Bb	53,68Ba	59,25ABa	53,42B
Cana-de-açúcar	63,26Aa	68,35Aa	71,05Aa	67,55A
Feno de Tifton-85	50,21Ba	53,75Ba	56,86Ba	53,60B
<b>Média</b>	53,60b	58,59ab	62,39a	
<b>48 h</b>				
<i>Brachiaria</i>	75,34Aa	83,65Aa	89,16Aa	82,72B
Cana-de-açúcar	79,99Ab	92,07Aab	95,57Aa	89,21A
Feno de Tifton-85	80,13Aa	86,45Aa	87,80Aa	84,80AB
<b>Média</b>	78,49b	87,39a	90,85a	

Médias seguidas da mesma letra minúscula não diferem entre si na linha e da mesma letra maiúscula não diferem entre si na coluna a 5% de probabilidade (teste de Tukey).

De acordo com os resultados, no período de 24 horas, não se observou diferença estatisticamente significativa entre as doses ministradas, exceto para o capim *Brachiaria* que apresentou aumento considerável na DIVMO e NDT quando se adicionou o extrato comparado ao controle. Ao contrario, a linha que representa a média entre os alimentos nas respectivas doses indica que a presença de extrato aumentou a digestibilidade de maneira geral e, por conseqüência, a produção de gases nesse tempo. Analisando os três alimentos testados, a cana-de-açúcar se destacou em 48 horas por apresentar as maiores diferenças de porcentagens de DIVMO e NDT (15,7% e 16,3%, respectivamente) entre a dose de 8 mL e o controle, se diferenciando dos outros alimentos, entretanto em 24 horas o capim *Brachiaria* indicou diferenças em cerca de 7% e 10% maiores comparados aos outros alimentos para DIVMO e NDT, respectivamente.

Com relação às doses no tempo de 48 horas verificou-se que o alimento cana-de-açúcar apresentou diferença significativa estatisticamente pelo teste de Tukey, apresentando valores de  $p$  menores que 0,05. Dessa forma, indicou que a presença de enzimas atuou de forma a aumentar a digestibilidade da matéria orgânica e contribuiu para um maior valor de nutriente digestível. Vale ainda ressaltar, que os valores entre as doses de extrato bruto não se diferenciaram entre si, podendo utilizar o menor volume com vistas a elevar a digestibilidade.

Este resultado foi bastante interessante uma vez que o estado de São Paulo é o principal produtor de cana-de-açúcar (em torno de 60% de toda a produção), segundo a UNICA (União da Agroindústria Canavieira de São Paulo), assim sua utilização como alimento para ruminantes em conjunto com o extrato bruto de *A. japonicus* testado, contribui para um aumento na quantidade de açúcares fermentescíveis no rúmen do animal, favorecendo a proliferação da microbiota ruminal a qual, conseqüentemente, libera maior quantidade de enzimas fibrolíticas que auxiliam na digestão fazendo com que o animal tenha maior velocidade de digestão, absorva melhor os nutrientes e apresente menor gasto energético.

Analisando os resultados obtidos na produção de gás nos diferentes alimentos (Tabela 31) pode-se verificar que durante a fermentação, as análises estatísticas indicaram excelente atuação do extrato bruto a partir de 24 horas de incubação.

Comparando os três alimentos nos tempos de 24 e 48 horas, verificou-se que a produção de gás no capim *Brachiaria* foi mais expressiva que nos outros dois alimentos em 24 horas, apresentando um aumento de 29,4% na dose de 8 mL em relação ao controle e, em 48 horas tanto a cana-de-açúcar quanto o capim *Brachiaria* apresentaram cerca de 19% de aumento na produção de gás utilizando a dose de 8 mL comparada ao controle, enquanto que o feno apresentou os menores aumentos de produção.

Contudo, as análises estatísticas realizadas nestes dados de produção de gás, indicaram que a diferença entre as doses e o controle foi significativa a 5% de significância, de acordo com teste de Tukey, a partir de 36 horas mostrando atuação do extrato enzimático, principalmente ao se utilizar a maior dose (8 mL) nas amostras de cana-de-açúcar e *Brachiaria*. Para a cana-de-açúcar os resultados foram bastante expressivos, uma vez que de 36 a 60 horas de incubação a adição de enzima foi eficaz promovendo um aumento na digestibilidade em relação ao controle em 19-25% utilizando a maior dose. Para as outras amostras testadas também houve significância estatística, porém na amostra Tifton-85 foi pronunciada apenas em 60 horas.

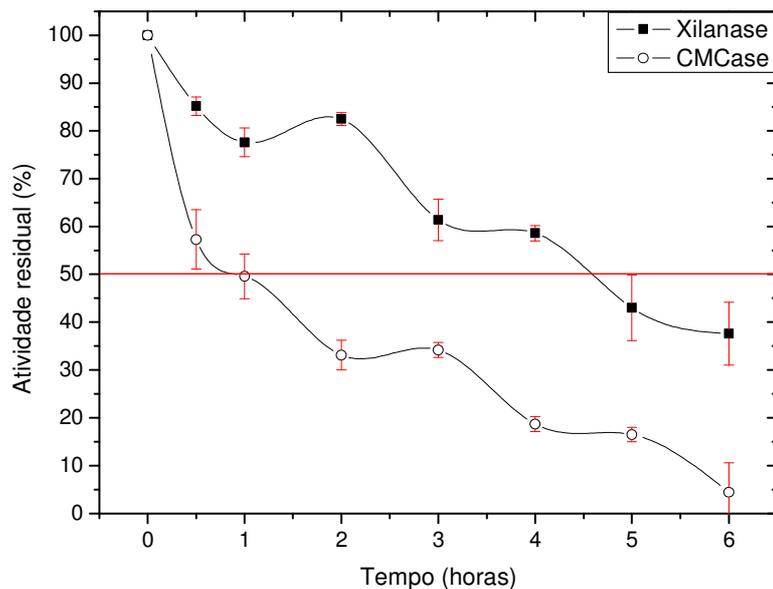
**Tabela 31** – Produção de gases (mL/g MS) durante a digestão *in vitro* de forrageiras em diferentes dosagens enzimáticas de 6 a 60 horas de incubação.

<b>Cana-de-açúcar</b>						
<b>Dose</b>	<b>Horas após incubação</b>					
	<b>6</b>	<b>12</b>	<b>24</b>	<b>36</b>	<b>48</b>	<b>60</b>
0 mL	20,1 d A	36,7 c A	52,9 b A	60,0 b B	71,5 a B	81,3 a B
4 mL	21,8 e A	36,9 d A	58,5 c A	69,7 b A	84,9 a AB	93,4 a AB
8 mL	20,7 f A	36,9 e A	61,5 d A	71,8 c A	88,8 b A	101,8 a A
<b>Tifton-85</b>						
	<b>Horas após incubação</b>					
	<b>6</b>	<b>12</b>	<b>24</b>	<b>36</b>	<b>48</b>	<b>60</b>
0 mL	17,1 e A	24,1 d A	33,9 c A	45,4 b A	67,1 a A	81,4 a B
4 mL	18,1 e A	25,5 d A	37,8 c A	50,4 b A	74,2 a A	94,5 a A
8 mL	17,7 e A	25,7 d A	41,2 c A	53,4 b A	75,7 a A	89,6 a AB
<b>Brachiaria</b>						
	<b>Horas após incubação</b>					
	<b>6</b>	<b>12</b>	<b>24</b>	<b>36</b>	<b>48</b>	<b>60</b>
0 mL	11,7 e A	21,1 d A	31,8 c A	45,6 b B	63,0 a B	63,3 a B
4 mL	16,0 e A	25,5 d A	38,9 c A	53,1 b AB	72,2 a AB	87,1 a A
8 mL	17,9 e A	28,5 d A	45,1 c A	59,4 b A	78,4 a A	89,3 a A

Médias seguidas da mesma letra minúscula não diferem entre si na linha e da mesma letra maiúscula não diferem entre si na coluna a 5% de probabilidade (teste de Tukey).

#### 4.9.3 Avaliação da atividade enzimática *in vivo* no fluido ruminal de cabras

Embora os resultados obtidos nos testes *in vitro* realizados anteriormente terem sido bastante promissores, no rúmen há um fluxo constante de matéria. Dessa forma, foi necessário verificar se a atividade enzimática persistia às condições “adversas” no fluido ruminal dos caprinos. Inicialmente foi testada a estabilidade enzimática no fluido coletado de cabras antes da alimentação e da adição do extrato (Figura 39).



**Figura 39** – Estabilidade da xilanase e CMCases em fluido ruminal coletado de cabra durante 6 horas a 40°C.

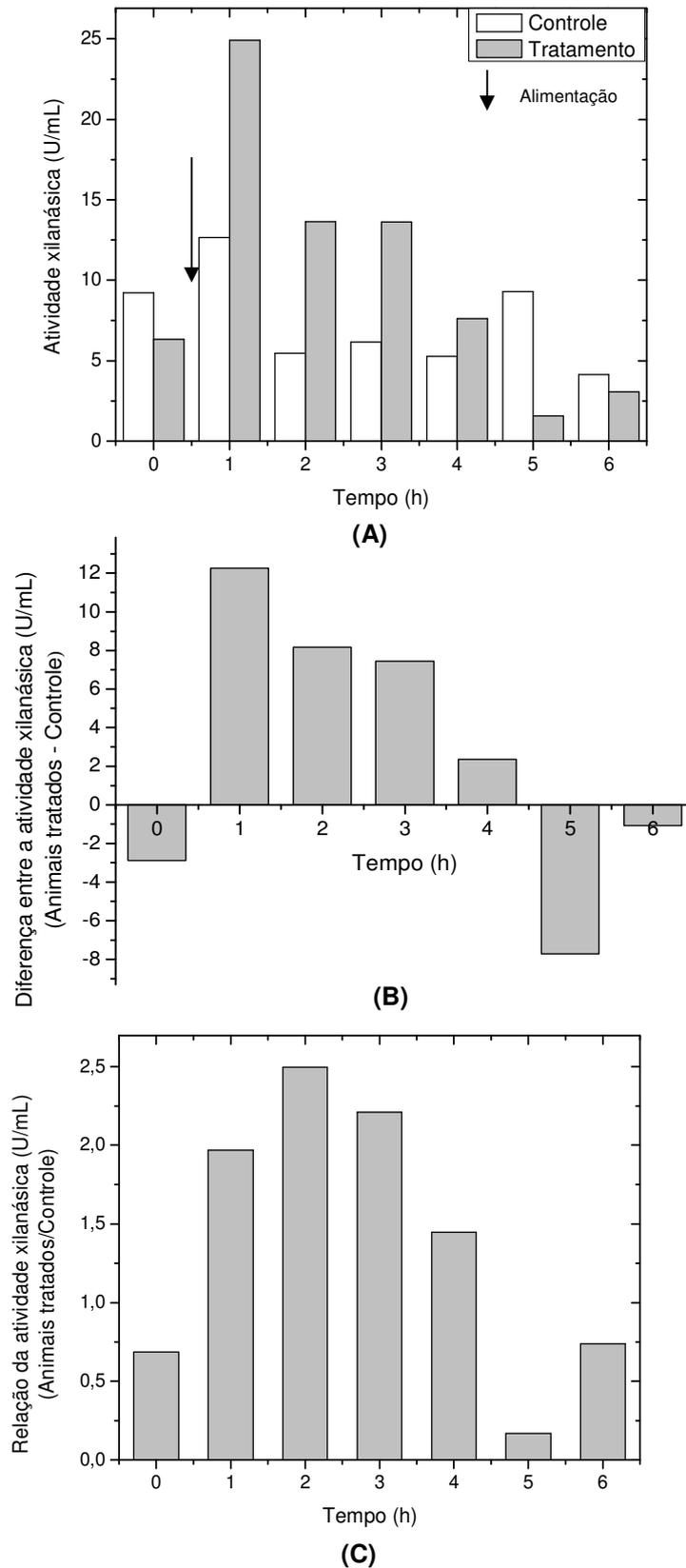
A análise da Figura 39 indicou que até o período de 4 horas a atividade de xilanase permaneceu acima de 50%, enquanto que a CMCase, após 1 hora em contato com o fluido, perdeu mais de 50% de sua atividade e, chegou a desaparecer em 6 horas de incubação. Desse modo, concluiu-se que a CMCase não foi estável neste meio podendo ter sido inibida devido a presença de alguma substância liberada pelos próprios microrganismos do rúmen ou por algum íon presente, ou até mesmo por sua diluição nesse meio, a qual pode ter reduzido sua atividade.

No experimento *in vivo* (Figura 40), não foi verificada atividade de CMCase, mas foi observada excelente atividade de xilanase, a qual pode ser atribuída a xilanase adicionada mais aquela produzida pela microbiota ruminal.

Na Figura 40 A, observou-se que a quantidade de xilanase nos animais tratados com a enzima foi maior do que nos animais não tratados durante a maior parte do experimento. Após quatro horas de tratamento, as quantidades de xilanase daqueles que não receberam a enzima atingiram níveis maiores à dos animais tratados. Assim, os níveis enzimáticos dos animais tratados decaíram em 5 horas de experimento, enquanto que dos não tratados aumentou. O mesmo quadro pode ser observado, quando foi feita a diferença entre os níveis da enzima presentes nos animais tratados e não tratados (Figura 40 B) ou quando foi feita uma relação entre os níveis de xilanase presentes nos animais tratados e não tratados com xilanase (Figura 40 C).

Ao iniciar o experimento, os animais que seriam tratados receberam o extrato de *A. japonicus* o que pode justificar a elevada atividade de xilanase na primeira hora do experimento mesmo com a alimentação fornecida às cabras, e com diluição da enzima no rúmen. Observou-se ainda, que durante as três primeiras horas a atividade de xilanase nos animais tratados foi cerca de duas vezes maior que nos animais não tratados.

