

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

**PRODUÇÃO E AVALIAÇÃO DE ENZIMAS FIBROLÍTICAS
EXÓGENAS NA ENSILAGEM DE MILHO**

Erika Christina Lara

Zootecnista

2013

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

**PRODUÇÃO E AVALIAÇÃO DE ENZIMAS FIBROLÍTICAS
EXÓGENAS NA ENSILAGEM DE MILHO**

Erika Christina Lara

Orientador: Ricardo Andrade Reis

**Dissertação apresentada à Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp,
Câmpus de Jaboticabal, como parte das
exigências para a obtenção do título de
Mestre em Zootecnia.**

2013

Lara, Erika Christina
L318p Produção e avaliação de enzimas fibrolíticas exógenas na
 ensilagem de milho / Erika Christina Lara. – – Jaboticabal, 2013
 iv, 73 p. : il. ; 28 cm

 Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2013
 Orientador: Ricardo Andrade Reis
 Banca examinadora: Izabelle Auxiliadora Molina de Almeida
Teixeira, Simone de Carvalho Peixoto Nogueira
 Bibliografia

 1. Celulases 2. Silagem de milho. 3. Xilanases. I. Título. II.
Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 636.085.52:633.15

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação –
Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

CAMPUS DE JABOTICABAL

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS DE JABOTICABAL

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: PRODUÇÃO E AVALIAÇÃO DE ENZIMAS FIBROLÍTICAS EXÓGENAS NA ENSILAGEM DE MILHO

AUTORA: ERIKA CHRISTINA LARA

ORIENTADOR: Prof. Dr. RICARDO ANDRADE REIS

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE EM ZOOTECNIA , pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. RICARDO ANDRADE REIS

Departamento de Zootecnia / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

Profa. Dra. IZABELLE AUXILIADORA M. DE ALMEIDA TEIXEIRA

Departamento de Zootecnia / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

Profa. Dra. SIMONE DE CARVALHO PEIXOTO NOGUEIRA

Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto / USP / Ribeirão Preto/SP

Data da realização: 30 de julho de 2013.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

ERIKA CHRISTINA LARA – nascida em 1 de outubro de 1985, na cidade de Ribeirão Preto (SP), filha de Jackson Lara e Maria Cristina Cyrino de Oliveira Lara, ingressou no curso de Zootecnia da UNESP – Campus de Jaboticabal em fevereiro de 2006, graduando-se em dezembro de 2010. Realizou estágio obrigatório durante seis meses na Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto (FFCLRP) no departamento de microbiologia, sob orientação da Prof^a. Dr^a. Maria de Lourdes T. M. Polizeli. Em março de 2011 ingressou no Curso de Pós-Graduação em Zootecnia, nível de Mestrado na UNESP - campus de Jaboticabal, obtendo o título de mestre em Julho de 2013, onde foi bolsista pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) durante 24 meses. Durante quatro meses (20/10/2012 a 20/10/2013) realizou estágio no Agriculture and Agri-Food Canada Research Centre, na cidade de Lethbridge – Alberta/ Canadá, onde foi bolsista FAPESP pelo programa de bolsa de estágio no exterior (BEPE), sob orientação da Prof^a. Dr^a Karen A. Beauchemin.

Viver é enfrentar desafios. Quem nunca enfrentou desafios, apenas passou pela vida, não viveu. Sim, todo mundo quer uma vida tranquila e estável, mas não se consegue isso sem luta, esforço e muita coragem. E ninguém quer uma vida medíocre, sem sal nem açúcar. Definitivamente, isso não é coisa que engrandece a alma. Mas se quiseres seguir adiante com glória, tenha ciência de que às vezes é necessário mudar a estratégia do jogo radicalmente. Você poderá perder muitas peças e muitas batalhas no caminho. E não importa o quanto você sofra, o quanto você apanhe. Você precisa reunir suas forças e seguir em frente. Mesmo que tudo pareça perdido, não esqueça: na vida, assim como num jogo de Xadrez, enquanto você estiver de pé e lutando, nada estará perdido. Basta que você mantenha o Espírito e siga em frente.

Augusto Branco

*Engana-se quem pensa que busco o sucesso,
Na verdade o que eu busco é SER FELIZ!*

DEDICATÓRIA

Dedico esta obra a todos que comigo conviveram por todos esses anos,
aos que passaram pela minha vida e deixaram, mesmo que hoje esquecido,
um momento de felicidade, de amor, carinho, solidariedade e paz,
que fizeram de mim quem eu sou hoje.
À minha família, dedico muito mais, dedico minha vida,
o ar que respiro e cada dia que vivo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus e à Sta. Terezinha do menino Jesus pelos momentos de paz e reflexão, pela benção sempre concedida e pela vida que me foi dada.

Agradeço aos meus pais Jackson e Cristina, minha avó Hilda, meu irmão Arthur e à avó falecida Alaide, por terem me concedido tanta felicidade, por eu ter tido a melhor vida que eu poderia ter, pelos melhores momentos, pelas melhores lembranças, pela melhor educação. Obrigada por tamanha paciência nas horas mais difíceis e, por me ajudarem a enxergar sempre o lado positivo de qualquer situação, obrigada pelo apoio, confiança e atenção.

Ao meu noivo Fernando, obrigada por esses 5 anos juntos, por todos os momentos de felicidade e tristeza, que fizeram da gente o casal mais amadurecido e cheio de conquistas e sonhos realizados. Obrigada pela atenção nos momentos difíceis, por me entender mesmo sem entender, pelos abraços apertados e por rir do meu choro muitas vezes bobo. Obrigada por existir em minha vida.

Aos meus cachorros Eros, Shira, Zuca e Jingle (Falecida), pelos momentos de intenso prazer, fofura e companherismo, fazem da minha vida uma alegria.

Aos meus queridos amigos Inaê, Livia, Alana, Carol, Aline (Vírgula), Aline (Cunhada), Dani (Cunhada), Elisa (Prima), Fernanda (prima) pela longa e sincera amizade, pelos momentos de relax e desabafos, seguidos de muita risada.

Ao Prof. Ricardo Reis, pela orientação, confiança e paciência durante todos esses anos que convivemos juntos.

À Prof. Maria de Lourdes pelo apoio, ensinamentos e confiança.

Aos amigos que encontrei no caminho e que me ajudaram a concluir esse trabalho : Simone Peixoto, Aline Zorzetto, Mariana Cereia, Fessor, Fernanda, Carlos, Heloisa, Mafioso, Fábio, Rampera, Marcela, Cural, Maria Fernanda, Luana, Nandinho.

À FAPESP pelo apoio e concessão da bolsa de mestrado (Processo 2011/04676-3) e bolsa de estágio de pesquisa no exterior BEPE (Processo 2012/14626-6).

À FCAV por proporcionar toda a estrutura para desenvolvimento do trabalho.

À USP-FFCLRP onde foi desenvolvida parte desta pesquisa

À todos que direta ou indiretamente colaboraram para a realização desse trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO	iii
Palavras-chave	iii
ABSTRACT	iv
Keywords	iv
CAPITULO 1 – Considerações gerais	1
1. Introdução	1
2. Revisão de literatura	2
2.1. Parede celular das plantas e seus componentes principais	2
2.1.1. Celulose	4
2.1.2. Hemicelulose	4
2.1.3. Lignina	6
2.2. Enzimas fibrolíticas	7
2.3. <i>Aspergillus niger</i>	9
2.4. Sistemas enzimáticos em estudo	10
2.4.1. Sistema celulolítico	10
2.4.2. Sistema xilanolítico	11
2.5. Uso de enzimas fibrolíticas em silagem de milho	13
2.6. Variabilidade de resultados	15
3. Referências	17
CAPITULO 2 – SELEÇÃO DE FUNGO PRODUTOR DE XILANASES E CELULASES, E AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DAS ENZIMAS EM CONDIÇÕES RUMINAIS	24
RESUMO	24
1. Introdução	25
2. Material e métodos	26
2.1. Coleta e isolamento de fungos	26
2.2. Obtenção de culturas por fermentação submersa e determinação da atividade enzimática dos diferentes microrganismos	28
2.3. Otimização das condições de cultivo e produção de enzimas fibrolíticas exógenas	30
2.4. Teste da estabilidade da enzima no ambiente ruminal	31
2.5. Análise dos resultados	32
3. Resultados	33
3.1. Coleta, isolamento e determinação da atividade enzimática dos diferentes fungos isolados	33
3.2. Otimização das condições de cultivo e produção de enzimas fibrolíticas exógenas	36
3.3. Teste da estabilidade da enzima no ambiente ruminal	39

4. Discussão	41
5. Conclusão	45
6. Referências	45
CAPITULO 3 – AVALIAÇÃO DE ENZIMAS FIBROLÍTICAS EXÓGENAS NA COMPOSIÇÃO QUÍMICA, PERFIL FERMENTATIVO E ESTABILIDADE AERÓBIA DE SILAGEM DE MILHO	49
RESUMO	49
2. Introdução	50
2. Material e métodos	51
2.1. Ensilagem e Fermentação	52
2.2. Avaliação da estabilidade aeróbia	55
2.3. Análise estatística	55
3. Resultados	56
3.1. Perfil fermentativo	56
3.2. Estabilidade aeróbia	62
4. Discussão	64
5. Conclusões	69
6. Referências	69

PRODUÇÃO E AVALIAÇÃO DE ENZIMAS FIBROLÍTICAS EXÓGENAS NA ENSILAGEM DE MILHO

RESUMO – O presente trabalho avaliou a produção de enzimas fibrolíticas exógenas obtidas a partir da fermentação fúngica e sua aplicação em diferentes doses na ensilagem de milho. Para isso, o projeto foi dividido em dois experimentos, sendo o primeiro caracterizado pela produção de enzimas e sua estabilidade em condições ruminais. Cinco amostras de diferentes locais foram coletadas e 45 fungos foram isolados e avaliados quanto a produção de xilanases e celulases. O micro-organismo selecionado como o melhor produtor foi um *Aspergillus niger*, capaz de produzir significativas quantidades das enzimas de interesse neste estudo (7,04 e 0,09 U/mL de xilanases e celulases, respectivamente). Após, seguiu-se um ensaio de otimização das condições de cultivo do fungo e avaliação da atividade enzimática buscando a máxima produção das enzimas de interesse. As condições ótimas de pH e temperatura de reação das enzimas em estudo corresponderam a 4,6 e 3,6 para as xilanases e celulases, respectivamente, com temperatura ótima de 60°C em ambas as enzimas. A maior produção de xilanases ocorreu com 96 e 168 horas na fermentação submersa com ou sem agitação, respectivamente. Na produção de celulases os maiores níveis enzimáticos foram observados com 120 horas de cultivo nas duas condições de crescimento (submersa com ou sem agitação). A concentração ideal de esporos a ser inoculado no meio foi de $1,5 \times 10^7$ e 5×10^7 esporos/mL nas xilanases e celulases, especificamente. O teste de estabilidade das enzimas no rúmen mostrou maior atividade de xilanases nos animais que receberam o extrato enzimático via cânula até 7 horas após a aplicação. O segundo experimento avaliou a aplicação de diferentes doses enzimáticas sobre o perfil fermentativo, composição química e estabilidade aeróbia de silagem de milho. A planta de milho foi colhida quando apresentou 27% de matéria seca e dividida em quatro tratamentos (Controle – Sem adição de enzimas; E1: Ensilagem com 5,0 mL de extrato enzimático/Kg de forragem; E2: Ensilagem com 10,0 mL de extrato enzimático/Kg de forragem; E3: Ensilagem com 15,0 mL de extrato enzimático/Kg de forragem). O extrato enzimático utilizado continha 20,59U/mL de xilanases e 1,04U/mL de celulases, e foi produzido de acordo com as condições determinadas no experimento 1 e inoculado na planta de milho picada no momento da ensilagem. Baldes experimentais foram utilizados como mini silos, sendo abertos após 2, 7, 14, 21 e 60 dias para avaliação das silagens. Os baldes referentes à 60 dias de fermentação foram abertos, amostrados e submetidos à avaliação da estabilidade aeróbia após 1, 3 e 5 dias da abertura. A adição de diferentes doses de enzimas na ensilagem de milho não melhorou as características fermentativas das silagens avaliadas, porém proporcionou pequenas alterações no conteúdo de fibra das mesmas. As silagens que receberam enzimas apresentaram menores teores de hemicelulose após 2 e 14 dias de fermentação e baixo conteúdo de celulose após 60 dias. Efeito significativo foi verificado no conteúdo de carboidratos solúveis no início da fermentação da silagem e nenhum efeito verificado na degradabilidade e produção de gás *in vitro*. A adição de enzimas não alterou o pH e ocorrência de microrganismos no pós abertura. A silagem que recebeu a maior dose enzimática foi a que apresentou maior estabilidade aeróbia.

Palavras-chave: Celulases, perfil fermentativo, silagem de milho, xilanases

PRODUCTION AND EVALUATION OF EXOGENOUS FIBROLYTIC ENZYMES AT ENSILING OF MAIZE

ABSTRACT - The objective of this study was to evaluate the exogenous fibrolytic enzymes production by fungal fermentation and the application in different doses at ensiling of maize. The project was divided into two sub projects, the first was characterized by enzymes production and their stability in rumen conditions. Five samples were collected from different locations and 45 fungi were isolated and evaluated for xylanases and cellulases production. Among the micro-organism selected as the best producer was a *Aspergillus niger*, capable to produce significant quantities of interest enzymes in this study (7,04U/mL and 0,088U/mL of xylanases and cellulases, respectively). After, followed by a test optimization of cultivate conditions the fungus and enzymatic activity seeking maximum production of the interest enzymes. Optimal conditions of pH and temperature to enzymes reaction in this study corresponded to 4.6 and 3.6 for xylanase and cellulase, respectively, with optimum temperature of 60 ° C for both enzymes. The highest xylanases production occurred at 96 and 168 hours by submerged fermentation with or without agitation, respectively. Higher cellulase production was observed in 120 hours of cultivate in two growth conditions (submerged with or without agitation). Optimal concentration of spores in the medium to be inoculated was 1.5×10^7 and 5×10^7 spores / ml for xylanases and cellulases, specifically. Stability test of the enzymes in the rumen showed a greater xylanase activity in animals that received the enzyme extract via cannula until 7 hours after application. The second experiment evaluated the application of different levels of enzymes at ensiling of maize on the fermentation characteristics, chemical composition and aerobic stability of corn silage. The plant corn was harvested with 27% of dry matter and divided into four treatments (control - without enzymes, E5 - Silage with 5.0 mL of enzyme extract / kg of forage; E10 - Silage with 10.0 mL of enzymatic extract / kg of forage; E15 - Silage with 15.0 mL of enzymatic extract / kg of forage). The enzymatic extract was produced according to conditions determined in experiment 1 and inoculated in maize plant chopped at the time of ensiling. Enzymatic extract used had 20,59U/mL of xylanases and 1,04U/mL of cellulases, produced according to conditions determined in experiment 1 and inoculated in maize plant chopped at the time of ensiling. Buckets were used as experimental mini silos being opened after 2, 7, 14, 21 and 60 days for evaluation the silages. Buckets referring to 60 days of fermentation were opened, sampled and evaluated for aerobic stability after 1, 3 and 5 days of air exposition. The addition of different levels of enzymes at ensiling of maize plant did not improve fermentation characteristics of silages evaluated, but provided little change in fiber content. Silages that received enzymes showed lower hemicellulose level after 2 and 14 days of fermentation and low cellulose content after 60 days. Higher content of soluble carbohydrates at the beginning of the fermentation of the silage was found, however, no effect was observed on in vitro degradability and gas production. The addition of enzymes did not change the pH and occurrence of the microorganisms after silo opening. Silage that received the highest dose of enzyme showed highest aerobic stability.

Keywords: Cellulases, fermentative profile, maize silage, xylanases

CAPITULO 1 – Considerações gerais

1. Introdução

A utilização de microrganismos, em especial os fungos, para produção de enzimas fibrolíticas para o tratamento de forragem, apresenta vantagens, tais como seu rápido crescimento em meio de cultivo e alta produção enzimática. Além disso, esses microrganismos obtêm energia liberando enzimas digestivas para o meio extracelular, o que possibilita o processo de obtenção dessas moléculas.

A adição de enzimas fibrolíticas nas dietas de ruminantes tem como objetivo aumentar a digestibilidade da fração fibrosa dos alimentos. Enzimas como xilanases e celulasas aumentam a degradação da hemicelulose e celulose da forragem, respectivamente, proporcionando maior liberação de energia e melhor aproveitamento pelo animal.

Porém, as enzimas utilizadas como aditivos em dietas para ruminantes nem sempre são aplicadas para esse fim, sendo na sua maioria, fabricadas para indústria alimentícia, têxteis, papel e biocombustível. Assim, em condições ruminais, essas enzimas podem não apresentar seu potencial de degradação da parede celular, isso devido à temperatura, pH e microflora encontradas no rumen.

Outro modo de aplicação das enzimas é na ensilagem, com o objetivo de liberar maiores conteúdos de carboidratos solúveis para as bactérias desejáveis, melhorando o perfil fermentativo na fase de fermentação e a qualidade final da silagem. Entretanto, estudos que testaram a adição direta destas enzimas na ensilagem ou na dieta apresentam grande variabilidade de resultados, dificultando a comparação entre estudos e a validação da eficácia do produto.

Os objetivos do presente estudo foram selecionar um fungo produtor de altas quantidades de xilanases e celulasas e otimizar o sistema de produção dessas enzimas; avaliar a estabilidade enzimática em condições ruminais e estudar o efeito da adição de diferentes doses de enzimas na ensilagem de milho.

2. Revisão de literatura

2.1. Parede celular das plantas e seus componentes principais

A parede celular vegetal pode ser dividida em paredes primária, secundária e terciária (Figura 1). As duas primeiras camadas são as mais importantes e mais estudadas. Wilson (1993) caracterizou a parede terciária como uma camada membranosa extremamente delgada, localizada internamente (superfície luminal) à parede secundária. A parede primária desenvolve-se simultaneamente à expansão celular e em alguns tipos de células, como as do parênquima, esta é a única parede a se desenvolver. As paredes primárias de duas células contíguas são separadas por uma fina camada conhecida por lamela média, composta, principalmente, de substâncias pécicas. De acordo com Wilson (1993), a parede primária possui espessura média variando de 0,1 a 0,2 μm .

A parede secundária desenvolve-se internamente à parede primária, após completar-se a expansão da célula. Esta parede compreende três camadas (S1, S2 e S3), distinguidas pela orientação das microfibrilas de celulose. Não há evidências de digestão diferente destas camadas. A parede secundária com espessura variando de 1 a 5 μm confere à célula resistência às forças de tensão e compressão. Geralmente, os tipos celulares que apresentam parede secundária se lignificam em maior ou menor grau (WILSON, 1993), afetando a digestibilidade.

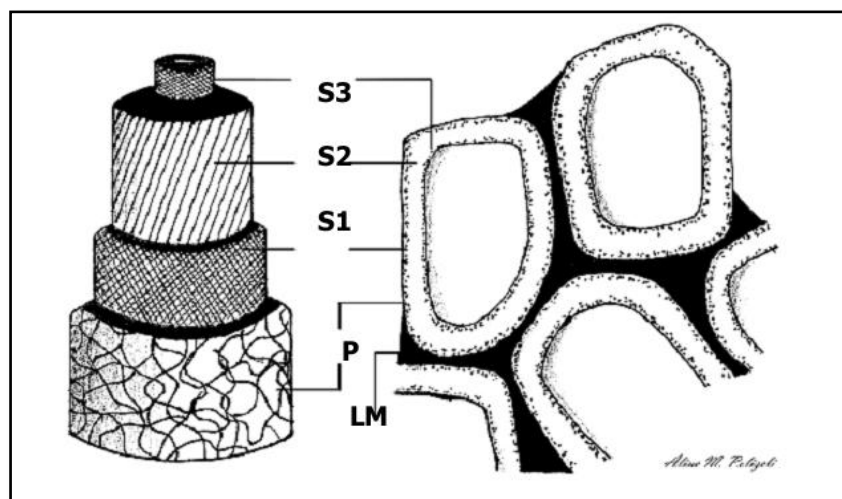


Figura 1. Esquema básico da estrutura da parede celular de madeiras moles e de madeiras duras. LM - lamela média; P - parede celular primária e camadas da parede celular secundária S1, S2 e S3 (modificado de Polizeli, 2008b)

Segundo Brito et al. (1999), os tecidos vegetais apresentam potencial de digestão diferenciados, do que decorre a proporção de tecidos e o valor nutritivo de gramíneas forrageiras. Em termos gerais, as células do mesofilo e as do floema de parede celular delgada são rapidamente digeridas (AKIN et al., 1973). As células da epiderme e da bainha parenquimática dos feixes são reconhecidas como de digestão lenta e parcial. Tecidos como esclerênquima e o xilema, que apresentam parede celular espessa e lignificada, são muito pouco digeridos (AKIN, 1989) (Tabela 1).