Contudo, a Figura 40 nos mostra que a xilanase adicionada foi estável no ambiente ruminal durante apenas 4 horas de experimento, sendo que após este período a atividade de xilanase nos animais não tratados se aproximou dos tratados. Dessa forma, se este extrato for continuamente adicionado na alimentação, ocasionará aumento da digestibilidade. Tal prática pode ser efetuada, mediante a aplicação da enzima no alimento, garantindo assim o fornecimento contínuo da enzima, juntamente com o alimento volumoso (forragem) e, este tipo de procedimento já tem sido realizado, principalmente em dietas de vacas leiteiras (Yang et al., 2000; GADO et al., 2009).



**Figura 40** – Desempenho de xilanases em rúmen de caprinos. **(A)** Atividade xilanásica em animais tratados e não tratados com extrato; **(B)** Diferença entre a atividade nos rúmens de caprinos tratados e não tratados; **(C)** Relação entre a atividade de xilanase nos rúmens de caprinos tratados e não tratados.

## *5. DISCUSSÃO*

As enzimas funcionam como catalisadores de reações químicas entre as células e fora delas. São especialmente interessantes na exploração industrial de fontes naturais renováveis e ainda apresentam uma vantagem sobre processos químicos, sendo mais seguras para o meio ambiente, mais específicas e fáceis de serem controladas (FAGERSTRÖM, 1995). Uma das fontes mais utilizadas pelas indústrias para a obtenção de enzimas são os microrganismos, isto ocorre em decorrência do desenvolvimento da microbiologia, que levou a elucidação dos mecanismos de produção e secreção enzimáticas, especialmente em fungos (DEMAIN, 2000).

Microrganismos são cada vez mais empregados como agentes biotecnológicos capazes de sintetizar compostos de interesse, assim como alguns fungos filamentosos que têm demonstrado secretar grandes quantidades de proteínas no meio de crescimento (MISHRA e MAHESHWARI, 1996). Os fungos estão, portanto, atraindo crescente atenção como fonte de enzimas para conversões industriais (PANDEY et al., 2000a).

Neste sentido, a bioprospecção de fungos filamentosos, além de explorar a microbiota do estado de São Paulo, ainda é um importante mecanismo de descoberta de novas fontes enzimáticas a qual é um segmento de rápido crescimento na indústria de biotecnologia. A coleta e seleção de microrganismos produtores de xilanases e CMCases constituíram etapas importantes deste trabalho, uma vez que para se utilizarem as enzimas produzidas por uma determinada linhagem microbiana, esta deverá expressar a proteína de interesse em quantidades consideráveis. Com o objetivo de identificar novas cepas de fungos com boa produção de enzimas fibrolíticas, foram realizadas três coletas em diferentes áreas de pastagens do estado de São Paulo. Com o *screening* realizado foi possível selecionar vários organismos bons produtores, mas para este estudo foi selecionado o *Aspergillus japonicus* Saito. Este resultado vai ao encontro de outros resultados prévios publicados por nosso grupo de pesquisa, uma vez que este gênero tem se destacado como bom produtor de

enzimas do sistema xilanolítico (RIZZATTI, 2000, 2004; RIZZATTI et al., 2001, 2008; SANDRIM et al., 2005).

Diversos microrganismos têm sido estudados devido à produção de enzimas celulósicas e xilanolíticas. Dentre eles destacam-se gêneros de *Trichoderma* (atualmente com nova terminologia *Hypocrea*), como o *Trichoderma harzianum* (SILVEIRA et al., 1999) e o *Trichoderma reesei* (WEN et al., 2005); gêneros de *Aspergillus* como o *Aspergillus oryzae* (ZAWADI et al., 2008) e o *Aspergillus foetidus* (AMITA e MADMWAR, 2005) e diversos outros como *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Termoascus* (YANG et al., 2006; CHÁVEZ et al., 2006; MESHARAM et al., 2008; DA SILVA et al., 2005) etc., sendo os gêneros *Trichoderma* e *Aspergillus* os mais explorados.

Também é descrito na literatura que a espécie *A. japonicus* produz diversas enzimas como, por exemplo, a produção de pectinases (TEIXEIRA et al., 2000; SEMENOVA et al., 2003), a produção de  $\beta$ -xilosidases (WAKYIAMA et al., 2008; PEDERSEN et al., 2007), celulases (KUNDU et al., 1988) e fitases (PROMDONKOY et al., 2009).

Grandes quantidades de enzimas são requeridas em processos industriais nas quais as enzimas devem ser específicas, assim a produção enzimática deve ser maximizada, para tanto são necessários estudos de melhoramento do meio de cultivo em condições que barateiem a produção destas enzimas, o que pode ser feito através da utilização de resíduos agroindustriais de forma que aumente a atividade enzimática com finalidade de produção industrial em larga escala para aplicação biotecnológica como, por exemplo, é o objetivo deste trabalho na aplicação em digestibilidade em ruminantes.

Após a seleção de bons produtores de xilanase, iniciaram os estudos de padronização das condições de cultivo visando aumentar os níveis enzimáticos, uma vez que a demanda do mercado exige a obtenção de grandes quantidades de enzima. No processo de padronização e otimização do meio de cultivo, além da escolha do

meio, vários outros parâmetros devem ser considerados, como densidade de inóculo, espécie e concentração da fonte de carbono e nitrogênio, pH inicial, etc. O primeiro passo para tais estudos de melhoramento foi durante a seleção da cepa melhor produtora de enzimas fibrolíticas de interesse, onde foi variado o meio líquido na fermentação submersa, o qual selecionou o fungo *A. japonicus* e, como melhor meio líquido, o denominado de SR (RIZZATI et al., 2001).

As atividades microbianas são intensamente afetadas pelas condições químicas e físicas de seus ambientes. O entendimento das influências ambientais ajuda a explicar a distribuição dos microrganismos na natureza, tornando possível o desenvolvimento de métodos para o controle ou a otimização das atividades microbianas. Quatro fatores importantes foram identificados por desempenharem papéis no controle do crescimento microbiano: temperatura, pH, disponibilidade de água e oxigênio (MADIGAN et al., 2003).

A temperatura é um dos fatores ambientais mais importantes que afetam o crescimento e a sobrevivência dos microrganismos. Cada organismo apresenta uma temperatura mínima, abaixo da qual é incapaz de crescer, uma temperatura ótima, em que o crescimento ocorre rapidamente, e uma temperatura máxima, acima da qual ocorre a morte microbiana. A temperatura ótima de crescimento de um organismo sempre se encontra mais próxima da temperatura máxima do que da temperatura mínima (MADIGAN et al., 2003).

Os microrganismos são classificados de acordo com sua temperatura de crescimento: psicrófilos (baixas temperaturas), mesófilos (temperaturas medianas), termófilos (altas temperaturas) e hipertermófilos (temperaturas muito elevadas) (MADIGAN et al., 2003).

Nesse sentido, o efeito da temperatura de cultivo sobre a síntese de xilanase e celulase e o crescimento micelial do fungo *A. japonicus* foi estudado incubando-se o microrganismo de 25 a 50°C. Nas placas com meio sólido de PDA, houve crescimento em temperaturas entre 25 e 40°C e, como a 50°C não houve desenvolvimento micelial

do fungo, nos próximos experimentos com as fermentações, a temperatura foi variada apenas de 25 a 45°C. Foi possível, dessa forma, observar que a melhor temperatura de crescimento e produção foi 30°C.

Esse resultado condiz com o descrito na literatura, na qual o gênero *A. japonicus* produz maiores atividades enzimáticas em temperatura ambiente, como por exemplo, podemos citar a produção de pectinases segundo TEIXEIRA et al. (2000) utilizando temperatura de crescimento a 30°C, e a produção de  $\beta$ -xilosidase segundo WAKYIAMA et al. (2008), também utilizando 30°C. E ainda, outros autores como BINUPRIYA et al. (2006) e KUNDU et al. (1988) descreveram que a cepa de *A. japonicus* utilizada cresciam a temperatura ambiente (27°C e 28°C).

O estabelecimento de uma temperatura ótima de cultivo na produção de enzimas por microrganismos é prática rotineira neste tipo de estudo e a temperatura ideal está evidentemente relacionada às características de cada microrganismo. Assim, correlacionando a temperatura com o local de coleta, pode dizer que o fungo isolado de solo possui temperatura ótima de crescimento próxima à temperatura ambiente, sendo considerado um microrganismo mesofílico segundo MADIGAN et al. (2003).

A possibilidade de utilizar resíduos agroindustriais para a produção enzimática como fonte de carbono, fornece substratos alternativos e baratos, além de contribuir na solução de problemas ambientais em relação ao descarte em que os mesmos podem causar ao meio ambiente e, por reduzir significativamente o custo de produção, resulta em uma mercadoria menos onerosa. Devido a tal importância e ao baixo custo que estes resíduos apresentam na produção enzimática, foram testados vários resíduos agroindustriais e o microrganismo escolhido foi capaz de crescer e sintetizar enzimas em muitas delas.

Dentre os resíduos estudados, o farelo de soja apresentou um maior destaque para a produção de xilanase em ambos os tipos de fermentação, onde podemos inferir que embora sua composição de hemicelulose seja menor quando comparado ao farelo

de trigo, a hemicelulose contida neste substrato pode estar melhor exposta, uma vez que o conteúdo de lignina e celulose é menor o que pode torná-la mais acessível, facilitando a ação das hemicelulases.

Em relação à produção de CMCase, na FES o farelo de trigo apresentou uma produção de cerca de 30% maior que o bagaço de cana. Neste caso, tanto o farelo de trigo em questão quanto o bagaço de cana apresentam consideráveis quantidades de celulose em sua composição. No mais, pode ser feita a mesma consideração acima para o farelo de trigo na produção de celulase, uma vez que a proporção de lignina no bagaço de cana é quatro vezes maior quando comparado ao farelo de trigo (GRAMINHA et al., 2008) assim, a celulose mesmo em grande proporção, estaria melhor exposta na parede vegetal do farelo de trigo que no do bagaço de cana, embora o bagaço possa também contribuir com a celulose disponível. Os substratos tifton-85, *Brachiaria* alta e baixa e silagem de feno apresentaram resultados parecidos para a produção de ambas as enzimas, porém, observa-se que a composição de suas paredes celulares é considerada diferente, uma vez que o Tifton-85 apresenta maior quantidade de lignina. No entanto, estes capins testados como fontes não induziram boa produção enzimática comparado aos resíduos. Já na FSm, o farelo de trigo foi considerado a melhor fonte de carbono, embora o sabugo de milho também tenha resultado em quantidades semelhantes de atividade. O mesmo raciocínio pode ser aplicado uma vez que o sabugo de milho apresenta maiores quantidades de lignina que o farelo de trigo, mas contém também maior porcentagem de celulose, assim a celulose pode estar melhor disponível em ambos os resíduos, nos indicando um resultado parecido.

A união de outra fonte de carbono em ambos os tipos de fermentação, provocou aumento da atividade de xilanase em cerca de 7% em relação ao controle (farelo de soja) na FES e de cerca de 80% na FSm, provavelmente devido a adição de sabugo de milho moído às culturas, o qual pode provocar maior aeração ao meio de cultura (PEIXOTO-NOGUEIRA et al., 2008a). Na produção de celulases, houve

aumento de aproximadamente 10% na FSm, mas em FES o aumento desta atividade não foi tão significativo. Contudo, como o bagaço de cana é um resíduo agrícola abundante na região, seria interessante produzir enzimas a partir desta fonte, assim, a mistura bagaço de cana e farelo de trigo (1:3 g/g) foi padronizada.

Estes resultados podem-se comparar com os obtidos por Peixoto-Nogueira et al. (2008a), o qual descreveu que quando se adicionou sabugo de milho ao farelo de trigo, utilizado para produção de amilases por *Rhizopus microsporus* var. *rhizopodiformis*, a atividade amilásica aumentou em cerca de 5-30% em relação ao controle utilizado.

O umedecimento do meio com soluções salinas e água foi outro importante experimento para maximização da produção da fermentação em estado sólido. Para estes experimentos, o *A. japonicus* apresentou um bom crescimento em todas as soluções testadas, obtendo aumento da produção xilanolítica para os sais Khanna e da produção celulolítica para os sais SR, provavelmente por disponibilizar nutrientes, entre eles, o nitrogênio presente nestas soluções. Portanto, as soluções de sais contribuíram significativamente para a produção enzimática, exceto no observado para os sais Vogel cuja produção de xilanase foi drasticamente diminuída, talvez devido a algum composto presente que inibe a secreção desta enzima em FES.

A fonte de nitrogênio bem como a disponibilidade deste elemento, também influencia tanto no crescimento quanto na produção enzimática do microrganismo. Em nosso laboratório foi observado que a suplementação do meio de cultura com fontes adicionais de nitrogênio poderia resultar num incremento da atividade de várias enzimas como, por exemplo, na atividade xilanolítica com a adição de nitrato de amônio no cultivo sólido com farelo de trigo descrita por SANDRIM (2005) e, na atividade lipolítica descrita por VICI (2008), com a adição de peptona.

Neste experimento, o *A. japonicus* apresentou excelente crescimento em FES quando o meio sólido foi suplementado com fontes orgânicas de nitrogênio como peptona, extrato de levedura e uréia, sendo que a peptona obteve melhores resultados

em ambas as produções enzimáticas. Dentre as inorgânicas, apenas para a produção xilanolítica foi observado um aumento em relação ao fosfato de amônio monobásico e ao acetato de amônio. Já na FSm, não foi possível determinar a melhor fonte de nitrogênio para a celulase, mas observou-se aumento de produção xilanásica quando se utilizou peptona, fosfato de amônio e extrato de levedura (componentes já presentes no meio SR utilizado).