Tabela 1. Digestão relativa dos tecidos vegetais em plantas de clima temperado e tropical

Fração/Origem	Digestão relativa dos tecidos ¹		
	Rápida	Lenta e parcial	Não digerido
Folha/Tropicais	MES e FLO	EPI e BPF	XIL e ESC
Folha/Temperadas	MÊS, FLO, EPI e BPF (depende da espécie)	BPF (depende da espécie) e ESC	XIL e BIF
Colmo/Gramíneas	FLO e PAR (imaturo)	PAR (meia idade)	EPI e ESC (anel)

¹MES- mesofilo; FLO- floema; EPI- epiderme; BPF- bainha parenquimática dos feixes; ESC- esclerênquima; XIL- xilema; BIF- bainha interna dos feixes; PAR- parênquima. Fonte: Adaptada de AKIN, 1989.

Quimicamente, a parede celular é uma matriz complexa composta de polissacarídeos, proteínas, compostos fenólicos, água e minerais. Dos polissacarídeos, destacam-se a celulose, a hemicelulose e a pectina. Existem fortes evidências de que os polissacarídeos isolados apresentam relativa facilidade de degradação pelos microrganismos do rúmen ou por enzimas isoladas (HATFIELD, 1989). Entretanto, a degradação desses polissacarídeos, quando presentes na parede celular, raramente é completada. A extensão da degradação varia conforme o tecido examinado, a espécie e a idade da planta. As interações dos componentes da parede, particularmente entre os polifenóis e os carboidratos, exercem as maiores restrições à degradação da parede celular (JUNG, 1989).

2.1.1. Celulose

A celulose, o componente orgânico mais abundante da biomassa, é encontrado na natureza, quase que exclusivamente na parede celular vegetal, correspondendo aproximadamente a 35-50% do peso seco das plantas, com teor de 50 a 80 e de 20 a 30% na massa seca da parede secundária e primária, respectivamente (LYND et al., 2002).

Na natureza a celulose não ocorre na forma pura e, em qualquer fonte natural, mesmo fibras de algodão, que são a forma mais pura de celulose prontamente disponível, contêm cerca de 10% de materiais não celulósicos, proteínas e elementos minerais. Este polímero formado por glicose com ligações do tipo β -1,4, encontra-se associado com uma variedade de outros polissacarídeos como (BISARIA & GHOSE, 1981).

Em sua estrutura, a celulose apresenta regiões altamente ordenadas, de forma cristalina, 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 & ZEEMAN, 2009).

Uma característica importante se deve ao fato das moléculas componentes das microfibrilas individuais serem empacotadas de forma coesa para evitar a penetração não só de enzimas, mas de moléculas tão pequenas quanto a água. As regiões amorfas podem apresentar vários tipos de irregularidades tais como: micro poros, depressões, rachaduras e torções, tais regiões são alvos de enzimas hidrolíticas (BLOUIN et al., 1970).

2.1.2. Hemicelulose

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 (DILLON, 2004).

Segundo Bastawde (1992), as hemiceluloses são classificadas com base nos resíduos de açúcar da cadeia principal, sendo a maioria heteropolissacarídeos com

2.1.3. Lignina

A lignina, que também faz parte da parede celular, tem sido constantemente responsabilizada como um dos fatores limitantes da digestibilidade da planta (JUNG, 1989). Este composto constitui-se de polímeros condensados de diferentes álcoois fenilpropanóides cujos precursores (Figura 2) são o p-coumárico, coniferílico e o sinapílico, além do ácido ferúlico, unidos por ligações do tipo éter ou ligações covalentes entre os núcleos benzênicos ou aliados aos radicais propano (FERREIRA, 1994).

Os termos core e non-core (Figura 3) têm sido usados por alguns autores para diferenciar tipos de lignina em forrageiras (GORDON, 1975; JUNG & DEETZ, 1993). O primeiro tipo (lignina core) refere-se ao polímero de fenilpropanóides depositado na parede celular, pela polimerização dos álcoois precursores coniferil, sinapil e p-coumaril. A lignina non-core representa os ácidos fenólicos p-coumárico e ferúlico (e seus dímeros) depositados na parede celular durante sua formação. Estes ácidos podem estar ligados à lignina core, aos polissacarídeos ou a ambos, simultaneamente (JUNG, 1989).

Embora as gramíneas apresentem menores teores de lignina que as leguminosas, as correlações negativas com a digestibilidade são mais fortes em gramíneas. A explicação pode estar na maior concentração de hemicelulose. Como a lignina se liga covalentemente à hemicelulose, seu efeito seria mais prejudicial à digestibilidade das gramíneas que das leguminosas (VAN SOEST, 1994).

Além disso, à medida que a idade fisiológica da planta avança, aumentam as porcentagens de celulose, hemicelulose e lignina, reduzindo a proporção dos nutrientes potencialmente digestíveis (carboidratos solúveis, proteínas, minerais e vitaminas), que representam uma queda acentuada na digestibilidade (REIS et al., 2005). Além do aumento da concentração de fibra nas hastes e na maioria das folhas, a concentração de fibras também é maior na forragem total devido ao decréscimo da relação folha/haste, decorrente da maturidade das plantas (BUXTON & REDFEARN, 1997).

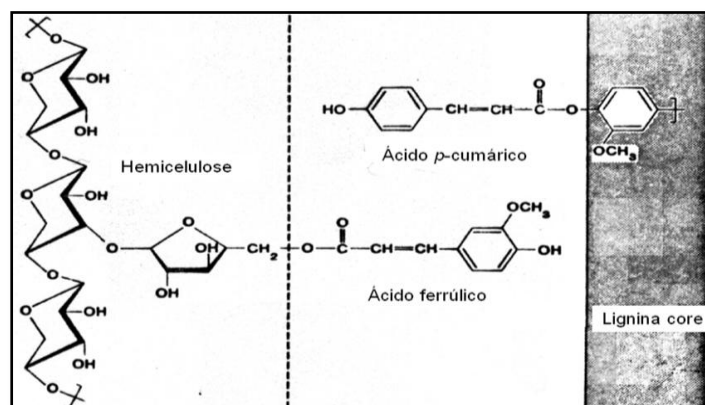


Figura 3. Ligações de ácidos p-cumárico e ferúlico com componentes da parede celular (JUNG, 1989).

Segundo Jung & Deetz (1993), a lignificação da parede celular pode limitar a digestão dos polissacarídeos por meio de três possíveis mecanismos: 1) efeito tóxico de componentes da lignina (ácido coumárico, p-coumarico) aos microrganismos do rúmen; 2) impedimento físico causado pela ligação lignina-polissacarídeo, que limita o acesso das enzimas fibrolíticas ao centro de reação de um carboidrato específico; e 3) limitação da ação de enzimas hidrofílicas causada pela hidrofobicidade criada pelos polímeros de lignina.

2.2. Enzimas fibrolíticas

As forragens são as principais fontes de energia para os ruminantes e são compostas principalmente por celulosas e hemiceluloses, que são hidrolisadas no rúmen pela ação de enzimas provenientes de bactérias, fungos e protozoários (SCHINGOETHE et al., 1999). No entanto, a degradação dos substratos é lenta e incompleta, o que diminui a disponibilidade de energia e proteínas para os ruminantes, prejudicando o desempenho animal, com consequências no custo de produção (YANG et al., 2000; COLOMBATTO et al., 2003_a).

Ao longo dos anos, por meio de avanços tecnológicos, melhoras significativas na digestibilidade da parede celular têm ocorrido, contudo a ingestão de energia disponível continua limitada. A suplementação da dieta de ruminantes com aditivos, com destaque para enzimas fibrolíticas exógenas, é uma estratégia que busca aumentar a utilização dos nutrientes e a eficiência produtiva animal (SCHINGOETHE et al., 1999; NSEREKO et al., 2000; BEAUCHEMIN et al., 2003).

Além disso, outra vantagem se deve à produção dessas enzimas ser realizada pela fermentação fúngica. Estes microrganismos além de serem excelentes produtores de enzimas apresentam síntese em grande escala devido à rapidez de secreção de seus metabólitos. Por outro lado, oferecem alta diversidade metabólica, baixo custo, fácil coleta e manutenção das cepas. Outro fator importante é a metabolização ser realizada com substratos considerados resíduos agroindustriais, o que torna o processo de produção menos oneroso e proporciona um melhor aproveitamento dos resíduos.

Esses 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 atingirem a forma e a solubilidade necessária para que sejam transportadas pela membrana (PUTZKE & PUTZKE, 2002). Dentre estas enzimas estão lipases, amilases, pectinases, celulasas, xilanases e ligninases, que apresentam características físico-químicas variadas com potencial para aplicação industrial, principalmente no setor de ração animal.

Assim, as enzimas são produzidas por microrganismos específicos através da metabolização de nutrientes presentes no meio, seguida pela síntese e secreção enzimática. Uma vez que o processo se completa, o extrato enzimático é separado do resíduo e dos organismos que lhe deram origem. Ainda que a fonte de organismo entre os produtos enzimáticos seja geralmente semelhante, o tipo e a atividade de enzimas produzidas podem variar amplamente, a depender da linhagem selecionada, do substrato de crescimento e do meio de cultura usado (CONSIDINE & COUGHLAN, 1989; GASHE, 1992; LEE et al., 1998).

Segundo McAllister et al. (2001), os aditivos enzimáticos são classificados normalmente com base nos compostos sobre os quais degradam. Em se tratando de ruminantes, são nomeados de celulase, xilanase e ligninase as enzimas que degradam celulose, xilana e lignina, respectivamente. É importante ressaltar que os produtos de enzimas fibrolíticas, geralmente, são combinações de atividades enzimáticas. Atividades secundárias de amilases, proteases e/ou pectinases podem se associar as de celulasas e hemicelulasas, consideradas primárias ou essenciais às dietas de bovinos (MCALLISTER et al., 2001).

Ainda que no rúmen a quantidade de enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas seja alta, atividades de enzimas fibrolíticas exógenas podem expor sítios da parede celular à aderência bacteriana, o que permitiria digestão mais completa da dieta (BEAUCHEMIN et al., 2000).

2.3. *Aspergillus niger*

Segundo Wainwright (1995), o *Aspergillus niger* pertence a gênero *Aspergillus* e trata-se de um fungo filamentoso negro comumente denominado como “mofo negro”. As colônias geralmente têm crescimento rápido e exuberante, inicialmente são brancas, amarelas, passando para marrom ou para o negro. A colônia é composta por micélio aéreo com conidióforos eretos, densamente distribuídos sobre a superfície do meio e farta produção de conídios (SANTOS, 2007).

Trata-se do gênero mais comum dos fungos filamentosos, além de ser um dos mais bem estudados. As espécies que compõem esse gênero tem ampla distribuição mundial estando presente na superfície sólida, no ar e na água, tanto em organismos vegetais bem como em animais, além de estarem associadas com a deterioração de madeiras e alimentos, principalmente em regiões de clima tropical e subtropical. Muitas das espécies de *Aspergillus niger* são utilizadas para obtenção de enzimas, na biossíntese química e na transformação de compostos. Há espécies patogênicas para o homem e para os animais e há aquelas que durante seu metabolismo produzem toxinas (ROSA, 2002).

O uso de *Aspergillus niger* apresenta algumas vantagens como facilidade de manipulação, sua habilidade de fermentar uma grande variedade de matérias-primas de baixo custo e produzir rendimentos elevados de bioprodutos (SPIER, 2005). Além disso, Pandey et al. (1999) relataram que o respectivo fungo pode produzir 19 tipos de enzimas, tais como celulasas, xilanases, amilases, glucoamilases, poligalacturonases, entre outras.

2.4. Sistemas enzimáticos em estudo

2.4.1. Sistema celulolítico

As celulasas são produzidas por um grande número de fungos, principalmente Ascomicetos e Basidiomicetos. O sistema enzimático das celulasas é constituído de um conjunto de hidrolases glicosídicas, que envolvem três tipos de enzimas: as endo- β -1,4-glucanases ou endoglucanases (EG I, EG II, EG III, EG IV; EC 3.2.1.4), as exo- β -1,4-glucanase ou celobiohidrolases, ou apenas exoglucanases (CBH I, CBH II, EC 3.2.1.91), e as β -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).

As regiões de menor organização das microfibrilas da celulose são os locais de ação de endoclucanases. Como resultado, diminui a polimerização das microfibrilas, disponibilizando mais substratos para ação das exoglucanases (McALLISTER et al., 2001).

Em geral, endoglucanases hidrolisam aleatoriamente as cadeias de celulose, produzindo oligômeros de celulose de vários graus de polimerização; exoglucanases hidrolisam a cadeia de celulose a partir da extremidade não redutora para produzir celobiose; e as β -glucosidades liberam glicose a partir da celobiose e hidrolizam cadeias curtas de celoligossacarídeos a partir de extremidades redutoras ou não (BHAT & HAZLEWOOD, 2001). Os locais de clivagem para a maioria das enzimas envolvidas na hidrólise da celulose estão apresentados na Figura 4.

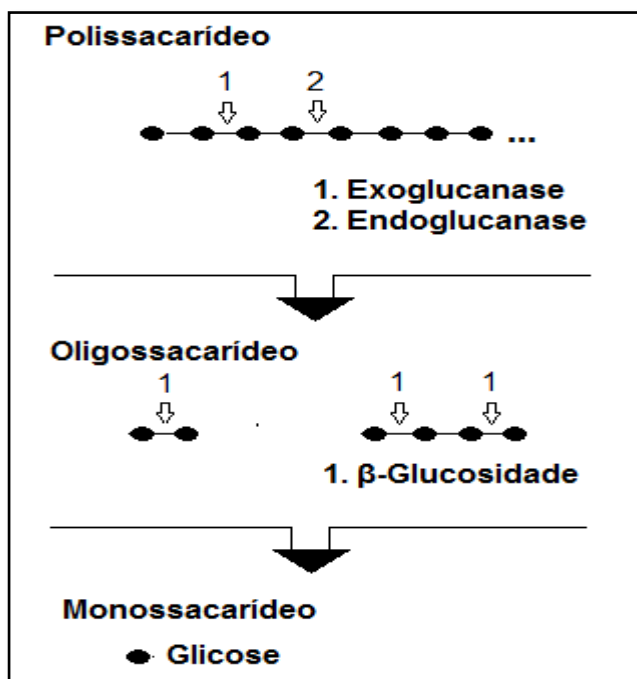


Figura 4. Representação esquemática das principais enzimas envolvidas na hidrólise de celulose [adaptado de BHAT & HAZLEWOOD (2001)].

As celulasas são inibidas na presença de altas concentrações de seus produtos de hidrólise (BHAT & HAZLEWOOD 2001); endo e exoglucanases são geralmente inibidas pela celobiose e β -glucosidases são inibidas pela glicose.

2.4.2. Sistema xilanolítico

A utilização de hemicelulasas para promover modificação na composição química da fibra está essencialmente associada à aplicação de xilanases. Estas enzimas catalisam a hidrólise das xilanas e são produzidas principalmente por microrganismos. As xilanases 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 (POLIZELI *et al.*, 2005).

A heterogeneidade das hemiceluloses, nomeadamente do xilano, exige, tal como a celulose, um sistema enzimático (cooperativo) (Figura 5) complexo para que a sua solubilização completa ocorra (SUNNA & ANTRANIKIAN, 1997).

As endo- β -1,4-xilanases (β -1,4-xilana xilanahidrolase EC 3.2.1.8) são as principais enzimas no processo de despolimerização da xilana, hidrolisando a cadeia

principal, mais fácil e mais rapidamente em regiões sem substituições, o que gera oligossacarídeos não substituídos e ramificados ou esterificados (BIELY, 1985; BIELY, 2003). Elas diferem na sua especificidade por substratos. Algumas enzimas quebram aleatoriamente entre resíduos de xilose não substituídos, enquanto outras dependem fortemente dos substituintes próximos aos resíduos de xilose hidrolisados (VRIES & VISSER, 2001).

As β -xilosidases (β -D-xilosídeo xilohidrolase EC 3.2.1.37) são exoglucosidases que hidrolisam xilooligossacarídeos pequenos e xilobiose, liberando xilose. A especificidade dessas enzimas por pequenos oligossacarídeos de xilose é alta (REILLY, 1981; SUNNA & ANTRANIKIAN, 1997). Segundo Vries & Visser (2001), elas são capazes de liberar xilose de terminais não redutores de oligossacarídeos ramificados somente quando dois resíduos de xilose contíguos estão adjacentes à resíduos de xilose simples ou duplamente substituídos.

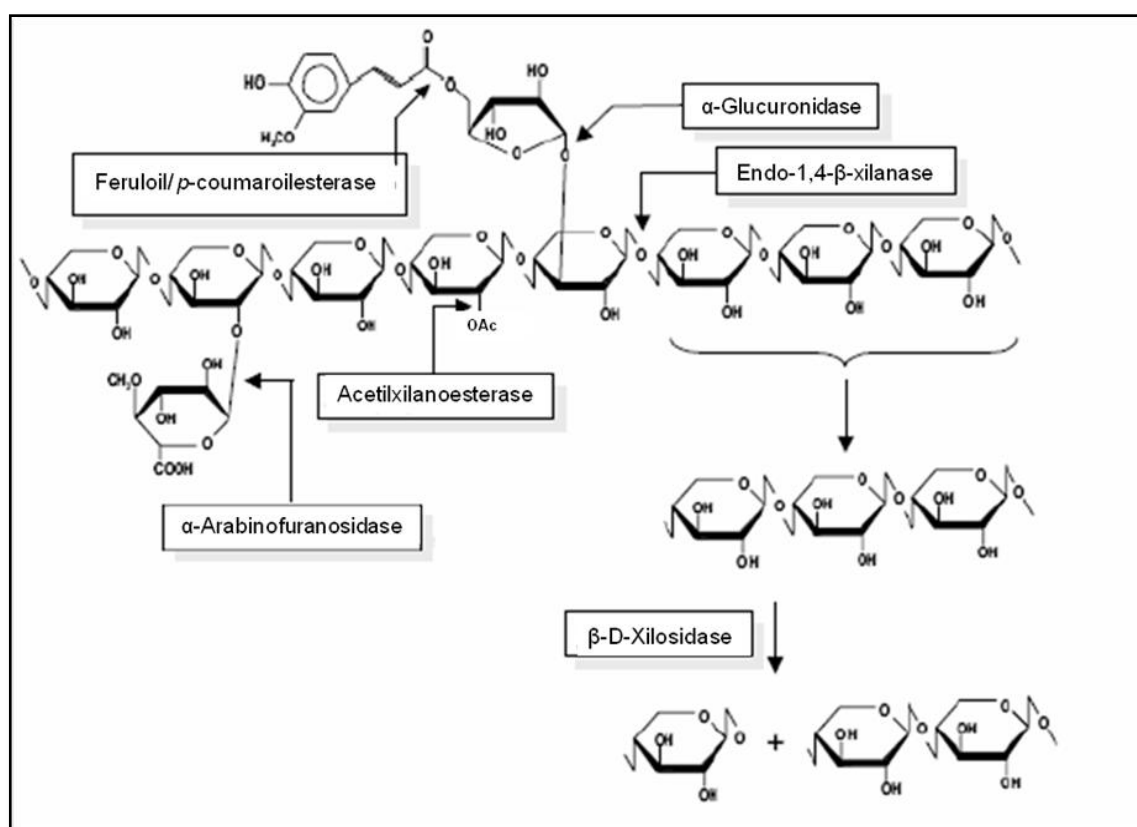


Figura 5. Representação esquemática de uma molécula de xilana e da atuação das enzimas do sistema xilanolítico. Ac = Grupo acetil (POLIZELI, 2008).

Outras enzimas, responsáveis por eliminar resíduos substituintes específicos, são conhecidas como enzimas auxiliares ou desramificadoras e atuam em sinergia com as xilanases e β -xilosidases no processo de despolimerização da xilana. Dentro desse grupo são conhecidas as acetil xilana esterases, α -glucuronidases, α -L-aferanosidase e feroluil esterase e coumaroil esterase (PRADE, 1995; KULKARNI et al., 1999; ARO et al., 2005). Algumas atuam nas ligações entre um resíduo da cadeia principal e o grupo substituinte, enquanto outras quebram ligações internas ou terminais das cadeias laterais (VRIES & VISSER, 2001).

2.5. Uso de enzimas fibrolíticas em silagem de milho

A confecção de silagens é uma alternativa para minimizar os efeitos da estacionalidade da produção de forragem das pastagens. Esta prática possibilita melhor aproveitamento do volumoso no período de alta produção e oferta satisfatória de alimento de qualidade durante o período de escassez.

A planta de milho é amplamente utilizada para a produção de silagem e apresenta vantagens como o elevado rendimento de massa verde por hectare e alto valor nutricional. Além disso, segundo Nussio et al. (2001) a cultura do milho preenche os requisitos necessários para confecção de uma silagem ideal, como: teor de matéria seca entre 30% a 35%, teores de carboidratos solúveis acima de 3% na matéria verde e baixo poder tampão. Essas características proporcionam fermentação láctica, considerada ideal no processo de conservação de silagens.

Segundo Jones (1995), para otimizar o processo de fermentação da silagem é recomendado o uso de certos tipos de aditivos, visando melhorar o valor nutricional do milho. Entre os aditivos incluem-se inoculantes bacterianos que contêm bactérias ácido-láticas que se agregam à população natural de bactérias da silagem e ajudam a garantir fermentação rápida e eficiente no silo (MUCK & KUNG Jr, 1997).