Entretanto, como o meio líquido SR foi padronizado, houve necessidade de otimizá-lo visando analisar como a concentração dos três componentes deste meio influenciavam na atividade enzimática. Para tanto, foi indispensável realizar o design de experimentos utilizando ferramentas estatísticas. Assim, foi feito um planejamento fatorial  $2^3$ , utilizando-se três fatores em dois níveis, o qual teve a intenção de verificar os efeitos da variação da concentração de peptona, extrato de levedura e fonte de carbono sobre a produção de xilanase e celulase e se a interação entre eles causaria um efeito positivo ou negativo na produção. Através dos resultados, pode-se concluir que o uso deste planejamento experimental resultou em um aumento de aproximadamente 16,3% na produção de xilanase e 50% na de celulase sobre os valores obtidos com o meio base (SR original). Assim, foi padronizado um novo meio de cultivo líquido para produção de ambas as enzimas, utilizando as concentrações otimizadas estatisticamente.

Análises estatísticas para otimização de meios de cultura para produção enzimática tem sido intensamente utilizadas nos últimos anos, como verificado em alguns trabalhos como Berlin et al. (2007) para produção de enzimas lignocelulolíticas pela cepa de *Trichoderma reesei*; Rispoli e Shah, (2008) para produção de cutinase por *Colleotrichum lindemuthianum*, Damasso et al. (2002) ou Alam et al. (2008) para produção de celulase por *Termomyces lanuginosus* e por *Trichoderma harzianum*, respectivamente, entre outras.

O tempo durante o qual um microrganismo permanece incubado influencia fortemente em sua produção enzimática, uma vez que a incubação por um período curto pode não resultar na produção máxima de que o microrganismo é capaz.

Analisando os resultados referentes ao tempo de cultivo para FES foi possível verificar que o fungo *A. japonicus* apresentou fácil adaptação ao meio, observando-se uma fase lag curta, já a fase logarítmica foi bem definida iniciando por volta de um ou dois dias, nessa fase o microrganismos teria necessidade de recursos prontamente assimiláveis garantindo assim, sua sobrevivência, o que pode ser verificado no pico de atividade obtido em 3 e 6 dias. Após 3 (xilanase) e 7 (celulase) dias foi observado um declínio no crescimento talvez devido à escassez de nutrientes, também por excesso de compostos excretados ao meio e por ação de proteases.

Em FES, o fungo obteve melhor produção para xilanase em 3 dias e para celulase em 6 dias. Este tempo de produção condiz com a Figura 2, que mostra a composição da parede celular vegetal, onde a hemicelulose está sobreposta à celulose. Assim é necessário que, primeiramente o microrganismo produza xilanase de forma a degradar a hemicelulose a qual recobre as fibras de celulose, para então produzir celulases que passem a degradar as fibras de celulose, entretanto, o tempo de cultivo apresentado pelo *A. japonicus* concorda com a ordem de degradação da parede celular, apresentando assim, tempos diferentes para a xilanase e celulase.

Na FSm, também é observado uma fase de adaptação curta, em torno de 3 dias para ambas as enzimas, porém quando o fungo é submetido a um estado estacionário, observa-se um comportamento diferente em relação ao crescimento. A produção enzimática em estado estacionário foi melhor durante 6 dias para a xilanase e 5 dias para a celulase obtendo também uma atividade enzimática maior que quando sob agitação. Na literatura são encontrados tempos de cultivo de 96 horas para CMCase em meio sólido com forragem de milho pelo fungo *Aspergillus terreus* segundo Gao et al. (2008), também de 96 horas para xilanase em meio sólido com sabugo de milho segundo Shah e Madamwar (2005) com o fungo *Aspergillus foetidus*,

e 144 horas para Panagiotou et al. (2005), utilizando forragem de milho com o fungo *Fusarium oxysporum*.

Uma surpreendente propriedade dos microrganismos é sua capacidade de se adaptar a ambientes extremos, como em diferentes pHs. Assim, verificou-se que o pH inicial do meio influencia negativamente na produção de celulase e xilanase em pHs extremos, ao contrário do observado por Gao et al. (2008), cuja celulase produzida por *A. terreus* tem seu nível máximo de produção em pH 2. Em relação ao crescimento, este foi prejudicado em condições levemente ácidas. Em contrapartida, para o crescimento de *Rhizomucor pusillus*, segundo Silva et al. (2006) o valor ótimo ficou em torno do pH 4,0, sendo que para produção enzimática ficou em torno de pH 6,0. Estes resultados reforçam a hipótese de aplicação industrial da xilanase e celulase em digestibilidade bovina, uma vez que o rúmem possui em pH ligeiramente ácido e o *A. japonicus* pode produzir enzimas com tolerância a estes ambientes.

A densidade de conídios no inóculo mostra-se muito importante, uma vez que uma maior quantidade de esporos viáveis inoculados poderia levar a um aumento na massa micelial. Assim, tanto em FSm quanto em FES, a contagem de conídios foi muito relevante, onde se verificou uma relação direta entre o aumento dos esporos inoculados, aumento da secreção de enzimas e aumento do crescimento. Portanto, a quantidade considerada ideal de inóculo foi de  $10^7$  conídios/mL. Comparando-se com a literatura, verificou-se que o *Paecilomyces variotii*, para produção de amilases (MICHELIN et al., 2008), necessitou de uma concentração próxima à requerida pelo *A. japonicus* para produção das enzimas  $10^6$  conídios/mL.

Foi testada também, em FSm, se a presença de Tween 80 alterava a atividade enzimática, assim como para GIESE et al. (2004) na produção de lacases. Porém o Tween 80 causou um efeito negativo na produção enzimática devido à diminuição de produção que proporcionou sua adição, significando um decréscimo de 50% para xilanase e 35% de celulase. A disponibilidade de água em FES também foi variada, obtendo melhor proporção de 1:2 (p/v) como já havia sendo utilizada. Assim, estes

experimentos não alteraram a atividade, apenas comprovaram que se estava utilizando as condições certas.

Em síntese, após a padronização e otimização das fermentações sólida e submersa foi necessária uma comparação entre as duas de forma a se obter o melhor nível enzimático para aplicação. Portanto, foram realizadas ambas as fermentações utilizando a mesma cepa e, os melhores resultados foram para a FES escolhendo-a assim para produção de celulase (CMCase) e xilanase para aplicação na digestibilidade de ruminantes.

A FES, por sua vez, acaba sendo a melhor alternativa, pois sabe-se que atualmente a demanda do mercado exige a obtenção em larga escala da enzima de interesse e que esta deverá apresentar o máximo de atividade e um preço competitivo. Assim, os estudos com enzimas produzidas a partir de fermentação sólida, além de aumentar a produção, também utilizam substratos baratos como o farelo de soja, de trigo, bagaço de cana e sabugo de milho.

Segundo dados da literatura, no cultivo em estado sólido é comum registrar maior produtividade (DILLON, 2004) em comparação ao cultivo submerso, além de reduzir os custos de produção, fator sempre considerado pelos pesquisadores da área de biotecnologia (PEIXOTO-NOGUEIRA et al., 2009; CARDELLO et al., 1994; GUIMARÃES et al., 2001; RIZZATTI et al., 2001; OOIJKAAS et al., 2000; PANDEY et al., 2000b).

O baixo custo na produção enzimática em FES deve-se a fatores como: (1) rara ocorrência de contaminação bacteriana, dispensando a aplicação de pentabióticos; (2) o volume de água utilizado é menor; (3) a técnica de cultivo é simples e por isso exige pouco investimento; (4) o gasto de energia elétrica é menor, visto que neste tipo de cultivo o fungo é mantido apenas em condição estacionária; (5) é comum a utilização de substratos baratos como resíduos agroindustriais para a produção enzimática (GAO et al., 2008; PANAGIOTOU et al., 2005; PEIXOTO-NOGUEIRA et al., 2008a). No entanto, o cultivo em substrato sólido apresenta uma

desvantagem a ser destacada: por ser um sistema bastante heterogêneo seu monitoramento é mais difícil, mas estudos para o desenvolvimento de tecnologias que superem essas dificuldades têm sido realizados.

Na tentativa de aumentar os níveis de celulases, foi realizado um *screening* de *Trichoderma*, que segundo descrito na literatura é um dos melhores produtores (DILLON, 2004), porém não houve sucesso. Todavia, foi selecionada uma cepa para testar a simbiose entre *A. japonicus* e *Trichoderma*, pois há registros na literatura de simbioses realizadas entre estas duas espécies que obtiveram sucesso na produção de xilanases e celulases (GUTIERREZ-CORREA e TENGEDY, 1997, 1998; GUTIERREZ-CORREA et al., 1999; CASTILLO et al., 1994; DUEÑAS et al., 1995). Porém, os resultados da simbiose não foram tão animadores quanto os encontrados para xilanase por GUTIERREZ-CORREA e TENGEDY (1998) em FES (412 U/g na simbiose entre *T. reesei* e *A. niger* ou 382 U/g na simbiose entre *T. reesei* e *A. phoenicis*), ou para celulase (166 U/g para endoglucanases e 19 U/g para FPase na simbiose entre *T. reesei* e *A. phoenicis*) por DUEÑAS et al. (1995). Enquanto que para a simbiose realizada com *T. reesei* e *A. japonicus* valores de xilanase menores que 127 U/g e de celulase menores que 20 U/g foram encontrados.

Em suma, segundo Biely (1985) a maioria dos organismos xilanolíticos são invariavelmente celulolíticos e, frequentemente, secretam misturas complexas de celulases e xilanases. Assim, analisando os dados obtidos pode-se concluir que o *A. japonicus* é um bom produtor de enzimas celulolíticas e xilanolíticas, além de não encontrar nenhuma referência bibliográfica a respeito de sua aplicação em nutrição animal sendo, dessa forma, utilizado para esta finalidade.

Os métodos de caracterização enzimática tornaram-se ferramentas importantes para verificar sua aplicabilidade industrial. Assim, foram determinados neste estudo parâmetros bioquímicos como tempo, temperatura e pH de reação, bem como as estabilidades térmicas e química (pH) para ambas as enzimas em estudo. Embora o *Aspergillus japonicus* seja considerado mesofílico, as temperaturas ótimas de reação

obtidas para as enzimas foram de 60°C para xilanase, similares à encontrada para outras espécies de *Aspergillus* como: *A. fischeri*, *A. kawachii*, *A. oryzae*, *A. sojae*, *A. niveus* e *A. sydowii* (BEG et al., 2001; POLIZELI et al., 2005; PEIXOTO-NOGUEIRA, 2008) e para *Fusarium oxysporum* F3 (CHRISTAKOPOULOS et al., 1996) e, 55°C para CMCase que apresentou uma temperatura menor quando comparada com a obtida por *A. terreus* descrito por Gao et al. (2008), porém similar a encontrada para *Thermoascus aurantiacus* (DA SILVA et al., 2005) e para *Humicola isolens* (HAYASHIDA e YOSHIOKA, 1980). Portanto, de acordo com as temperaturas ótimas encontradas pode-se considerar que as enzimas em estudo produzidas pelo *A. japonicus* são termotolerantes.

Quanto à termoestabilidade enzimática, a xilanase bruta apresentou-se ativa por 120 minutos de pré-incubação nas temperaturas de 30 a 60°C, mantendo cerca de 100% de sua atividade residual, corroborando com os resultados descritos por Da Silva et al. (2005) na qual a xilanase de *Thermoascus aurantiacus* manteve-se estável por 60 minutos na faixa de temperatura entre 40 e 60°C. Embora após 30 minutos a atividade residual da xilanase reduziu drasticamente nas temperaturas de 65 e 70°C, restando apenas 30% de atividade residual, após 24 horas a 30 e 40°C esta manteve 80% de sua atividade. A CMCase apresentou menor estabilidade a 30 e 40°C quando comparada à xilanase e também quando comparada à CMCase descrita por Da Silva et al. (2005), a qual manteve 100% de sua atividade até 60°C.

Outro parâmetro utilizado para caracterização enzimática é o pH no qual sua atividade é máxima. Pequenas variações no pH podem conferir comportamentos diferentes entre as proteínas, como por exemplo, o decréscimo ou aumento da atividade enzimática. O pH ótimo de ambas as enzimas estudadas no extrato bruto foi relativamente ácido, pH 4,0, com queda de atividade em escalas superiores. Este pH condiz apenas com os resultados encontrados para xilanases de *A. aculeatus*, *A. sudowii*, *A. terreus* e *A. awamori*, uma vez que para as outras espécies *Aspergillus* o pH ótimo encontrado são relativamente maiores, de 5,0 – 8,0 (POLIZELI et al., 2005).

Já o pH encontrado para a CMCase corrobora com o encontrado por Da Silva (2005), porém discorda do resultado encontrado por Gao et al. (2008), cuja celulase produzida por *A. terreus* possui pH ótimo de 2,0. É conhecido que práticas modernas de alimentação levam frequentemente o pH ruminal ao sub-ótimo para a degradação da fibra. Dado o pH ótimo das enzimas em estudo como ácido, a adição destas na alimentação podem aliviar os efeitos adversos sobre a degradação de fibra (COLOMBATTO et al., 2007).

Em relação à estabilidade ao pH, a xilanase de *A. japonicus* foi estável na faixa de pH entre 4,0 - 8,0, corroborando com outras xilanases como por exemplo a de *A. oryzae* (POLIZELI et al., 2005), *A. fischeri* (TECHAPUN et al., 2003; POLIZELI et al., 2005) e *Termomyces lanuginosus* (LI et al., 2005) que tiveram resultados de estabilidade entre 5,0 - 8,0. A CMCase produzida pelo mesmo apresentou maior estabilidade na faixa de pH entre 5,0 e 7,0, diferentemente do encontrado para a CMCase de *Termonascus aurantiascuscus* (DA SILVA et al., 2005) que foi estável em quase 100% na faixa de pH 3,0 a 8,0. Ambas as enzimas depois de estocadas em freezer diminuíram sua capacidade de atuação. A xilanase quando congelada, perdeu 44% de sua atividade após 6 meses e, a celulase quase 100%.