Outros importantes aditivos são as enzimas, que podem atuar degradando os carboidratos estruturais das plantas, assim como o amido que se encontra nos grãos, conseqüentemente, melhoram a fermentação e utilização da forragem pelos animais (MUCK & BOLSEN, 1991). De acordo com Nadeau et al. (2000) o efeito mais consistente das enzimas degradadoras da parede celular, como as celulases e

hemicelulases, é a redução da concentração dos carboidratos estruturais das silagens.

Os efeitos da adição de enzimas na ensilagem de gramíneas e leguminosas foram documentados por BOLSEN et al. (1995). Essas forrageiras apresentam baixa quantidade de substrato, proporcionando melhor fermentação após a aplicação de enzimas fibrolíticas. O efeito da adição de enzimas na ensilagem da planta de milho é pouco encontrado na literatura, mas não o torna menos importante. Segundo Chen et al. (1994), o milho pode conter grandes quantidades de fibra estrutural, o que pode limitar o consumo de matéria seca.

Algumas pesquisas relatam a redução dos componentes fibrosos da silagem de milho após a aplicação de enzimas, embora os efeitos sobre a taxa de extensão da degradação no rúmen sejam inconsistentes (SPOELSTRA, & VAN WIKSELAAR, 1992; SHEPERD & KUNG., 1996).

A este respeito, Hristov & McAllister (2002) observaram que a adição de aditivos enzimáticos proporcionou melhor preservação da forragem ensilada, uma alta concentração de açúcares solúveis e aumento da degradabilidade ruminal. Além disso, outros autores como Dean et al. (2005) demonstraram que a aplicação de enzimas fibrolíticas pode aumentar a digestibilidade e estabilidade aeróbia da silagem de capim *Cynodon dactylon*.

As enzimas podem também ser aplicadas como aditivo em ração para ruminantes no cocho, no intuito de aumentar a digestibilidade de alimentos fibrosos e, conseqüentemente, o desempenho do animal. Quando fornecidas dessa maneira, as enzimas fibrolíticas formam ligações com os substratos, que as protegem da degradação ruminal e podem aumentar a digestibilidade da forragem através de diferentes mecanismos, como: hidrólise direta, melhoria da aceitabilidade, alterações na viscosidade intestinal e mudanças do local de digestão (BEAUCHEMIN et al., 2003; MARTINS, 2003; LOURES, 2004).

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 efeito depende do tipo de alimento e do tipo de enzima utilizada (KRUEGER & ADESOGAN, 2008).

Nsereko et al. (2000) e Colombatto et al. (2003_b) 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 o fornecimento de 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).

Outro fator que também deve ser estudado é o nível de enzima a ser aplicado, ou seja, quantas unidades de atividade enzimática devem ser adicionadas por quilo de matéria seca a ser ingerida. Nsereko et al. (2002) especularam que a aplicação de um nível moderado de enzimas na alimentação de ruminantes causou uma ruptura benéfica da estrutura da superfície dos alimentos, antes ou após a ingestão. Em outros estudos, alguns autores demonstraram que a adição de níveis elevados de enzimas podem ser menos eficazes do que níveis mais baixos e, o nível ótimo pode depender da dieta (BEAUCHEMIN et al., 2003). O nível ótimo de enzimas depende da dieta utilizada, sendo que altas quantidades diminuem a adesão microbiana e limita a digestão do alimento.

Os níveis de enzima normalmente utilizados como aditivos para a alimentação de ruminantes variam de 0,5 a 2,0 mg/g (ou g/Kg) da dieta total, em MS, como salientado por Beauchemin et al. (2003). Porém, estes níveis são dependentes das características específicas de cada produto, como tipo de atividade das enzimas presentes.

Porém, há uma ampla variabilidade de resultados encontrados na literatura. Segundo Beauchemin et al. (2003), tais resultados podem ser explicados pela produção não padronizada de enzimas, variando assim a forma de incubação dos fungos, quantidade de substrato, condições de crescimento do fungo e medições da atividade enzimática, além das divergências nos testes com alimentação animal, onde variam o tipo de enzima testada, assim como o nível utilizado e o método de aplicação.

2.6. Variabilidade de resultados

Um dos principais entraves para a realização de pesquisas nesta área é a inconsistência de resultados. Devido à variedade de produtos enzimáticos e

condições experimentais, as respostas observadas na utilização de enzimas para ruminantes são muitas vezes inconsistentes. Tais respostas podem ser atribuídas às condições nas quais a energia não é limitante, pela diferença de atividade enzimática e características das enzimas suplementadas, assim como, por uma super ou sub-dosagem da atividade enzimática e pelo método inapropriado de fornecimento da enzima para o animal (BEAUCHEMIN et al., 2003).

Em geral, as enzimas usadas na alimentação animal são misturas de diferentes polissacaridases, glucosidases, ligninases e proteases, que geralmente necessitam de condições diferentes para mostrarem máximo efeito (VAHJEN & SIMON, 1999). Por exemplo, temperatura de 50°C e pH entre 4,8 a 5,3 são recomendados para celulasas de *Trichoderma spp.* (GHOSE, 1987; WOOD & BHAT, 1988). No entanto, essas condições não refletem a situação *in vivo* (SABATIER & FISH, 1996), como temperatura do rúmen de 39°C e pH entre 5,8 e 6,8.

Para aplicações em ração animal, parece lógico que o pH e a temperatura utilizada nos ensaios de avaliação deve assemelhar-se às condições encontradas no alimento ou no animal, dependendo do local onde as enzimas irão atuar. Slominsky et al. (1993) identificaram este problema e, apesar de maiores atividades enzimáticas serem encontrados a pH 5,2 do que a pH 7,5, a recomendação foi baseada nas condições em que as enzimas devem atuar (trato intestinal de monogástricos).

Um ponto importante a ser observado é a mensuração da atividade enzimática, a qual sofre mudanças dependendo da enzima estudada. Devido a atividade da enzima ser expressa em uma taxa inicial de reação, é importante garantir que a enzima está na velocidade cinética máxima compatível com a duração do ensaio. Isto é conseguido através da garantia de que a concentração de substrato é bem superior ao da enzima, e definindo os limites de linearidade da resposta colorimétrica para a atividade da enzima (COLE & SHEEHAN, 2000).

Existem várias formas de expressar a atividade enzimática, que pode ser em U/mL (volume do extrato), U/g de substrato, U totais ou pode ser expressa em U/mg de proteína (atividade específica). Essas diferentes maneiras causam confusão no momento de se comparar os estudos envolvendo produção e avaliação de enzimas.

A atividade específica é representada pela relação entre a atividade total da enzima em U total pela quantidade de proteína secretada para o meio em miligramas. Nos fungos com alta produção de proteína, os valores encontrados de atividade específica são menores. O que pode inferir que várias outras enzimas são produzidas pelo fungo além das xilanases. Assim, os melhores fungos produtores de xilanases são aqueles que apresentam maior valor de atividade específica.

Nesse caso, a dosagem enzimática apresenta ser mais precisa, pois algumas frações de proteínas não contribuem para a atividade enzimática. No entanto, sua utilização é limitada quando se trata de preparações comerciais. Os produtos comerciais, na sua maioria, contêm conservantes, cuja contribuição para o conteúdo total de proteína é desconhecida. Além disso, esses produtos são misturas de diferentes enzimas e a contribuição total de proteína para cada atividade enzimática é também desconhecida (COLOMBATO & BEAUCHEMIN 2003).

Assim, mais estudos são necessários a fim de se buscar um produto bem caracterizado, que permita a padronização na utilização dos mesmos nas dietas para ruminantes. Acredita-se que se for encontrado um produto altamente especificado, seja mais fácil chegar a uma dose ideal que permita respostas positivas dos animais e das dietas.

3. Referências

AKIN, D.E. 1973. Rumen microbial degradation of grass tissue revealed by scanning electron microscopy. **Agronomy Journal** 65:825-828.

AKIN, D.E. 1989. Histological and physical affecting digestibility of forages. **Agronomy Journal** 21:17-25.

ARO, N., PAKULA, T., PENTTILA, M. 2005. Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, p. 719-739.

BASTAWDE, K. B. 1992. Xylan structure, microbial xylanases, and their mode of action. **World J. Microbiol. Biotechnol.**, Oxford, v. 8, p. 353-368, 1992.

BEAUCHEMIN, K. A., RODE, L. M., YANG, W. Z., McALLISTER, T. A. 2000. **Enzymes and direct fed microbials in diets for dairy cows**. In: M. L. Eastridge

(ed.). Proc. Tri-State Dairy Nutrition Conference. Ohio State University, Columbus. pp 85–95.

BEAUCHEMIN, K.A., COLOMBATTO, D., MORGAVI, D.P., YANG, W.Z. 2003. Use of fibrolytic enzymes to improve feed utilization by ruminants. **J. Anim. Sci.**, v. 81, E37–E47.

BEG, Q.K., KAPOOR, M., MAHAJAN, L., HOONDAL, G.S. 2001. Microbial xylanases and their industrial applications: a review. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 56, p.326-338.

BHAT, M. K. & HAZLEWOOD, G. P. 2001. **Enzymology and other characteristics of cellulases and xylanases**. in M. Bedford and G. Partridge, eds. Enzymes in farm animal nutrition. CABI Publishing, Oxford, UK. Pages 11–60.

BIELY, P. 1985. **Microbial xylanolytic system**. Trends in Biotechnology. v.3, p.286-290.

BIELY, P. 2003. **Xylanolytic enzymes**. In: Whitaker, J.R., Voragen, A.G.J., Wong, W.S. (Eds.), Handbook of Food Enzymology. Marcel Dekker, Inc., New York, pp. 879–916.

BISARIA, V.S. & GHOSE, T.K. 1981. Biodegradation of cellulosic materials: Substrats, microorganisms, enzyme and products. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 3, p. 90-104.

BLOUIN, F. M. A., MARTIN, L. F., ROWLAND, S. P. 1970. Gel permeation properties of cellulose. III. Measurement of pore structure of unmodified and of mercerized cottons in fibrous form. **Textile Res Journal**, v. 40, p. 809-813.

BOLSEN, K.K., ASHBELL, G., WILKINSON, J.M. 1995. **Silage additives**. In: R.J. Wallace and A. Chesson (ed.) Biotechnology in animal feeds and animal feeding. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, Germany, p. 33-54.

BRITO, C.J.F.A.; RODELLA, R.A.; DESCHAMPS; ALQUINI, Y. 1999. Anatomia quantitativa e degradação in vitro de tecidos em cultivares de capim-elefante. **Rev. Bras. Zoot.**, 28(2):223-229.

BUXTON, D.R.; REDFEARN D.D. 1997. Plant limitations to fiber digestion and utilization. **J. Nutrition**, v.127, p.814-818.

CHEN, K. H., J. T. HUBER, C. B. THEURER, R. S. SWINGLE, J. SIMAS, S. C. CHAN, Z. WU, and J. L. SULLIVAN. 1994. Effect of steam-flaking of corn and sorghum grains on performance of lactating cows. **J. Dairy Sci.** 77:1038–1043.

COLE, S. C. J. & SHEEHAN, N. 2000. The analysis of xylanase and β -glucanase in feed enzymes. **Enzyme Services & Consultancy**, Blackwood, Wales.

COLOMBATTO, D., MORGAVI, D.P., FURTADO, A.F., BEAUCHEMIN, K.A. 2003_a. Screening of exogenous enzymes for ruminant diets: Relationship between biochemical characteristics and *in vitro* ruminal degradation. **J. Anim. Sci.**, v.81, p.2628- 2638.

COLOMBATTO, D., MOULD, F.L., BHAT, M.K.; OWEN, E. 2003_b. 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.

COLOMBATTO, D., BEAUCHEMIN, K.A. 2003. A proposed methodology to standardize the determination of enzymic activities present in enzyme additives used in ruminants diets. **Canadian J. Anim. Sci.**, v. 83, n.3, p. 559-568.

CONSIDINE, P. J. & COUGHLAN, M. P. 1989. Production of carbohydrate hydrolyzing enzyme blends by solid-state fermentation. *in* **M. P. Coughlan**, ed. Enzyme systems for lignocelluloses degradation. Elsevier Applied Science, New York, NY. Pages 273–281.

DEAN, D.B., ADESOGAN, A.T., KRUEGER, N., LITTELL, R.C. 2005. Effect of fibrolytic enzymes on the fermentation characteristics, aerobic stability, and digestibility of BS. **J. Dairy Sci.** 88: 994-1003.

DILLON, A. 2004. Celulases. *In*: SAID, S.; PIETRO, R. C. L. **Enzimas como agentes biotecnológicos**. Ribeirão Preto: Legis Summa, p. 243-270.

EUN, J.S., BEAUCHEMIN, K.A, HONG, S.H., BAUER, M.W. 2006. Exogenous enzymes added to untreated or ammoniated rice straw: Effects on *in vitro* fermentation characteristics and degradability. **Anim Feed Sci Technol**, In Press, available in www.sciencedirect.com.

FAN, L. T. GHARPURAY, M. M., LEE, Y.H. 1987. **Cellulose hydrolysis**. New York. Springer-Verlag.

FERREIRA, W.M. 1994. Os componentes da parede celular vegetal na nutrição de não-ruminantes. In: **31^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia**. Simpósio Internacional de Produção de Não Ruminantes. Anais... SBZ: Maringá, Brasil: 1994:85-113.

FERREIRA FILHO, 1994. E. X. **The xylan-degrading enzyme system (review)**. Braz. J. Med. Biol. Chem., v. 35, nº 11, p. 1783-1791.

GASHE, B. A. 1992. Cellulase production and activity by *Trichoderma* sp. A-001. **J. Appl. Bacteriol.** 73: 79–82.

GHOSE, T. K. 1987. Measurement of cellulase activity. **Pure Appl. Chem.** 59:257–268.

HATFIELD, R. D. 1989. Structural polysaccharides in forages and their degradability. **Agron. J.** 81: 39-46.

HENDRIKS, A.T.W.M., ZEEMAN, G. 2009. Review: Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass, **Bioresource Technology**, v.100, p. 10–18.

HISAMATSU M., YORK W. S., DARVILL A.G., ALBERSHEIM P. 1992. Characterization of seven xyloglucan oligosaccharides containing seventeen to twenty glycosyl residues. **Carbohydrate Research** 111, 45-71.

HRISTOV, A.N., McALLISTER, T.A. 2002. Effect of inoculants on wholecrop barley silage fermentation and dry matter disappearance in situ. **J. Anim. Sci.**, v.80, p.510-516.

JONES, R. 1995. Role of biological additives in crop conservation. In: **Biotechnology in the Feed Industry**, Proc. of the 11th Annual Symposium (T.P. Lyons and K.A. Jacques, eds.), Nottingham Univ. Press, 627 p.

JUNG, H.G. 1989. Forage lignins and their effects on fiber digestibility. **Agronomy Journal**, v.81, p.33-38.

JUNG, H.G., DEETZ, D.A. 1993. Cell wall lignification and degradability. In: JUNG, H.G., BUXTON, D.R., HATFIELD, R.D., et al. (Ed) **Forage cell wall structure and digestibility**. Madison : American Society of Agronomy, Crop Sci. Society of America, Soil Sci. Society of America, p.315-346.

KRUEGER N. A. & ADESOGAN A. T. 2008. Effects of different mixtures of fibrolytic enzymes on digestion and fermentation of bahia grass hay. **Anim Feed Sci Technol** 145:84–94.

KULKARNI, N., SHENDYE, A., RAO, M. 1999. Molecular and biotechnological aspects of xylanases. **FEMS Microbiol. Rev.**, Amsterdam, v. 23, p. 411-456.

LEE, B., POMETTO, A. L., DEMICI, A., HINZ, P. N. 1998. Media evaluation for the production of microbial enzymes. **J. Agric. Food Chem.** 46: 4775–4778.

LOURES, D.R.S. 2004. **Enzimas fibrolíticas e emurchecimento no controle de perdas da ensilagem na digestão de nutrientes em bovinos alimentados com ração contendo silagem de capim tanzania**. Tese apresentada a Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, - USP, pp. 146.

LYND, L. R., WEIMER, P.J., VAN ZYL W.H. 2002. Microbial cellulose utilization: Fundamentals and biotechnology. Pretorius IS. **Microbiol Mol Biol Rev** 66:506–577.

MARTINS, A.S. 2003. **Enzimas fibrolíticas exógenas**. Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias do Campus de Jaboticabal – Unesp, para obtenção do título de Doutor em Zootecnia, área de concentração: Produção Animal. pp. 125.

McALLISTER, T. A., HRISTOV, A. N., BEAUCHEMIN, K. A., RODE, L. M., CHENG, K. J. 2001. Enzymes in ruminant diets. In: **Bedford, M.R.; Partridge, G.G.** (Ed.). *Enzymes in farm animal nutrition*. Oxon: Cab International, p. 273-297.

MUCK, R.E., BOLSEN, K.K. 1991. Silage preservation and silage additive products. In: BOLSEN, K.K. et al. **Hay and silage management in North America**. NFIA, p.105-126.

MUCK, R.E., KUNG Jr., L. 1997. Effects of silage additives on ensiling. In: **SILAGE: FIELD TO FEEDBUNK**. NRAES-99, Herchey. **Proceedings...** Herchey, NRAES, p.187-199.

NADEAU, E.M.; BUXTO, D.R.; RUSSELL, J.R. et al. 2000. Enzyme, bacterial inoculant, and formic acid effects on silage composition of orchardgrass and alfafa. **J. Dairy Sci.**, v. 83, n. 7, p. 1487-1502.

NSEREKO, V.L., MORGAVI, D.P., RODE, L.M., BEAUCHEMIN, K.A., McALLITER, T.A. 2000. 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, nº 3-4, p. 153-170..

NSEREKO, V. L., BEAUCHEMIN, K. A., MORGAVI, D. P., RODE, L. M., FURTADO, A. F., McALLISTER, T. A., IWAASA, A. D., YANG, W. Z., WANG, Y. 2002. Effect of a fibrolytic enzyme preparation from *Trichoderma longibrachiatum* on the rumen microbial population of dairy cows. **Can. J. Microbiol.** 48:14–20.

NUSSIO, L.G., CAMPOS, F.P., DIAS, F.N. 2001. Importância da qualidade da porção vegetativa no valor alimentício da silagem de milho. In: **Simpósio sobre utilização e produção de forragens conservadas**, 2001, Maringá. Anais... Maringá: UEM/CCA/DZO, p. 127-145.

PANDEY, A., SELVAKUMAR, P., SOCCOL, C.R., NIGAM, P. 1999. Solid state fermentation for the production of industrial enzymes. **Current science**. Volume 77. Pg. 149- 162.

POLIZELI, M.L.T.M. 2008. **Properties and commercial applications of xylanases from fungi**. In: *Mycotechnology: current trends and future prospects*, RAI, M.K. (editor), I.K. International Publisher, New Delhi, chapter.

POLIZELI, M. L. T., RIZZATTI, A. C. S., MONTI, R., TERENCE, H. F., JORGE, H. F., AMORIM, D. S. 2005. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, Berlin, v. 67, p. 577-591.

PRADE, R. A. 1995. Xylanases from biology to biotechnology. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, v. 13, p. 101-131.

PUTZKE, J., PUTZKE, M. T. L. 2002. **Os Reinos dos Fungos** Vol. 2. Ed. da Universidade de Santa Cruz do Sul. Santa Cruz do Sul, RS.

REILLY PJ. 1981. Xylanases: structure and function. **Basic Life Sci.** 18:111–129.

REIS, R.A., MELO G.M.P., BERTIPAGLIA L.M.A. 2005. Otimização da utilização da forragem disponível através da suplementação estratégica. In: REIS R.A.; SIQUEIRA, G.R.; BERTIPAGLIA, L.M.A. et al. (Eds.). **Volumosos na produção de ruminantes**. Jaboticabal: Funep, p.187-238.

ROSA, C. A. R. 2002. **Microbiota toxígena e ocratoxinas em rações destinadas à alimentação de aves, bovinos, suínos e importância em saúde animal**. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) – UFRRJ, Seropedica, 147 pp.

SABATIER, A. M. & FISH, N. M. 1996. Method of analysis for feed enzymes: methodological problems. 28 **Journal of applied poultry research** 5, 408-413.

SANTOS, S. F. M. 2007. **Estudo da produção de pectinases por fermentação em estado sólido utilizando pedúnculo de caju como substrato**. 2007. 148 f. (Tese de Doutorado) – Engenharia Química da Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Natal.

SCHINGOETHE, D. J., STEGEMAN, G. A., TREACHER, R. J. 1999. Response of lactating dairy cows to a cellulase and xylanase enzyme mixture applied to forages at the time of feeding. **J. Dairy Sci.** 82:996–1003.

SHEPERD, A. C. & KUNG, L. JUNIOR. 1996. Effects of an enzyme additive on composition of corn silage ensiled at various stages of maturity. **J. Dairy Sci.**, v. 79, p.1767-1773.

SLOMINSKY, B. A., GUENTER, W., CAMPBELL, L. D. 1993. New approach to water-soluble carbohydrate determination as a tool for evaluation of plant cell wall degrading enzymes. **J. Agric. Food Chem.** 41: 2304–2308.