Na reação enzimática, alguns íons são capazes de aumentar ou diminuir a atividade de determinadas enzimas. As xilanases secretadas por *A. japonicus* foram influenciadas negativamente por NaCl, NH<sub>4</sub>Cl e KCl quando adicionados na reação. Enquanto que para a CMCase, o MnCl<sub>2</sub> aumentou 64% de sua atividade residual e, o KCl reduziu em quase 60% sua atividade. Em nosso laboratório foi observado um aumento em 85% na atividade de amilases produzidas por *A. phoenicis* quando se adicionou MnCl<sub>2</sub> e de 32% quando adicionado CaCl<sub>2</sub> (BENASSI, 2006), redução de 50% na produção de pectinases por *Paecilomyces variotii* ao adicionar Ag<sup>++</sup> a 1 mM, de 35% ao adicionar MgCl<sub>2</sub> a 10 mM e de cerca de 85% ao adicionar ZnCl<sub>2</sub> na reação enzimática (DAMASIO et al., 2009). Ainda podemos citar uma ativação de xilanases produzidas por *A. phoenicis* ao adicionar os íons Mg<sup>+2</sup>, NH<sub>4</sub><sup>+</sup> e Ca<sup>+2</sup> (RIZZATTI et al.,

2001) e por fim, foi verificado também aumento na atividade de poligalacturonase produzida por *A. niveus* na presença de EDTA (10%) e de  $MnCl_2$  (16%) a 1 mM (MALLER, 2008). Outros autores como Fengxia et al. (2008) verificou ativação na atividade xilanásica de *A. ficuum* quando adicionado  $Cu^{+2}$  e inibição por  $Hg^{+2}$  e  $Pb^{+2}$ .

A especificidade enzimática por diferentes substratos é outro aspecto interessante de se conhecer, de forma a verificar a atuação da enzima. Assim, a xilanase foi específica ao substrato xilana, sendo que a xilana Birchwood (previamente utilizada como substrato) apresentou melhor resultado. A xilana de eucalipto e Oat spelt obtiveram respostas mais baixas, fato este que pode ser atribuído às diferentes quantidades de ramificações e grupos presentes nas mesmas. Rizzatti (2004) testou ou mesmos substratos xilanólítico para as xilanases do fungo *A. phoenicis* e obteve como melhor resultado a xilana Larchwood.

A última etapa deste trabalho consistiu na aplicação das enzimas em estudo na digestibilidade de ruminantes. A aplicação de xilanases iniciou na década de 80, primeiramente em rações animais, seguida pela adição em produtos na alimentação de humanos e, posteriormente, em indústrias têxteis e papelreira. Atualmente, a demanda do mercado por enzimas mais estáveis, com notáveis características de aplicações biotecnológicas tem crescido rapidamente. A utilização de enzimas como xilanase e celulasas em ração de ruminantes já têm sido comercialmente realizadas, entretanto, estudos como este, onde se padroniza a produção destas enzimas de modo a torná-las mais acessíveis e com baixo custo (utilizando-se resíduos agroindustriais), seguindo-se com testes de aplicação industriais, são de suma importância. Ademais, cumpre destacar que a maioria das enzimas usadas em ração de ruminantes são importadas e de custo elevado. Testes como os apresentados neste trabalho são muito interessantes e ainda estão em fase de desenvolvimento e adaptação para as forrageiras tropicais, uma vez que grande parte dos experimentos utilizando enzimas em ração tem sido desenvolvida em países de clima temperado, como EUA e Canadá.

O uso de enzimas fibrolíticas é uma maneira atraente de se melhorar o aproveitamento nutricional de volumosos como a palha de arroz, bem como o das forrageiras de clima tropical. Ademais, com o desenvolvimento de pesquisas nesta área, espera-se que o preço dessas enzimas, em escala industrial, seja acessível devido aos recentes avanços na tecnologia de fermentação e sistemas alternativos de produção da enzima (BEAUCHEMIN et al., 2003).

A eficácia de enzimas fibrolíticas é devida à hidrólise melhorada da fibra, o que frequentemente aumenta a digestibilidade (DE HAAN et al., 2007; DEGHAN-BANADAKY et al., 2007) e cede mais energia metabolizável para os ruminantes (TITI e TABBAA, 2004). Ainda, estas trabalham em sinergia com as enzimas endógenas microbianas do rúmen hidrolisando a parede celular da planta, aumentando a digestão dos carboidratos estruturais e a degradação de material da planta no intestino do ruminante sendo benéfica ao equilíbrio total de energia no animal, podendo até reduzir a necessidade de suplementação na alimentação (NSEREKO et al., 2000; HAINZE et al., 2003; EUN e BEAUCHEMIN, 2007a; KRUEGER e ADESOGAN, 2008; MURRAY et al., 2007).

Inicialmente, para viabilizar a aplicação do extrato enzimático produzido por *A. japonicus* foram realizados testes de citotoxicidade, os quais não indicaram efeitos deletérios, podendo ser utilizados para aplicação nos ruminantes.

Nos experimentos seguintes de hidrólise das forrageiras, observou-se que as duas espécies do gênero *Brachiaria* se destacaram, apresentando liberação de maior quantidade de açúcar redutor, enquanto àquelas que continham maiores valores de lignina em sua composição, indicaram menor liberação, sugerindo que a lignina possa dificultar a hidrólise enzimática das cadeias de xilana e celulose.

É importante frisar que, quanto maior a quantidade de lignina presente em um alimento volumoso (forragem), menor será o aproveitamento dos seus nutrientes, entretanto não é apenas a quantidade de lignina que influencia na digestibilidade de um alimento, mas também seu arranjo (JUNG, 1989).

Os resultados encontrados quando se simulou o pastejo animal, utilizando os capins sem pré-tratamento, mostraram que o extrato enzimático pode melhorar as condições do alimento aumentando a hidrólise total da fibra consumida pelos ruminantes. Embora o pré-tratamento químico, tenha muitas vezes o propósito de separar a lignina e hemicelulose da celulose, reduzir a cristalinidade da celulose e aumentar a porosidade do material lignocelulósico, favorecendo a hidrólise enzimática (KUO e LEE, 2009), este por sua vez, não é viável quando o material vegetal é utilizado na alimentação de ruminantes, pois os pré-tratamentos a base de peróxido de hidrogênio (MARTÍN et al., 2007; CHEN et al., 2008b), ácido sulfúrico (GUO et al., 2008; KUMAR, 2009), ácido fosfórico (JEIHANIPOUR e TAHERZADEH, 2009), HCl (SUN e CHENG, 2002), amônia e hidróxido de sódio (DEAN et al., 2008; SUBRAMANIAN et al., 2008; ROTH et al., 2009) entre outros, geram resíduos tóxicos que podem prejudicar a saúde do animal em questão. Por isso a busca por enzimas fibrolíticas que apresentam bons índices de hidrólise, sem que haja a necessidade de um pré-tratamento pode ser um caminho promissor e vantajoso na área de nutrição animal.

Alguns estudos têm sido realizados no Brasil como Pirota (2009) que avaliou o preparado enzimático dos fungos *T. indicae-seudaticae*, *T. lanuginosus* TO-03 e *T. lanuginosus* ROB na hidrólise do capim *Brachiaria decumbens* sem pré-tratamento durante 8 horas e obteve bons resultados às 6 horas para *T. lanuginosus* TO-03.

No entanto, quando se utilizou o capim de maneira processada (1 mm), a área superficial de contato entre enzima-substrato aumentou de tal forma que a resposta de hidrólise foi cerca de 45 vezes maior quando comparado ao capim não processado. Este resultado indica uma apreciável atuação do extrato enzimático na hidrólise das fibras de forrageiras, podendo dessa forma, melhorar o aproveitamento nutricional do alimento pelo ruminante, principalmente para *B. decumbens* e *B. brizantha*.

Nos estudos de digestibilidade *in vitro* realizado em duas etapas segundo Tilley e Terry (1963), foram testados diferentes volumosos (cana-de-açúcar, capim

*Brachiaria*, feno e silagem de milho) e analisada a FDN. O que se observou foi um significativo aumento na digestibilidade do alimento e o consumo de matéria seca foi elevado em cerca de 15% no feno e em 5,8% para a cana-de-açúcar e, a FDN teve aumento de 1,5-10% na presença de enzima. Esses resultados foram satisfatórios, pois na literatura há estudos (MARTINS, 2003) no qual esse aumento foi de no máximo 4,0% (QUEIROZ et al.,2004). Há também trabalhos cujos resultados para este tipo de teste *in vitro* foram semelhantes ou até mais promissores (COLOMBATTO et al., 2003a). No entanto, ao se analisar o resultado através de programas estatísticos verifica-se que a presença do extrato bruto no teste *in vitro* não se diferenciou significativamente do controle, mas apresentou diferença entre os volumosos. Da mesma forma, no extrato bruto contendo ligninases não foi observado aumento significativo estatisticamente da digestibilidade da MS e FDN, mas também se observou diferença entre os volumosos.

Entretanto, mesmo após o resultado das análises estatísticas podem-se considerar satisfatórios os resultados mostrados neste experimento, uma vez que a enzima exógena, utilizada na maioria dos testes descritos na literatura, foi extraída de produtos comerciais, cujo custo é geralmente elevado em comparação ao nosso produto, genuinamente nacional, e que pode ser obtido a partir do cultivo de *A. japonicus* em resíduos agroindustriais, tornando além de barato, um “pool” enzimático capaz de promover melhor a digestibilidade alcançando resultados parecidos com aqueles obtidos por produtos comerciais.

Resultados anteriores realizados em nosso laboratório com extrato bruto de *A. niveus* contendo xilanase, mostraram que houve um aumento significativo da digestibilidade do alimento em 6-33,6% na presença de enzima, porém neste teste não foram aplicadas análises estatísticas como o teste de Tukey (PEIXOTO-NOGUEIRA, 2008).

Estudos semelhantes sobre a utilização de enzimas exógenas, como aditivo em rações de ruminantes para melhorar a digestibilidade do alimento, também vêm

sendo realizados com enzimas proteolíticas (EUN e BEAUCHEMIN; 2005) ou com *mix* enzimáticos (YU et al., 2005). Beauchemin e Rode (1996) revisaram diversos estudos e concluíram que os resultados inconsistentes e variáveis nas pesquisas de diferentes autores devem-se a fatores como: composição da dieta (YANG et al., 2000), tipo de preparado enzimático (MORGAVI et al., 2001), estabilidade enzimática (HRISTOV et al., 1998), método de aplicação (YANG et al., 2000) e quantidade de enzima adicionada (BEAUCHEMIN et al., 1997).

Outro teste de digestibilidade *in vitro* foi realizado de modo a verificar a produção de gás na digestibilidade. Dessa forma, foram realizadas medidas de pressão de gás em diferentes tempos. Verificou-se que até 24 horas, não houve diferença significativa estatisticamente entre as doses ministradas e o controle. Porém, ao se analisar os alimentos testados, em 24 horas o melhor resultado foi para o capim brachiaria, o qual indicou diferenças em cerca de 7% e 10% maiores comparados aos outros alimentos para DIVMO e NDT, respectivamente, enquanto que a cana-de-açúcar apresentou valores de DIVMO e NDT de 15,7% e 16,3%, entre a dose de 8 mL e o controle, em 48 horas. Este último resultado indicou que a presença de enzimas aumentou a digestibilidade da matéria orgânica e contribui para um maior valor de nutriente digestível.

Beauchemin et al. (2003) concluíram em seus estudos que a adição de altos níveis de enzima podem ser menos efetivos que baixos níveis, fato que também pode ser observado no experimento *in vitro* deste trabalho. Em outro experimento de produção de gás, Jalilvand et al. (2008) verificaram que a adição de enzimas (comercial) afetou a fermentação ruminal de forragens de maneira diferente, de acordo com o conteúdo de fibra e composição dos polissacarídeos presentes e, ainda, que a concentração de adição enzimática é um fator importante na eficácia das mesmas.

É interessante comparar os resultados obtidos com os dados apresentados por Magalhaes (2007), descritos resumidamente na Tabela 32. Pois, verifica-se que os resultados de NDT obtidos pelo extrato de *A. japonicus* foram de 6 e 30% maiores em

24 horas, no capim *Brachiaria* e cana-de-açúcar, respectivamente e, de 22,5 - 50% maiores em 48 horas ao se utilizar 8 mL de extrato bruto comparado aos valores da Tabela 38. Portanto, o maior efeito enzimático foi observado quando se utilizou cana-de-açúcar.

**Tabela 32** – Valores de NDT (%) de acordo com obtido por Magalhães (2007).

Item	Cana-de-açúcar	Feno Tifton-85	<i>B. decumbens</i>
<i>in vivo</i>	65,68	74,56	60,95
Gas24h	41,02	50,78	58,38
Gas48h	45,35	62,28	66,60
Gas72h	47,51	65,11	68,52

Estes resultados da produção de gás foram bastante promissores, de forma que se pode inferir que a adição do “pool” de preparado enzimático no alimento de ruminantes provocou aumento da digestibilidade dos volumosos porque, ao atuarem nos carboidratos presentes na parede das células vegetais, houve a liberação de oligossacarídeos, açúcares menores e, portanto, mais facilmente assimiláveis pela microbiota presente no rúmen bovino que se prolifera e, quanto maior a proliferação desses microrganismos, maior a quantidade de enzimas (como as celulases) produzidas por eles e, dessa forma, acarreta em um aumento na velocidade da digestão (melhor digestibilidade), além de melhorar o aproveitamento energético e a produção de gordura no leite (TEIXEIRA, 1992).