SPIER, M. R. 2005. **Produção de enzimas amilolíticas fúngicas α -amilase e amiloglucosidase por fermentação no estado sólido**. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

SPOELSTRA, S. F. & P. G. VAN WIKSELAAR. 1992. The effects of ensiling whole crop maize with a multi-enzyme preparation on the chemical composition of the chemical composition of the resulting silages. **J.Sci. Food Agric.** v.60, p.223-228.

SUNNA, A. & ANTRANIKIAN, G. 1997. Xylanolytic enzymes from fungi and bacteria. **C. Rev. Biotechnol.** 17(1):39–67.

VAHJEN, W. & SIMON, O. 1999. Biochemical characteristics of non-starch polysaccharide hydrolysing enzyme preparations designed as feed additives for poultry and piglet nutrition. **Arch. Anim. Nutr.**, 52: 1-14.

VAN SOEST, P. J. 1994. **Nutritional ecology of the ruminant**. Ithaca: Comstock Publishing Associates/Cornell University Press.

VRIES, R. P. & VISSER, J. 2001. Aspergillus enzymes involved in degradation of plant cellwall polysaccharides. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.** ,p. 497-522.

WAINWRIGHT, M. 1995. **Introducción a la Biotecnología de los Hongos**. Zaragoza: Acribia, p.228, 1995.

Wilson, J.R. 1993. Organization of forage plant tissues. In: Jung, H.G., Buxton, D.R., Hatfield, R.D. (Eds). **Forage cell wall structure and digestibility**. America Society of Agronomy, Crop Science Society of America, Soil Science Society of America. Madison, WI. p. 1-32.

WOOD, T.M. & BHAT, K.M. 1998. **Methods of measuring cellulase activities**. Method Enzymol. 160: 87-112.

YANG, W. Z., BEAUCHEMIN, K. A., RODE, L. M. 2000. A comparison of methods of adding fibrolytic enzymes to lactating cow diets. **J. Anim. Sci.**, v. 83, p. 2512-2520.

ZHANG, Y-HP., SCHELL, D.J., McMILLAN, J.D. 2007. Methodological analysis for determination of enzymatic digestibility of cellulosic materials. **Biotechnol Bioeng**, 96(1):188–194.

CAPITULO 2 – SELEÇÃO DE FUNGO PRODUTOR DE XILANASES E CELULASES, E AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DAS ENZIMAS EM CONDIÇÕES RUMINAIS.

RESUMO – O objetivo deste estudo foi selecionar um fungo com potencial de produção de enzimas fibrolíticas, em especial xilanases e celulases (CMcases), além de testar a estabilidade enzimática em condições ruminais. Para isso, foram realizadas coletas de diferentes amostras (silagem de milho, esterco de ovinos em decomposição, terra + capim *tifton*, curral e terra + cana de açúcar em decomposição) e 27 fungos foram isolados e tiveram sua produção avaliada individualmente. O microrganismo selecionado como o melhor produtor foi um *Aspergillus niger*, capaz de produzir significativas quantidades das enzimas de interesse neste estudo (7,04 e 0,09 U/mL de xilanases e celulases, respectivamente). Após a seleção da melhor cepa produtora, foram realizados testes para otimizar a produção dessas enzimas, e obtendo-se a maior quantidade de unidades possíveis, seguiu-se com os experimentos de caracterização bioquímica e testes nas condições ruminais. As condições ótimas de pH e temperatura de reação das enzimas em estudo corresponderam ao pH de 4,6 e 3,6 nas xilanases e celulases, respectivamente, numa temperatura de 60°C em ambas as enzimas. A maior produção de xilanases ocorreu com 96 e 168 horas na fermentação submersa com ou sem agitação, respectivamente. Na produção de celulases os maiores níveis enzimáticos foram observados com 120 horas de cultivo nas duas condições de crescimento (submersa com ou sem agitação). A concentração ideal de esporos a ser inoculado no meio foi de $1,5 \times 10^7$ e $0,5 \times 10^7$ esporos/mL nas xilanases e celulases, especificamente. O teste de estabilidade das enzimas no rúmen mostrou maior atividade de xilanases nos animais que receberam o extrato enzimático via cânula até 7 horas após a aplicação.

Palavras chave: *Aspergillus niger*, celulases, enzimas fibrolíticas, xilanases

1. Introdução

Os ruminantes possuem um ecossistema diverso e sofisticado de utilização dos carboidratos fibrosos da parede celular dos vegetais, graças à relação simbiótica com a população microbiana variada do rúmen (Martins et al., 2006).

A degradação dos alimentos fibrosos pelos ruminantes está diretamente relacionada à síntese e secreção de enzimas pelos microrganismos do rúmen, resultando na hidrólise da parede celular das plantas. Entretanto, a conversão dos alimentos, especialmente os fibrosos, para produção de carne e leite tem sido pouco eficiente (Varga & Kolver, 1997). Com isso se torna necessária a utilização de novos programas biotecnológicos de alimentação animal, com o objetivo de melhorar o aproveitamento dos alimentos e a produção animal.

As enzimas de origem microbiana são preferencialmente utilizadas pela indústria. Dentre as vantagens da utilização de microrganismos estão o rápido crescimento celular, curto tempo de produção de metabólitos, cepas com alto potencial de produção, meio de crescimento barato e fácil extração do produto.

A utilização de fungos filamentosos na produção de enzimas de interesse comercial é vantajosa devido ao fato destes microrganismos secretarem estas enzimas para o meio de cultura, o que facilita o processo de obtenção e purificação destas moléculas (Reis, 2007).

O número de espécies conhecidas de fungos é estimado em pelo menos 74.000, sendo a maioria terrestre, 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).

Assim, fica evidente a importância dos estudos acerca desta diversidade encontrada e as potenciais aplicações no setor industrial, principalmente no setor de ração animal. Segundo Polizeli (2008), a velocidade de crescimento no consumo dessas enzimas é relativamente maior neste setor.

Porém, as condições ótimas de atividade para algumas enzimas, na maioria das vezes, não são as mesmas encontradas no rúmen. Sendo assim, enzimas que atuam em pH e temperatura diferentes das condições ruminais podem ser inativadas ou apresentarem baixa atividade quando submetidas a essas condições.

Além disso, há ampla variabilidade de resultados encontrados na literatura em torno da aplicação de enzimas em dietas para ruminantes. Segundo Beauchemin et al. (2003), tais resultados podem ser explicados pela produção não padronizada de enzimas, variando assim a forma de incubação dos fungos, quantidade de substrato, condições de crescimento do fungo e medições da atividade enzimática, além das divergências nos testes com alimentação animal, onde variam o tipo de enzima testada, assim como o nível utilizado e o método de aplicação.

Assim, faz-se necessário mais pesquisas a fim de se obter um produto final altamente qualificado e corretamente caracterizado, que permita o uso em dietas para ruminantes e a comparação entre diferentes estudos. Para isso, o presente trabalho teve como objetivo selecionar um fungo com alto potencial de produção de enzimas fibrolíticas exógenas, em especial xilanases e celulasas (CMCases) e testar a estabilidade das mesmas em condições ruminais

2. Material e métodos

Os experimentos de isolamento dos fungos, seleção do melhor produtor das enzimas de interesse e estudos acerca da produção enzimática foram conduzidos no Departamento de Biologia da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo enquanto que os testes da estabilidade das enzimas no rúmen foram realizados no setor de Forragicultura da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária (FCAV) da Universidade Estadual Paulista (UNESP), campus de Jaboticabal – SP.

2.1. Coleta e isolamento de fungos

A coleta foi realizada em diferentes locais da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária (FCAV) da Universidade Estadual Paulista (UNESP), campus de Jaboticabal – SP. As amostras foram: (A) Silagem de milho, (B) Esterco de ovinos em decomposição, (C) Terra + Capim Tifton, (D) Curral e (E) Terra + Cana de açúcar em decomposição.

Esses materiais foram escolhidos porque estavam em processo de deterioração. Assim, as amostras continham fungos decompositores, os quais, provavelmente produzem enzimas que decompõem a matéria vegetal.

Para identificação adequada do local utilizou-se georreferenciamento por GPS – “Global Positioning Systems” para determinação da latitude, longitude e altitude (Tabela 1).

Tabela 1. Locais de coletas de silagem de milho, esterco de ovinos em decomposição, terra + capim tifton, curral e terra + cana de açúcar para o isolamento de fungos filamentosos.

Local de Coleta	Material coletado	Precisão GPS (m)	Latitude (°)	Longitude (°)	Elevação (m)
A	Silagem de milho	10	21°13'844"	48°17'382"	624
B	Esterco	8	21°14'195"	48°17'463"	590
C	Terra e Capim	7	21°14'266"	48°17'482"	582
D	Curral	8	21°14'320"	48°17'688"	592
E	Terra e Cana	8	21°14'283"	48°17'699"	597

As amostras coletadas foram levadas para o Departamento de Biologia da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, para isolamento dos fungos filamentosos contidos nos diferentes materiais amostrados e realização de todas as etapas de isolamento e identificação dos fungos isolados, até a produção e obtenção do extrato enzimático bruto.

O isolamento dos fungos foi realizado pelo método do plaqueamento com e sem diluição. As placas contendo meio de cultura constituído por farinha de aveia 4% e ágar bacteriológico 2% (Emerson, 1941), foram inoculadas e incubadas em estufa bacteriológica a 30°C por aproximadamente 7 dias. Nos dois métodos foram adicionados 5 mL de pentabiótico veterinário (50µg/mL) para impedir o crescimento bacteriano.

Em seguida, foi realizado o repique das diferentes cepas isoladas através de inóculo em estrias. Os fungos foram isolados de acordo com observação macroscópica, quanto à cor dos esporos e mudança de cor do meio de cultura, devido à formação de metabólitos secundários, e textura (liso, enrugado, hifas aéreas, etc).

2.2. Obtenção de culturas por fermentação submersa e determinação da atividade enzimática dos diferentes microrganismos

Logo após o isolamento, os fungos foram submetidos à fermentação submersa, onde os esporos obtidos a partir desses microrganismos, foram raspados com alça de platina e suspensos em 2 mL de água destilada estéril. Um volume de 800 µL da suspensão de esporos foi inoculado em frascos Erlenmeyer de 125 mL, contendo 25 mL de meio líquido (pH 6,0) e incubados a 30°C, por 72 horas, em agitação (100 rpm). O meio líquido utilizado e sua composição estão descritos a seguir:

Meio SR (Rizzatti et al., 2001):

Solução de sais SR [20x].....	5,0 mL
Peptona.....	0,02 g
Extrato de levedura.....	0,45 g
Xilana Birchwood.....	1,0 g
Água destilada q.s.p.	100 mL

Solução de sais SR [20X]:

MgSO ₄ .7H ₂ O.....	0,24 g
KH ₂ PO ₄	0,3 g
NH ₄ H ₂ PO ₄	1,0 g
Água destilada q.s.p.	100 mL

Após o período de incubação, as culturas foram filtradas à vácuo com auxílio de um funil de Büchner e papel de filtro para obtenção de um extrato bruto. Foi determinada a atividade enzimática extracelular no extrato bruto, sendo que a atividade intracelular foi dosada após o micélio ter sido separado, macerado e centrifugado. Assim, foi recolhido o sobrenadante e determinada a atividade intracelular.