Ainda analisando a produção de gás, verificou-se que a amostra de cana-de-açúcar obteve os melhores resultados estatísticos a partir de 36 horas de incubação, indicando melhora na digestibilidade quando se adicionou o extrato, principalmente ao se utilizar a dose de 8 mL nas amostras de cana-de-açúcar e *Brachiaria*.

Além do aumento da digestibilidade *in vitro* (o que já se verificou), para que se utilize uma enzima no setor de rações, esta também deverá resistir às condições

adversas do rúmen. No entanto, para investigar a estabilidade enzimática às condições ruminais, foram realizados testes em laboratório com o fluido ruminal extraído de cabras e ainda, foi realizado um experimento *in vivo*, no qual caprinos foram tratados com o preparado enzimático padronizado para xilanase e CMCase de *A. japonicus* e alimentados com feno de milho.

Desse modo, no estudo da estabilidade ruminal em laboratório, verificou-se que a xilanase apresentou atividade acima de 50% até 4 horas, enquanto que a CMCase perdeu mais de 50% de sua atividade em menos de 2 horas em contato com o fluido. Porém, como o experimento *in vivo* traduz melhor a realidade e como o rúmen possui taxa de passagem, ou seja, há um fluxo constante de matéria em trânsito, o experimento adicionando a enzima diretamente nos caprinos mostrou que a CMCase não apresentou atividade, fato que pode ser atribuído a sua diluição no rúmen do animal e, dessa forma, o aparelho não detectou níveis pequenos de açúcar redutor. Porém, a atividade de xilanase foi elevada e esta esteve presente no rúmen mesmo após 4 horas de sua administração. Peixoto-Nogueira (2008) avaliou da mesma forma a estabilidade de xilanases de *A. niveus* no ambiente ruminal de caprinos e obteve excelente resultado, verificando que a enzima continuava presente no rúmen mesmo após 7 horas de sua administração.

Assim, podemos afirmar que o extrato bruto, contendo as xilanases produzidas por *A. japonicus*, foi estável às condições ruminais e, provavelmente, se rotineiramente adicionado à alimentação, ocasionará um aumento na digestibilidade da fração fibrosa dos alimentos, e conseqüentemente no desempenho desses animais em relação ao ganho de peso e produção de leite, conforme observado por Queiroz et al. (2004).

Em suma, a adição de enzimas exógenas na alimentação de ruminantes, além de degradar a parede celular de forrageiras por eles ingeridas e fornecer açúcares menores à microbiota ruminal provocando aumento na proliferação desses microrganismos e conseqüente aumento na digestibilidade (Hatfield, 1989), também atua degradando a porção fibrosa do alimento que impede o aproveitamento de sua

porção potencialmente digerível. Assim, possivelmente a adição do extrato bruto produzido e padronizado contendo enzimas fibrolíticas, principalmente xilanases, promoveu uma eficiente degradação da porção fibrosa dos volumosos testados levando a um maior aproveitamento dos nutrientes.

Os resultados obtidos extratos de *A. japonicus* foram promissores no setor de rações. Para melhorar a atuação deste nos experimento *in vitro* de digestibilidade seria interessante utilizar em conjunto um extrato bruto rico em todas as formas de celulases, produzido provavelmente por *Trichodermas*, de forma que juntos atuassem melhorando a digestibilidade ruminal acarretando em diversas vantagens para o animal, como descrito anteriormente. Por isso, estes resultados merecem grande atenção e aprofundamento para que esta enzima seja, de fato, aplicada em larga escala no setor de ração animal, uma vez que já se comprovou a não toxicidade deste extrato bruto para células animais.

## *6. CONCLUSÃO*

- Para este trabalho foi realizado uma prospecção em áreas de pastagens, isolando um total de 27 fungos, dos quais foi selecionado o *Aspergillus japonicus* Saito nos experimentos realizados neste trabalho;
- Os meios de cultivo padronizados para a produção enzimática foram menos dispendiosos, uma vez que foram utilizados resíduos agroindustriais como fonte de carbono e estufas sem rotação constante, reduzindo o gasto energético com aparelhos;
- O reduzido tempo de produção na FES foi interessante visando à aplicação, a qual necessita de grandes volumes;
- As condições enzimáticas de temperatura e pH de reação, além das estabilidades química e térmica, favoreceram a aplicação prática dessas proteínas;
- Nos testes de citotoxicidade os extratos brutos não apresentaram efeitos deletérios, podendo ser utilizados na aplicação escolhida;
- O extrato bruto apresentou uma promissora atuação quando utilizado na hidrólise de forrageiras tropicais;
- O extrato enzimático apresentou significância estatística no experimento de produção de gás (DIVMO e NDT), embora não o tenha apresentado no experimento *in vitro* em duas etapas.
- Nos testes com volumosos (forragens), a enzima apresentou um desempenho satisfatório e também se apresentou estável, tanto nos processos *in vitro* como nos *in vivo*.

## *7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

- ABARCA, M. L., ACCENSI, F., CANO, J., CABAÑES, F.J., Taxonomy and significance of black *Aspergilli*. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 86, p.33–49, 2004.
- ADAMS, P.R. Mycelial amylase activities of thermophilic species of *Rhizomucor*, *Humicola* and *Papulaspora*. **Mycopatul**, v. 112, p.35-37, 1990.
- ALAM, M Z., MUYIBI, S.A., WAHID, R. Statistical optimization of process conditions for cellulase production by liquid state bioconversion of domestic wastewater sludge. **Bioresour Technol**, v.99, p. 4709–4716, 2008.
- AMITA, R.S. e MADAMWAR, D. Xylanase production under solid-state fermentation and its characterization by an isolated strain of *Aspergillus foetidus* in India. **World J Microbiol Biotechnol**, v. 21, p. 233–243, 2005.
- AOAC. **Official Methods of Analysis of the Association of Official Agricultural Chemists**, 16th ed. AOAC International, Arlington, VA, USA, 1999.
- ARISTIDOU, A. e PENTILLÄ, M. Metabolic engineering applications to renewable resource utilization. **Curr Opinion Biotechnol**, v.11, p. 187-198, 2000.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS (AOAC). Washington , **Official methods of analysis**. 11. Ed. Washington, 1015p, 1990.
- BEAUCHEMIN, K.A.; RODE, L.M. The potential use of feed enzymes for ruminants. In: **Cornell nutrition conference for feed manufactures**, Cornell University, p. 131-141, 1996.
- BEAUCHEMIN, K.A., JONES, S.D.M., RODE, L.M., SEWALT, V.J.H. Effects of fibrolytic enzyme in corn or barley diets on performance and carcass characteristics of feedlot cattle. **Can J Anim Sci**, v. 77, p. 645–653, 1997.
- BEAUCHEMIN, K.A., COLOMBATTO, D., MORGAVI, D.P., YANG, W.Z. Use of fibrolytic enzymes to improve feed utilization by ruminants. **J Anim Sci**, v. 81, E37–E47, 2003.
- BEG, Q.K.; KAPOOR, M.; MAHAJAN, L.; HOONDAL, G.S. Microbial xylanases and their industrial applications: a review. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 56, p.326-338, 2001.
- BENASSI, V.M. **Estudo de amylases produzidas pelo fungo termotolerante *Aspergillus phoenicis***. Monografia apresentada a Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas, p. 64, 2006.
- BERLIN, A., MAXIMENKO, V., GILKES, N., SADDLER, J. Optimization of enzyme complexes for lignocellulose hydrolysis. **Biotechnol Bioeng**, v. 97, nº 2, June 1, 2007.
- BHANU-PRAKASH, G.V.S.; PADMAJA, V.; SIVA KIRAN, R.R. Statistical optimization of process variables for the large-scale production of *Metarhizium anisopliae* conidiospores in solid-state fermentation. **Bioresour Technol**, v. 99, p. 1530-1537, 2008.
- BHAT, M.K. Cellulases and related enzymes in biotechnology. **Biotechnol Adv**. v.18, nº 5, p.355-383, 2000.

- BIELY, P. Microbial xylanolytic systems. **Trends Biotechnol**, v.3, p. 286-290, 1985.
- BINUPRIYA, A. R.; SATHISHKUMAR, M.; SWAMINATHAN, K.; JEONG, E. S.; YUN, S. E. PATTABI S.; Biosorption of metal ions from aqueous solution and electroplating industry wastewater by *Aspergillus japonicus*: Phytotoxicity Studies **Bull Environ Contam Toxicol**, v.77, p.219–227, 2006.
- BRADDOO, S., GUPTA, R., SAXENA, R.K. Parametric optimization and biochemical regulation of extracellular tannase from *Aspergillus japonicus* **Process Biochem**, v.32 n° 2, p. 135-139, 1997.
- BRÜHLMANN, F.; LEUPIN, M.; ERSMANN, K.M.; FIECHTER, A. Enzymatic degumming of ramie bast fibers. **J Biotechnol**, v.76, p. 43-50, 2000.
- BURANOV, U. e MAZZA, G. Review: Lignin in straw of herbaceous crops. **Ind Crop Prod**, v.28, p. 81-88, 2008.
- CAGNON, B.; PY, X.; GUILLOT, A.; STOECKLI, F.; CHAMBAT, G. Contributions of hemicelluloses, cellulose and lignin to the mass and the porous properties of chars and steam activated carbons from various lignocellulosic precursors. **Bioresour Technol**, v.100, p. 292-298, 2009.
- CAMACHO, N.A. e AGUILAR, O.G. Production, purification and characterization of a low molecular mass xylanase from *Aspergillus* sp. and its application in bakery. **Appl Biochem Biotechnol**, v.104, p. 159-172, 2003.
- CARDELLO, L.; TERENCEZI, H.F.; JORGE, J.A. A cystolic trehalase from thermophilic fungus *Humicola grisea* var. *thermoidea*. **Microbiol**, v.140, p.1671-1677, 1994.
- CASTILLO, M.R.; GUTIERREZ-CORREA, M.; LINDEN, J. C.; TENDERDY, R.P. Mixed culture solid state fermentation for cellulolytic enzyme production. **Biotechnol Let**, v. 16, p. 967-972, 1994.
- CHÁVEZ, R., BULL, P., EYZAGUIRRE, J. The xylanolytic enzyme system from the genus *Penicillium* **J. Biotechnol**, v.123, p. 413–433, 2006.
- CHEN, W. C. Medium improvement for  $\beta$ -fructofuranosidase production by *Aspergillus japonicus* **Process Biochem**, v.33, n° 3, p. 267-271, 1998.
- CHEN, X.L.; WANG, J.K.; WU, Y.M.; LIU, J.X. Effects of chemical treatments of rice straw on rumen fermentation characteristics, fibrolytic enzyme activities and populations of liquid and solid-associated ruminal microbes in vitro. **Anim Feed Sci Technol**, v.141, p.1-14, 2008a.
- CHEN, H.; HAN, Y. XU, J. Simultaneous saccharification and fermentation of steam exploded wheat straw pretreated with alkaline peroxide. **Process Biochem**, v. 43, p. 1462-1466, 2008b.
- CHRISTAKOPOULOS P., NERINCKX W., KEKOS D., MACRIS B., CLAEYSSSENS M. Purification and characterization of two low molecular mass alkaline xylanases from *Fusarium oxysporum* F3. **J Biotechnol**, v.51, p. 181–189, 1996.
- COLOMBATTO, D., MORGAVI, D.P.; FURTADO, A.F.; BEAUCHEMIN, K.A. Screening of exogenous enzymes for ruminant diets: relationship between biochemical characteristics and *in vitro* ruminal degradation. **J Anim Sci**, 81:2628-2638, 2003a.

- COLOMBATTO, D.; MOULD, F.L.; BHAT, M.K.; OWEN, E. Use of fibrolytic to improve the nutritive value of ruminant diets. A biochemical and *in vitro* rumen degradation assessment. **Anim Feed Sci Technol**, v.107, p.201-209, 2003b.
- COLOMBATTO, D.; MOULD, F.L.; BHAT, M.K.; PHIPPS, R.H., OWEN, E. In vitro evaluation of fibrolytic enzymes as additives for maize (*Zea mays* L.) silage I. Effects of ensiling temperature, enzyme source and addition level. **Anim Feed Sci Technol**, v.111, p.111-128, 2004.
- COLOMBATTO, D.; MOULD, F.L.; BHAT, M.K.; OWEN, E. Influence of exogenous fibrolytic enzyme level and incubation pH on the *in vitro* ruminal fermentation of alfalfa stems. **Anim Feed Sci Technol**, v. 137, p. 150-162, 2007.
- COONEY, D. G. e EMERSON, R. **Thermophilic fungi: Na account of their biology, activities and classification**. W.H. Freeman, San Francisco, Califórnia, 1964.
- DA SILVA, R.; LAGO, E. S.; MERHEB, C. W.; MACCHIONE, M. M.; PARK, Y. K.; GOMES, E. Production of xylanase and CMCCase on solid state fermentation in different residues by *Thermoascus aurantiascus miehe*. **Braz J Microbiol**, v.36, p. 235-241, 2005.
- DAMASIO, A.R.L.; SILVA, T.M.; MALLER, A.; JORGE, J.A.; TERENCEZ, H.F., POLIZELI, M.L.T.M. Purification and partial characterization of an exo-polygalacturonase from *Paecilomyces variotii* liquid culture. **Appl Biochem Biotechnol** DOI 10.1007/s12010-009-8682-0, 2009.
- DAMASSO, M.C.T.; ANDRADE, C.M.M.C.; PEREIRA JÚNIOR, N. Production and properties of the cellulase-free xylanase from *Thermomyces lanuginosus* IOC-4145. **Braz J Microbiol**, v.33, nº 4, p.333-338, 2002.
- DE GREGORIO, A.; MANDALARI, G.; ARENA, N.; NUCITA, F.; TRIPODO, M. M.; LO CURTO, R. B. SCP and crude pectinase by slurry – state fermentation of lemon pulps. **Bioresour Technol**, v. 83, p. 89 – 94, 2002.
- DE HAAN, R.; ROSE, S.H.; LYND, L. R.; VAN ZYL, W. H. Hydrolysis and fermentation of amorphous cellulose by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. **Metabol Eng**, v.9, p.87-94, 2007.
- DEAN, D.B., ADESOGAN, A.T., KRUEGER, N.A., LITTELL, R.C. Effects of treatment with ammonia or fibrolytic enzymes on chemical composition and ruminal degradability of hays produced from tropical grasses. **Ani Feed Sci Technol**, v. 145, p. 68–83, 2008.
- DECKER, C. H., VISSER, J., SCHREIER, P.  $\beta$ -Glucosidases from five black *Aspergillus* Species: study of their physic-chemical and biocatalytic properties **J Agric Food Chem**, v.48, p. 4929-4936, 2000.
- DEGHAN-BANADAKY, M.; CORBETT, R.; OBA, M. Effects of barley grain processing on productivity of cattle. **Anim Feed Sci Technol**, v. 137, p. 1-24, 2007.
- DELCHEVA, G.; DOBREV, G.; PISHTIYSKI, I.G. Performance of *Aspergillus niger* B 03  $\beta$ -xylosidase immobilized on polyamide membrane support. **J Mol Catal B Enzym**, v. 54, p. 109-115, 2008.
- DEMAIN, A.L. **Microbial biotechnology**. Tibechn. v. 18, p.26-31, 2000.

- DIAS, F.J., JOBIM, C.C., CECATO, U., BRANCO, A.F., SANTELLO, G.A. Composição química do capim-Mombaça (*Panicum maximum* Jacq. cv. Mombaça) adubado com diferentes fontes de fósforo sob pastejo. **Acta Sci Anim Sci**, Maringá, v. 29, n. 1, p. 9-16, 2007.
- DILLON, A. J. P. Celulase, In.SAID, S.; PIETRO, R.C.L.R.; **Enzimas como Agentes Biotecnológicos**, Ribeirão Preto, ed.Legis Summa, cap.5, p.243-269, 2004.
- DIORIO, L.A.; MERCURI, A.A.; NAHABEDIAN, D.E.; FORCHIASSIN, F. Development of a bioreactor system for the decolorization of dyes by *Coriolus versicolor f. antarcticus*. **Chemosph**, in press, 2008.
- DOBREV, G.T.; PISHTIYSKI, I. G.; STANCHEV, V.S.; MIRCHEVA, R. Optimization of nutrient médium containing agricultural wastes for xylanase production by *Aspergillus níger* B03 using optimal composite experimental design. **Bioresour Technol**, v.98, p. 2671-2678, 2007.
- DOMSCH, K.H., GAMS, W., ANDERSON, T.H. **Compendium of Soil Fungi**. London: Academic Press, 1980.
- DUEÑAS, R.; TENGEDY, R.P; GUTIERREZ-CORREA, M. Cellulase production by mixed fungi in solid-substrate fermentation of bagasse. **World J Microbiol Biotechnol**, v. 11, p. 333-337, 1995.
- EMERSON, R. **An experimental study of the life cycles and taxonomy of Allomyces**. Lloydia, v. 4, p. 77-144, 1941.
- EUN, J.S.; BEAUCHEMIN, K.A; HONG, S.H.; BAUER, M.W. Exogenous enzymes added to untreated or ammoniated rice straw: Effects on *in vitro* fermentation characteristics and degradability. *Anim Fedd Sci Technol*, In Press, available in [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com), 2006.
- EUN, J.S. e BEAUCHEMIN, K.A. Effects of a proteolytic feed enzyme on intake, digestion, ruminal fermentation and milk production. **J Dairy Sci**, v. 88, n° 6, p.2140-2153, 2005.
- EUN, J.S. e BEAUCHEMIN, K. A. Assessment of the efficacy of varying experimental exogenous fibrolytic enzymes using *in vitro* fermentation characteristics. **Anim Feed Sci Technol**, v.132, p. 298-315, 2007a.
- EUN, J.S. e BEAUCHEMIN, K. A. Enhancing *in vitro* degradation of alfafa hay and corn silage using feed enzymes. **J Dairy Sci**, v.90, n°6 p.2839-2851, 2007b.
- EUN, J.S. e BEAUCHEMIN, K.A. Relationship between enzymatic activities and *in vitro* degradation of alfafa hay and corn silage. **Anim Feed Sci Technol**, v.145 p.53–67, 2008.
- FAGERSTRÖM, R.; **Studies on the debranching activity of fungal glucoamylases**. Primalco Ltd. Biotec R & D, Helsinki and Department of Biochemistry, University of Helsinki. Academic Dissertation, p. 83, 1995.
- FAN, L. T. GHARPURAY, M. M., LEE, Y.H. **Cellulose hydrolysis**. New York. Springer-Verlag, 1987.
- FENGEL, D. e WEGENER, G. **Wood: chemistry, ultra structure and reaction**. Berlin: Walter de Gruyter, 1989.

- FENGXIA, L.; MEI, L.; ZHAOXIN, L.; XIAOMEI, B.; HAIZHEN, Z.; YI, W. Purification and characterization of xylanase from *Aspergillus ficuum* AF-98 **Bioresour Technol**, v. 99, p.5938–5941, 2008.
- FREITAS, P. M.; MARTIN, N.; SILVA, D.; DA SILVA, R.; GOMES, E. Production and characterization of polygalacturonases from newly isolated thermophilic *Monascus* sp N8 and *Aspergillus* sp N12 by solid state fermentation. **Braz J Microbiol**, 2005.
- GADO H.M., SALEM, A.Z.M., ROBINSON, P.H., HASSAN, M. Influence of exogenous enzymes on nutrient digestibility, extent of ruminal fermentation as well as milk production and composition in dairy cows. **Ani Feed Sci Technol**, v. 154, p. 36–46, 2009.
- GAMS, W., M. CHRISTENSEN, A. H. ONIONS, J. I. PITT, AND R. A. SAMSON. Infrageneric taxa of *Aspergillus*, p. 55–62. In R. A. Samson and J. I. Pitt (ed.), *Advances in Penicillium and Aspergillus systematics*. **Plenum Press**, New York, N.Y. 1985.
- GAO, J.; WENG, H. ZHU, D. YUAN, M.; GUAN, M.; XI, Y. Production and characterization of cellulolytic enzymes from the thermoacidophilic fungal *Aspergillus terreus* M11 under solid-state cultivation of corn stover. **Bioresour Technol**, v. 99, p. 7623–7629, 2008.
- GIESE, E.C.; COVIZZI, L.G.; DEKKER, R.F.H.; BARBOSA, A. M. Influência de Tween na produção de lacases constitutivas e indutivas pelo *Botryosphaeria* sp. **Acta Sci Biol Sci Maringá**, v. 26, n° 4, p. 463-470, 2004.
- GIRALDO, L.A.; TIJIDO, M.L.; RANILLA, M.J.; CARRO, M.D. Effects of exogenous fibrolytic on *in vitro* ruminal fermentation of substrates with different forage: concentrate ratio. **Anim Feed Sci Technol**, v.141, p. 306-325, 2008.
- GOUKA, R. J.; PUNT, P. J.; VAN DEN HONDEL, C. A. M. J. J. Efficient production of secreted proteins by *Aspergillus*: progress, limitations and prospects. **Appl Microbiol Biotechnol** v. 47, p. 1-11, 1997.
- GRAMINHA, É.B.N.; GONÇALVES, A.Z.L.; PIROTA, R.D.P.B.; BALSALOBRE, M.A.A.; DA SILVA, R.; GOMES, E. Enzyme production by solid-state fermentation: Application to animal nutrition. **Anim Feed Sci Technol**, v. 144, p. 1-22, 2008.
- GUARRO, J., GENNÉ, J., STCHIGEL, M. Developments in Fungal Taxonomy. **Clin Microbiol Rev**, v. 12, n°3, p. 454–500, 1999.
- GUIMARÃES, L.H.; TEREZI, H.F.; JORGE, J.A., POLIZELI, M.L.T.M. Thermostable conidial and mycelial alkaline phosphatases from the thermophilic fungus *Scytalidium thermophilum*. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.** 27: 265-270, 2001.
- GUO, G.L.; CHEN, W.H.; MEN, L.C.; HWANG, W.S. Characterization of dilute acid pretreatment of silvergrass for ethanol production. **Bioresour Technol**, v. 99, p. 6046-6053, 2008.
- GUTIERREZ-CORREA, M.; PORTAL, L.; MORENO, P.; TENDERDY, R.P. Mixed culture solid substrate fermentation of *Trichoderma reesei* with *Aspergillus niger* on sugar cane bagasse. **Bioresour Technol.**, v. 68, pp. 173-178, 1999.

- GUTIERREZ-CORREA, M.; TENDERDY, R.P. Production of cellulase on sugar cane bagasse by fungal mixed culture solid substrate fermentation. **Biotechnol. Let.** Vol. 19, pp. 665-667, 1997.
- GUTIERREZ-CORREA, M.; TENDERDY, R.P. Xylanase production by fungal mixed culture solid substrate fermentation on sugar cane bagasse. **Biotechnol Let.**, v. 20, N 1, 45-47, 1998.
- HAHN-HAˆGERDAL, B.; GALBE, M.; GORWA-GRAUSLUND, M.F.; LIDEˆN, G.; ZACCHI, G. Bio-ethanol – the fuel of tomorrow from the residues of today, **Trend Biotechnol**, v.24 nˆ12, 2006.
- HAINZE, M.T.M.; MUNTIFERING, R.B.; Mc CALL, C.A. Fiber digestion on horses fed typical diets with and without exogenous fibrolitic enzymes. **Sci pap**, v. 23, p. 111-115, 2003.
- HALL, M.B.; **Recent advanced in non-ndf carbohydrates for the nutrition of lactating cows**, In: Simpˆsio Internacional em bovinos de leite, Lavras:UFLA-FAEPE, 2001.
- HARBAK, L. e THYGESSEN, H.V. Safety evaluation of a xylanase expressed in *Bacillus subtilis*. **Food Chem Toxicol**, v.40, p. 1-7, 2002.
- HATFIELD, G.M. Structural polysaccharides in forages and their degradability. **Agron J**, Madison, v. 81, p. 39-46, 1989.
- HAWKSWORTH, D. L., P. M. Kirk, B. C. Sutton, and D. N. Pegler. Ainsworth and Bisby's **Dictionary of the Fungi** (8th Ed.). CAB International, Wallingford, United Kingdom. p. 616. 1995.
- HAWKSWORTH, D. L. The magnitude of fungal diversity: the 1-5 million species estimated revisited. **Mycol Res**, v. 105 (12), p. 1422-1432, 2001.
- HAYASHIDA, S.; YOSHIOKA, H. Production and purification of Thermostable cellulases from *Humicola isolens* YH-8. **Agric Biol Chem**, v. 44, p. 1721-1728, 1980.
- HENDRIKS, A.T.W.M.; ZEEMAN, G. Review: Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. **Bioresour Technol**, v.100, p.10-18, 2009.
- HRISTOV, A.N., McALLISTER, T.A., CHENG, K.J. Stability of exogenous polysaccharide-degrading enzyme in the rumen. **Anim Feed Sci Technol**, v. 76, p. 161–168, 1998.
- HRISTOV, A.N.; McALLISTER, T.A.; CHENG, K.J. Intraruminal supplementation with increasing levels of exogenous polysaccharide-degrading enzymes: effects on nutrient digestion in cattle fed barley grain diets. **J Anim Sci**, v.78, p. 477-487, 2000.
- IMANDI, S.B.; BANDARU, V.V.R.; SOMALANKA, S.R.; BANDARU, S.R.; GARAPATI, H.R. Application of statistical experimental designs for the optimization of medium constituents for the production of citric acid from pineapple waste. **Bioresour Technol**, v. 99, p. 4445-4450, 2008.
- IWASHITA, K. Recent studies of protein secretion by filamentous fungi. **J Biosc Bioeng**, v. 94, No. 6, p. 530-535. 2002.

- JALILVAND, G.; ODONGO, N.E.; L'ÓPEZ, A. S.; NASERIAN, R.; VALIZADEH, F.; EFTEKHAR SHAHRODI, KEBREAB, E.; FRANCE J.; Effects of different levels of an enzyme mixture on *in vitro* gas production parameters of contrasting forages. **Anim Feed Sci Technol**, v.146, p.289–301, 2008.
- JAYANI, R. S.; SAXENA, S.; GUPTA, R. Microbial pectinolytic enzymes: A review. **Process Biochem**, v. 40, n° 9, p. 2931 - 2944, 2005.
- JEIHANIPOUR, A.; TAHERZADEH, M.J. Ethanol production from cotton-based waste textiles. **Bioresour Technol**, v. 100, p. 1007-1010, 2009.
- JUNG, H.G. Forage lignins and their effects on fiber digestibility. **Agron J**,v. 81, p.33-38, 1989.
- JURKOVICH, V.; KUTSAI, J.; FÉBEL, H.; REICZIGEL, J.; BRYDL, E.; KÖNYVES, L.; RAFAI, P. Rumen fermentation response to a direct-fed xylanase enzyme preparation from *Thermomyces lanuginosus* in sheep. **Acta Vet Hung**, v.54, n° 3, p. 333-342, 2006.
- KERSTERS-HILDERSON, H.; CLAEYSSSENS, M.; DOORSLAER, E.V.; SAMAN, E.; BRUYNE, C.K.  **$\beta$ -D-xylosidase from *Bacillus pumilus***. *Methods Enzymol*, 83: 631-639, 1982.
- KHANNA, P., SUNDARI, S.S, KUMAR, N.J. Production, isolation and partial purification of xylanase from *Aspergillus* sp. **World J Microbiol Biotechnol Technol**, v.11, p.242-243, 1995.
- KLICH, M.A. and PITT, J. I. **A laboratory guide to common *Aspergillus* species and their telemorphs**. Published by Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization, Division of Food Processing, 1988.
- KRUEGER, N.A. e ADESOGAN, A.T. Effects of different mixtures of fibrolytic enzymes on digestion and fermentation of bahiagrass hay. **Anim Feed Sci Technol**, v.145, p. 84-94, 2008.
- KUMAR, R.; SING, S.; SING, O.V. Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives. **J Ind Microbiol Biotechnol**, v.35, p.377–391, 2008
- KUMAR, A. A conceptual comparison of bioenergy options for using mountain pine beetle infested wood in Western Canada. **Bioresour Technol**, v. 100, p. 387-399, 2009.
- KUNDU, R. K.; DUBE, S.; DUBE, D. K. Extracellular cellulolytic enzymes system of *Aspergillus japonicus* : 3. Isolation, purification, characterization of multiple forms of endoglucanase. **Enzyme Microb Technol**, v. 10, 1988.
- KUO, C.H. e LEE, C.K.; Enhanced enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse by N-methylmorpholine-N-oxide pretreatment. **Bioresour Technol**, v. 100, p. 866-871, 2009.
- LASA, I. e BERENQUER, J. Thermophilic enzymes and their biotechnological potential. **Microbiol Sem**, v. 9, p. 77-89, 1993.

- LEE, S.S.; HA, J.K.; CHENG, K.-J. Influence of an anaerobic fungal culture administration on *in vivo* ruminal fermentation and nutrient digestion. **Anim Feed Sci Technol**, v.88, p.201-217, 2000.
- LI, X.T.; JIANG, Z.Q.; LI, L.T.; YANG, S.Q.; FENG, W.Y.; FAN, J.Y.; KUSAKABE, I. Characterization of cellulose-free, neutral xylanase from *Termomyces lanuginosus* CBS 288.54 and biobleaching effect on wheat straw pulp. **Bioresour Technol**, v.96, p.1370-1379, 2005.
- LIA, X. e JIA, R. Decolorization and biosorption for Congo red by system rice hull-Schizophyllum sp. F17 under solid-state condition in a continuous flow packed-bed bioreactor. **Bioresour Technol**, *in press*, 2008.
- LOURES, D.R.S. **Enzimas fibrolíticas e emurchecimento no controle de perdas da ensilagem na digestão de nutrientes em bovinos alimentados com rações contendo silagem de capim Tanzânia**. Tese apresentada à Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – USP, para obtenção do título de Doutor em Agronomia, área de concentração: Ciência Animal e Pastagens. p. 146, 2004.
- LOWRY, H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A. L., RANDAL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J Biol Chem**, v.193, p.267-275, 1951.
- MADIGAN, M.; MARTINKI, J. M.; PARKER, J.; **Brock Biology of microorganisms**. Prentice Hall. 10<sup>a</sup> Ed., 2003.
- MAGALHÃES, K.A. **Tabelas brasileiras de composição de alimentos, determinação e estimativa do valor energético de alimentos para bovinos**. Viçosa, MG. UFV, 2007. 263p. Tese (Doutorado em Zootecnia). Universidade Federal de Viçosa, 2007.
- MALLER, A. **Produção, Purificação e Caracterização do complexo pectinolítico do fungo *Aspergillus niveus***. Dissertação apresentada a Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto para obtenção do título de mestre em Bioquímica, p. 128, 2008.
- MARTÍN, C. KLINKE, H.B.; THOMSEN, A.B. Wet oxidation as a pretreatment method for enhancing the enzymatic convertibility of sugarcane bagasse. **Enz Microbiol Technol**, v. 40, p. 426-432, 2007.
- MARTINS, A.S. **Enzimas fibrolíticas exógenas na alimentação de bovinos**. Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal – UNESP, para obtenção do título de Doutor em Zootecnia, área de concentração: Produção Animal. p. 125, 2003.
- MARTINS, L. F. **Caracterização do complexo celulásico de *Penicillium echinulatum***. Dissertação apresentada a Faculdade de Química da Universidade Federal do Paraná para obtenção do título de mestre em Química Orgânica, Curitiba, 121 p., 2005.
- MENKE, K.H. e STEINGASS, H. Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and *in vitro* gas production using rumen fluid. **Anim Res Develop**, v. 28, p. 7-55, 1988.

- MESHARAM, M., KULKARNI, A., JAYARAMAN, V. K., KULKARNI, B.D., LELE, S.S. Optimal xylanase production using *Penicillium janthinellum* NCIM 1169: A model based approach. **Biochem Eng J** 40, 348–356, 2008.
- MICHELIN, M. ; RULLER, R. ; WARD, R.J. ; MORAES, L.A.B. ; JORGE, J. A. ; TERENCEZI, H. F. ; POLIZELI, M.L.T.M. Purification and biochemical characterization of a thermostable extracellular glucoamylase produced by the thermotolerant fungus *Paecilomyces variotii*. **J Ind Microbiol Biotechnol**, v. 35, p. 17-25, 2008.
- MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Anal Chem**, v. 31, n° 3, p. 426-428, 1959.
- MISHRA, R.S. e MAHESHWARI, R. Amylases of the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus*: Their purification, properties, action on starch and response to heat. **J. Biosci.** v. 2, n° 5, p. 653-672, 1996.
- MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N.; STUART, D. M.; PANDEY, A. New developments in solid state fermentation. II. Rational approaches to the design, operation and scale-up of bioreactors. **Process Biochem**, v. 35, p. 1211-1225, 2000.
- MORGAVI, D.P., BEAUCHEMIN, K.A., NSEREKO, V.L., RODE, L.M., MCALLISTER, T.A., IWAASA, A.D., WANG, Y., YANG, W.Z. Resistance of feed enzymes to proteolytic inactivation by rumen micro organisms and gastrointestinal proteases. **J Anim Sci**, v. 79, p. 1621–1630., 2001.
- MOTA, M., RODRÍGUEZ, R., SOLANAS, E., FONDEVILA, M. Evaluation of four tropical browse legumes as nitrogen sources: Comparison of *in vitro* gas production with other methods to determine N degradability **Ani Feed Sci Technol**, v. 123-124, Issue null, p. 341-350, 2005.
- MUKHERJEE, A.K.; ADHIKARI, H.; RAI, S.K. Production of alkaline protease by a thermophilic *Bacillus subtilis* under solid-state fermentation (SSF) condition using *Imperata cylindrical* grass and potato peel as low-cost medium: Characterization and application of enzyme in detergent formulation. **Biochem Eng J**, v.39, p. 253-261, 2008.
- MURRAY, T.; ROUGH, S.L.; WILSON, D.I. The effect of drying technique on tablets formed from extrusion-spheronization granules. **Chem Eng Res Design**, v.85, p.996-1004, 2007.
- NSEREKO, V.L.; MORGAVI, D.P.; RODE, L.M.; BEAUCHEMIN, K.A.; McALLITER, T.A. Effects of fungal enzyme preparations on hydrolysis and subsequent degradation of alfafa hay fiber by mixed rumen microorganisms in vitro. **Anim Feed Sci Technol**, v.88, n° 3-4, p. 153-170, 2000.
- OOIJKAAS, L.P.; BUITELAAR, R.M.; TRAMPER, J.; RINZEMA, A. Defined media and inert supports: their potential as solid state fermentation production systems. **Trends Biotechnol.** 18: 356-360, 2000.
- PANAGIOTOU, G.; KEKOS, D.; MACRIS, B.J.; CHRISTAKOPOULOS, P. Production of cellulolytic and xylanolytic enzymes by *Fusarium oxysporum* grown on corn stover in solid state fermentation. **Ind Crops Prod** 18: 37- 45, 2005.

- PANDEY, A.; SILVAKUMAR, P.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P. Solid state fermentation for the production of industrial enzymes. **Curr Sci**, v. 77, p. 149-162, 1999.
- PANDEY, A.; NIGAN, P.; SOCCOL, C.R.; SOCCOL, V.T.; SINGH, D; MOHAN, R. Advances in microbial amylases. **Biotechnol Appl Biochem** v. 31, p. 135-152, 2000a.
- PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; MITCHELL, D. New developments in solid state fermentation: I-bioprocesses and products. **Process Biochem**, v. 35, p. 1153-1169, 2000b.
- PAPAGIANNI, M. Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes. Review. **Biotechnol Adv.** v.22, p. 189-259, 2004.
- PEDERSEN, M.; LAURITZEN, H.K.; FRISVAD, J.C.; MEYER, A.S. Identification of thermostable  $\beta$ -xylosidase activities produced by *Aspergillus brasiliensis* and *Aspergillus niger* **Biotechnol Lett**, 29:743–748, 2007.
- PEIXOTO-NOGUEIRA, S.C. **Produção, propriedades bioquímicas e funcionais do sistema xilanolítico de *Aspergilli* e aplicação biotecnológica no branqueamento da polpa de celulose e em ração animal.** Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão para a obtenção do título de Doutor em Bioquímica. 240 p., 2008.
- PEIXOTO-NOGUEIRA, S.C.; SANDRIM, V.C.; GUIMARÃES, L.H.; JORGE, J.A.; TEREZI, H.F.; POLIZELI, M.L.T.M. Evidence of thermostable amylolytic activity from *Rhizopus microsporus* var. *rhizopodiformis* using wheat bran and corncob as alternative carbon source. **Bioprocess Biosys Eng**, v. 31, p. 329-340, 2008a.
- PEIXOTO-NOGUEIRA, S.C.; MICHELIN, M.; BETINI, J.H.A.; JORGE, J.A.; TEREZI, H.F.; POLIZELI, M.L.T.M. Production of xylanase by *Aspergilli* using alternative carbon sources: application of the crude extract on cellulose pulp Biobleaching. **J Ind Microbiol Biotechnol**, v. 36, p. 149-155, 2009.
- PENCREAC´H, G. e BARATTI, J.C. Hydrolysis of p-nitrophenyl palmitate in n-heptane by *Pseudomonas cepacia* lipase: a simple test of determination of lipase activity in organic media. **Enz Microbiol Technol**, v.18, p.417-422, 1996.
- PIROTA, R.D.P.B. **Produção de enzimas despolimerizantes de material vegetal por fungos termofílicos usando suplemento comercial como substrato.** Dissertação de mestrado apresentada ao Instituto de Biociências, Letras e Ciências exatas para a obtenção do título de mestre em Microbiologia Aplicada, 2009.
- POLIZELI, M.L, RIZZATTI A.C, MONTI, R.; TEREZI, H.F., JORGE, J.A, AMORIN, D.S. Review: Xylanases from fungi: properties and industrial applications. **Appl Microbiol Biotechnol**, v.67, p. 577-591, 2005.
- POLIZELI, M.L.T.M. **Properties and comercial application of xylanases from fungi.** In: Mycotechnology: current trends and future prospects, RAI, M.K. (editor), I.K. International Publisher, New Delhi, chapter 4, 82-108, 2009.
- PROMDONKOY, P., TANG, K., SORNLAKE, W., HARNPICHARNCHAI, P., KOBAYASHI, R.S., RUANGLEK, V., UPATHANPREECHA, T., VESARATCHAVEST, M., EURWILAICHITR, L., TANAPONGPIPAT, S.

- Expression and characterization of *Aspergillus* thermostable phytases in *Pichia pastoris*. **FEMS Microbiol Lett**, v.290 p. 18–24, 2009.
- PUTZKE, J. e PUTZKE, M. T. L. **Os Reinos dos Fungos** Vol. 2. Ed. da Universidade de Santa Cruz do Sul. Santa Cruz do Sul, RS, 2002.
- QUEIROZ, R.C.; BERGAMASCHINE, A.F.; BASTOS, J.F.P.; SANTOS, P.C.; LEMOS, G.C. Uso de Produto à Base de Enzima na Dieta de Bovinos: Digestibilidade dos Nutrientes e Desempenho em Confinamento. **Rev Bras Zootec**, 33(6): 1548-1556, 2004.
- RAPER, K.B. e FENNELL, D.I. **The genus *Aspergillus***. The Willians & Wilkins Company, Baltimore, 1965.
- RISPOLI, F. e SHAH, V. Optimization of the Media Ingredients for Cutinase Production from *Colleotrichum lindemuthianum* Using Mixture Design Experiments. **American Chemical Society and American Institute of Chemical Engineers**. 2008.
- RIZZATTI, A.C.S. **Estudo das atividades xilanásicas e  $\beta$ -xilosidásica produzida pelo fungo termotolerante *Aspergillus phoenicis***. Dissertação apresentada a Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto para obtenção do título de mestre em Bioquímica, p. 108, 2000.
- RIZZATTI, A.C.S.; JORGE, J. A.; TERENCEZI, H.F.; RECHIA, C.G.V., POLIZELI, M.L.T.M. Purification and properties of a thermostable extracellular  $\beta$ -D-xylosidase produced by thermotolerant *Aspergillus phoenicis*. **J Ind Microbiol Biotechnol**, vol.26, p.156-160, 2001
- RIZZATTI, A.C.S. **Propriedades regulatórias e funcionais do sistema xilanolítico do fungo *Aspergillus phoenicis***. Tese apresentada a Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto para obtenção do título de doutor em Biologia Comparada, pp148, 2004.
- RIZZATTI, A.C.S.; FREITAS, F.Z.; BERTOLINI, M.C.; PEIXOTO-NOGUEIRA, S.C.; TERENCEZI, H.F.; JORGE, J.A.; POLIZELI, M.L.T.M. Regulation of xylanase in *Aspergillus phoenicis*: a physiological and molecular approach. **J Ind Microbiol Biotechnol**, 35:237–244, 2008.
- RODE, L.M.; YANG, W.Z.; BEAUCHEMIN, K.A. Fibrolytic enzyme supplements for dairy cows to a cellulose and xylanase enzyme mixture applied to forages at the time of feeding. **J Dairy Sci**, v.82, p. 2121-2126, 1999.
- RODRIGUES, M.I. e IEMMA, A.F. **Planejamento de Experimentos e Otimização de Porcessos. Uma estratégia seqüencial de planejamentos**. Casa do Pão Editora, 2005.
- RODRIGUEZ-COUTO, S. e SANROMÁN, M. A. Application of solid-state fermentation to ligninolytic enzyme production. **Biochem Eng J**, v. 22, p. 211-219, 2005.
- ROGALINSKI, T.; INGRAN, T.; BRUNNER, G. Hydrolysis of lignocellulosic biomass in water under elevated temperatures and pressures. **J Supercrit Fluids**, v. 47, p. 54-63, 2008.
- ROTH, M.T.P., RESENDE, F.D., Reis, R.A., Siqueira, G.R., FARIA, M.H., BERCHIELLI, T.T. Performance and carcass characteristics of beef cattle fed

- with ammoniated marandugrass hay. **Rev Bras Zootec/ Braz J Ani Sci**, v. 38, p. 1847-1855, 2009.
- SAMSON, R.A., HOEKSTRA, E.S., FRISVAD, J.C., FILTENBORG, O. **Introduction to food-born fungi**. Centraalbureau Voor Schimmelcultures. Ed. 4, 1995.
- SANDRIM, V.C.; RIZZATTI, A.C.S.; TERENCEI, H.F.; JORGE, J.A.; MILAGRES, A.M.F.; POLIZELI, M.L.T.M. Purification and biochemical characterization of two xylanases produced by *Aspergillus caespitosus* and their potential for kraft pulp bleaching. **Process Biochem**, 40:1823-1828, 2005.
- SANTOS, A.S.R. Biodiversidade, bioprospecção, conhecimento tradicional e o futuro da vida, 2001. Disponível em: [www.ccuec.unicamp.br/revista/infotec/artigos/silveira.html](http://www.ccuec.unicamp.br/revista/infotec/artigos/silveira.html). Acesso em 08/11/2009.
- SANTOS, E.A., SILVA, D.S., FILHO, J.L.Q. Composição Química do Capim-Elefante cv. Roxo Cortado em Diferentes Alturas. **Rev bras zootec**, v. 30, n. 1, p. 18-23, 2001.
- SANYAL, A., KUNDU, R.K., SINHA, S. N., DUBE, D. K. Extracellular cellulolytic enzyme system of *Aspergillus japonicus*: 1. Effect of different carbon sources **Enz Microb Technol**, v. 10, 1988.
- SAS Institute, SAS User's Guide: Statistics (Release 8.01). SAS Inst. Inc., Cary NC, 2002.
- SCREENATH, H.K. e JEFRIES, T.W. Production of ethanol from wood hydrolysate by yeasts. **Bioresour Technol**, v. 72, p. 253-260, 2000.
- SEMENOVA, M. V.; GRISHUTIN, S. G.; GUSAKOV, A. V.; OKUNEV, O. N.; SINITSYN, A. P. isolation and properties of pectinases from the fungus *Aspergillus japonicus*. **Biochemistry** (Moscow), v. 68, nº. 5, p. 559-569, 2003.
- SHAH, A. R. e MADAMWAR, D. Xylanase production under solid-state fermentation and its characterization by an isolated strain of *Aspergillus foetidus* in India **World J Microbiol Biotechnol.**, v. 21, p. 233-243, 2005.
- SHARMA, S.; BHAT, T.K; DAWRA, R.K. A spectrophotometric method for assay of tannase using rhodanine. **Anal Biochem**, v. 279, p. 85-89, 2000.
- SILVA, D.J. **Análise de alimentos (métodos químicos e biológicos)**. Viçosa. Universidade Federal de Viçosa, 1990.
- SILVA, D.; MARTINS, E. S.; DA SILVA, R.; GOMES, E. Pectinase production by *Penicillium viridicatum* RFC3 by solid state fermentation using agricultural wastes and agro-industrial by-products. **Braz J Microbiol**, v. 33, p. 318-324, 2002.
- SILVA, R.; GOMES, E. Ligninases; Capítulo; Enzimas como Agentes Biotecnológicos; S. Said; R.C.L.R. Pietro; 1; Legis Summa; Ribeirão Preto, cap. 19, 2004.
- SILVA, T. M.; GUIMARÃES, L.H.; JORGE, J.A.; TERENCEI, H.F.; POLIZELI, M.L.T.M. Amylase production in submerged fermentation by the filamentous fungus *Aspergillus niveus*. **XXXV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular**, p.80, 2006.

- SILVEIRA, F. Q. P.; SOUZA, M.V. RICART, C.A.O.; MILAGRES, A.M.F.; MEDEIROS, C.L.; FILHO, E.X.F. A new xylanase from a *Trichoderma harzianum* strain. **J Ind Microbiol**, 23, 682–685, 1999.
- Site: <http://sinbiota.cria.org.br>. Acesso em 21/01/2008.
- SOCOL, R.S. e VANDERBERGHE, L.P.S. Overview of applied solid-state fermentation in Brazil. **Biochem Eng J**, v.13, p. 205-218, 2003.
- SUBRAMANIAN, S.; VAUGHN, K.; CARRIER, D.J.; CLAUSEN, E.C. Pretreatment of milk thistle seed to increase the silymarin yield: An alternative to petroleum ether defatting. **Bioresour Technol**, v. 99, p. 2501-2506, 2008.
- SUKUMARAN, R.K.; SINGHANIA, R.R.; MATHEW, G.M.; PANDEY, A. Cellulase production using biomass feed stock and its application in lignocellulose saccharification for bio-ethanol production, **Renewable Energy**, v.34, p.421-424, 2009.
- SUN, Y. e CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. **Bioresour Technol**, v. 83, p. 1-11, 2002.
- SUN, S.Y. e XU, Y. Solid-state fermentation for whole-cell synthetic lipase production from *Rhizopus chinensis* and identification of functional enzyme. **Process Biochem**, v. 43, p. 219-224, 2008.
- SZAKACS, G.; e TENGEDY, R.P. Lignocellulolytic enzyme production on pretreated poplar wood by filamentous fungi. **Word J Microbiol Biotechnol**, v. 13, p. 487-490, 1997.
- TECHAPUN, C.; POOSARAN, N.; WATANABE, M.; SASAKI, K. Thermostable and alkaline-tolerant microbial cellulose-free xylanases produced from agricultural wastes and the properties required for use in pulp bleaching bioprocesses: a review. **Process Biochem**, v. 38, p. 1327-1340, 2003.
- TEIXEIRA, J.C. **Nutrição de ruminantes**. Escola Superior de Agricultura de Lavras. Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Extensão. Lavras, p. 239, 1992.
- TEIXEIRA, M. F. S.; FILHO, J. L. L.; DURÁN, N. Carbon sources effect on pectinase production from *Aspergillus japonicus* 586 **Braz J Microbiol**, v.31, p. 286-290, 2000.
- THEODOROU, M. K.; WILLIAMS, B. A.; DHANOA, M. S.; McALLAN, A. B.; FRANCE, J. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetic of ruminant feeds. **Anim Feed Sci Technol**, v. 48, n. 2, p. 185-197, 1994.
- TILLEY, J.M.A. e TERRY, R.A. A two-stage technique for the *in vitro* digestion of forage crops. **J. Brit. Soc.**, v.18, p.104-111, 1963.
- TITI, H.H. e TABBAA, M.J. Efficacy of exogenous cellulose on digestibility in lambs and growth of dairy calves. **Live Prod Sci**, v.87, p.207-214, 2004.
- TREVISAN, H.C. "Lipases". In: SAID, S. & PIETRO, R.C.L.R. **Enzimas como agente Biotecnológico**. 1. ed. Ribeirão Preto: Editora Legis Summa, p. 115-135, 2004.

- UGWUANYI, J.O. Yield and protein quality of thermophilic *Bacillus* spp. biomass related to thermophilic aerobic digestion of agricultural wastes for animal feed supplementation. **Bioresour Technol**, v.99, p.3279–3290, 2008.
- VAN SOEST, P.J. **Integrated feeding systems. In: Nutritional ecology of the ruminant.** 2<sup>a</sup> ed. Ithaca, Cornell University Press, p. 140-55, 1994.
- VARGA, G.A. e KOLVER, E.S. Microbial and Animal Limitations to Fiber Digestion and Utilization. **J Nutri.** v. 127, n<sup>o</sup> 5, p. 819S-823S, 1997.
- VICI, A. C. **Estudos de lipases produzidas pelos fungos Ascomycota *Aspergillus niger*, *Cordyceps brongniartii* e *Penicillium purpurogenum*.** Monografia para bacharel em Ciências Biológicas, 2008.
- VOGEL, H. F. Distribution of lysine pathway among fungi: evolutionary implications. **Am Nat**, v. 98, p. 435-446, 1964.
- VORA, K.A., BHANDARE, S.S., PRADHAN, R.S., AMIN, A.R., MODI, V.V. Characterization of extracellular lipase produced by *Aspergillus japonicus* in response to *Calotropis gigantea* latex. **Biotechnol Appl Biochem**, v. 10, n<sup>o</sup>5, p. 465-472, 1988.
- WAKIYAMA, M.; YOSHIHARA, K.; HAYASHI, S.; OHTA, K. Purification and properties of an extracellular  $\alpha$ -xylosidase from *Aspergillus japonicus* and sequence analysis of the encoding gene, **J Biosci Bioeng**, v. 106, n<sup>o</sup>. 4, p. 398–404, 2008.
- WANG, H. T. e HSU, J.T. Optimal protease production condition for *Prevotella ruminicola* 23 and characterization of its extracellular crude protease. **Anaerobe**, v.11, p.155-162, 2005.
- WEN, Z.; LIAO, W.; CHEN, S. Production of cellulase by *Trichoderma reesei* from dairy manure. **Bioresour Technol** 96, 491–499, 2005.
- WHANG e ZHOU, Isolation and identification of a novel *Aspergillus japonicus* JN19 producing  $\beta$ -fructofuranosidase and characterization of enzyme. **J Food Biochem**, v.30, p. 641–658, 2006.
- WHITMIRE, D.; MITI, B. Xylanase effects on pulp delignification. **Chem Eng Comm**, v.189, n<sup>o</sup>5, p. 608-622, 2002.
- WILSON, J.R. e MERTENS, D.R. Cell wall accessibility and cell structure limitations to microbial digestion of forage. **Crop Sci**, Madison, v. 35, p. 251-259, 1995.
- WISEMAN, A. **Handbook of enzyme biotechnology.** Ellis Horwood Ltd John Wiley & Sons, p.148, 1975.
- WU, Y.; ZHANG, S.; GUO, X.; HUANG, H. Adsorption of chromium (III) on lignin. **Bioresour Technol**, v.99, n<sup>o</sup>16, 7709-7715, 2008.
- WUBAH, D.; AKIN, D.; BORNEMAN, W. Biology, fiber-degradation and enzymology of anaerobic zoosporic fungi. **Crit Rev Microbiol**, v. 19, p. 99-115, 1993.
- YANG, W.Z.; BEAUCHEMIN, K.A.; RODE, L.M. Effects of fibrolytic enzyme additives on milk production of dairy cows. **J Anim Sci**, v.76, p. 320, 1999.

- YANG, W.Z., BEAUCHEMIN, K.A., RODE, L.M. A comparison of methods of adding fibrolytic enzymes to lactating cow diets. **J Dairy Sci**, v. 83, p. 2512–2520, 2000.
- YANG, X., CHEN, H., GAO, H., LI, Z. Bioconversion of corn straw by coupling ensiling and solid-state fermentation. **Bioresour Technol**, v.78, p.277-280, 2001
- YANG, S.Q., YAN, Q.J., JIANG, Z.Q., LI, L.T., TIAN, H.M., WANG, Y.Z. High-level of xylanase production by the thermophilic *Paecilomyces thermophila* J18 on wheat straw in solid-state fermentation **Bioresour Technol** 97 1794–1800, 2006.
- YIN, Q.Q.; ZHENG, Q.H.; KANG, X.T. Biochemical characteristics of phytases from fungi and the transformed microorganism. **Anim Feed Sci Technol**, v.132, p.341–350, 2007.
- YU, P.; MCKINNON, J.J.; CHRISTENSEN, D.A. Improving the nutritional value of oat hulls for ruminant animals with pretreatment of multienzyme cocktail: in vitro studies. **J Anim Sci**, v. 83, p. 1113-1141, 2005.
- ZANDONÁ FILHO, A. **Modificação das qualidades processuais de fibras celulósicas através do uso de enzimas. Curitiba.** Tese de doutorado em processo Biotecnológicos, Setor de tecnologia, Universidade Federal do Paraná. 2001.
- ZAWADI, A. CHIPETA, Z.A. ; PREEZ, J.C.; CHRISTOPHER, L. Effect of cultivation pH and agitation rate on growth and xylanase production by *Aspergillus oryzae* in spent sulphite liquor. **J Ind Microbiol Biotechnol**. 35:587–594, 2008.
- ZHANG, Y.H., HIMMEL, M. E., MIELENZ, J. R. Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies – Review **Biotechnol Adv**, v.24, p.452–481, 2006.
- ZHANG, Q.; LO, C-M.; JU, L-K. Factors affecting foaming behavior in cellulase fermentation by *Trichoderma reesei* Rut C-30. **Bioresour Technol**, v. 98, p. 753-760, 2007.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)