A dosagem de xilanases foi realizada quantificando-se a formação de açúcares redutores a partir da hidrólise do substrato xilana Birchwood (Sigma), segundo método descrito por Miller (1959), que usa o ácido 3,5 – dinitrosalicílico

(DNS). Na avaliação das celulases, mais especificamente endoglucanases, foi utilizado o mesmo método, porém, utilizando-se CMC (Carboximetil-celulose) como substrato.

O DNS é utilizado para demonstrar a presença de grupamentos redutores, presentes nos açúcares. O princípio do método consiste na redução do ácido 3,5-dinitrossalicílico a ácido 3-amino-5-nitrossalicílico na presença de açúcares redutores (Figura 1). Após essa reação, a análise espectrofotométrica desse produto a um comprimento de onda de 540 nm é sensível e quantitativa.

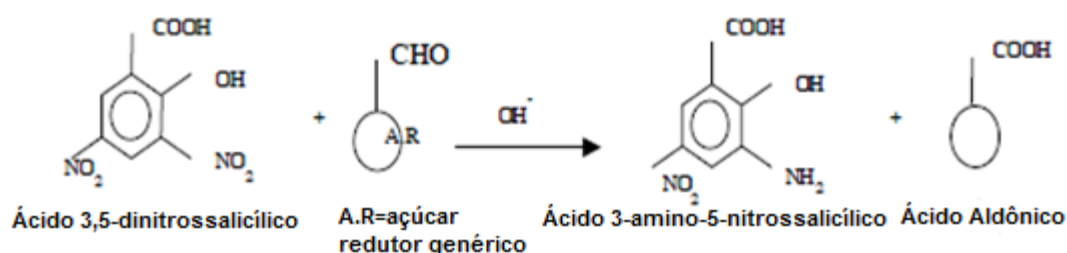


Figura 1. O ácido dinitrossalicílico é reduzido pelo açúcar redutor em meio alcalino à ácido 3-amino-5-nitrossalicílico, formando ácido aldônico.

A mistura utilizada na reação para determinação da atividade xilanásica foi composta de 0,1 mL de solução de substrato (xilana Birchwood 1% (p/v)) em 0,1 mL de tampão acetato de sódio 0,1 M (pH 5,5) e 0,05 mL de extrato enzimático. Para dosagem de CMCase adicionou-se 0,1 mL de substrato (CMC 1% (p/v)) em 0,1 mL da mesma solução tampão e 0,1 mL do extrato enzimático. A reação para avaliação de ambas as enzimas foi realizada a 50°C com duração de 10 minutos nas xilanases e 30 minutos nas CMCase. Após esse período foram adicionados 0,25 mL de DNS nas xilanases e 0,3 mL nas CMCase em cada amostra. Em cada reação enzimática foi determinado um branco (tempo zero). Posteriormente, os tubos foram fervidos por 5 minutos e depois de resfriados, acrescentou-se 2,5 mL de água destilada para os ensaios de xilanases e 3,0 mL para celulases.

As leituras espectrofotométricas foram realizadas a 540 nm, utilizando-se uma curva padrão de xilose e glicose (1 mg/ml) nas xilanases e CMCase, respectivamente. As equações geradas pelas curvas foram usadas para o cálculo da atividade enzimática. Assim, o valor da absorbância de cada amostra submetida ao

ensaio enzimático, descontado do branco, foi dividido pelo fator gerado na equação das curvas padrões, pelo tempo (xilanases: 10 minutos e CMCase: 30 minutos) e pelo volume de extrato enzimático adicionados aos tubos.

A unidade de atividade por mililitros (U/mL) foi definida como sendo a quantidade de enzima capaz de liberar 1 μ mol de açúcar redutor por minuto. A unidade de enzima total (U total) foi definida como a U/mL multiplicado pelo volume total obtido da fermentação de cada Erlenmeyer (25mL). Cada ensaio foi realizado em triplicata para garantir a confiabilidade dos dados.

A quantificação de proteínas foi realizada segundo a metodologia descrita por Lowry et al. (1951) e a unidade proteica medida como mg de proteína/mL.

Assim, foi feito um ensaio padrão, com 50, 100 e 200 μ L de solução BSA (soro albumina bovina), completados com água destilada até o volume total de 200 μ L. Em seguida, foi adicionado 1 mL de solução A (2% de NaCO₃ em NaOH 0,1 N), B (Sulfato de cobre 1%) e B' (Tartarato de Na⁺ e K⁺ 1%) misturados na proporção de 1/100. Após 15 minutos da adição dessa mistura, foram acrescentados 100 μ L de Folin (1:1) seguindo-se com uma reação de 30 minutos. Após esse período a solução foi levada para espectrofotômetro para leitura a 620 nm.

Para a determinação de proteína em cada amostra, fez-se um branco contendo 200 μ L de água destilada, 1 mL de solução A+B+B' e 100 μ L de Folin. Junto com o branco, foram feitos dois tubos de cada amostra, um contendo 50 μ L de extrato enzimático e outro contendo 100 μ L, ambos completados com água destilada até completarem volume final de 200 μ L. Foi adicionado 1 mL de solução A+B+B' e após 15 minutos foram adicionados 100 μ L de Folin em cada tudo. Decorridos 30 minutos de reação, os mesmos foram levados para leitura em espectrofotômetro a 620 nm.

2.3. Otimização das condições de cultivo e produção de enzimas fibrolíticas exógenas

A escolha do melhor fungo levou em consideração a maior produção de xilanases e celulasas, além disso, outro fator considerado importante na determinação da escolha do microrganismo foi o fácil manejo, rápido crescimento e baixa ou nenhuma produção de toxinas.

Após a seleção do fungo que apresentou maior produção de xilanases e CMCase, iniciaram-se os estudos de padronização das condições de cultivo visando aumentar a produção de enzimas. Foram avaliados o efeito do pH, da temperatura, a influência do período de incubação e a concentração de esporos ideal para maior produção de xilanases e celulasas.

Assim, foi realizada fermentação submersa com e sem agitação, para verificar a influência da aeração no cultivo. A fermentação foi realizada em meio SR (Rizzatti et al., 2001) contendo farelo de trigo 1% como substrato, visto que este é um resíduo da agroindústria e também um ingrediente muito utilizado em dietas para ruminantes, porém, por conter alto teor de proteína, aumenta a produção de proteases, que podem desnaturar as enzimas desejadas.

Além disso, foram testados diferentes tempos de incubação: 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168 e 192 horas nas condições com e sem agitação.

Paralelamente se iniciaram os experimentos de caracterização enzimática visando determinar a mais adequada temperatura e pH de reação. Também realizou-se contagem de esporos do fungo selecionado para posteriores testes da concentração ideal a ser adicionada ao meio de cultivo. Assim, cultivou-se o fungo com as seguintes concentrações: $0,5 \times 10^7$, 1×10^7 , $1,5 \times 10^7$, $2,1 \times 10^7$ e $4,1 \times 10^7$ conídios/mL. Os conídios foram contados em Câmara de Neubauer, obtidos de uma concentração de $4,1 \times 10^7$ conídios/mL da qual foram feitas diluições sucessivas até obterem-se as concentrações desejadas.

Estabelecida a melhor condição de produção e atividade enzimática, deu-se início à produção das enzimas fibrolíticas de interesse (xilanases e celulasas) para se prosseguirem com os testes de aplicação em ruminantes.

2.4. Teste da estabilidade da enzima no ambiente ruminal

Antes de iniciar esse ensaio, amostras de extrato enzimático do fungo selecionado foram levadas ao Laboratório de Micotoxinas – LABMIC do Depto. de Agroindústria Alimentos e Nutrição – ESALQ/USP, onde realizou-se análises com vistas a determinar os conteúdos de: Aflatoxina B1, Aflatoxina B2, Aflatoxina G1, Aflatoxina G2, Ocratoxina A e Zearalenona, sendo as mesmas não detectadas na amostra.

As enzimas produzidas foram submetidas a um teste de estabilidade no rúmen de 6 cordeiros mestiços Santa Inês x Dorper, fistulados, que receberam durante 15 dias de adaptação, dieta composta por 60% de silagem de milho e 40% de concentrado. Para isso, foram utilizados dois tratamentos: 1) sem enzimas e 2) com adição de enzimas, com 3 repetições. Os animais que receberam as enzimas foram inoculados no rúmen com 10 mL de extrato enzimático contendo 22,54 U/mL de xilanase e 0,93 U/mL de CMCase e os animais do tratamento controle receberam 10 mL de água via cânula. Após meia hora da adição das enzimas os animais foram alimentados e amostras de líquido ruminal foram colhidas, de hora em hora, no período de 8 horas. Essas amostras foram levadas ao laboratório para análise da atividade enzimática presente no fluído ruminal e pH do meio.

2.5. Análise dos resultados

Os testes para escolha do fungo com alto potencial de produção de xilanases e celulasas foram realizados com os 27 fungos coletados, em triplicata. Para isso, os fungos foram submetidos à fermentação submersa em meio SR, utilizando xilana Birchwood 1% como fonte de carbono. As condições de fermentação foram 30°C, por 72 horas em agitação.

A escolha do melhor fungo foi realizada através da análise das atividades enzimáticas expressas em Unidades Totais (UTotais) segundo método descrito por Peixoto-Nogueira (2009) e Facchini (2010), onde o fungo que apresentar a maior atividade enzimática será o escolhido para dar continuidade aos experimentos.

Com relação ao teste da estabilidade da enzima no ambiente ruminal, os dados experimentais foram analisados através do software SAS (SAS Inst. Inc., Cary, NC). A pressuposição de normalidade dos erros foi analisada utilizando o teste de Box-Cox e homogeneidade das variâncias Distância de Cook. Os dados foram analisados como medidas repetidas no tempo (*Split-plot in time*) através do PROC MIXED, o qual analisou a melhor estrutura da matriz das covariâncias e procedeu-se a comparação das médias dos tratamentos teste de Tukey a 5% de probabilidade.

3. Resultados

3.1. Coleta, isolamento e determinação da atividade enzimática dos diferentes fungos isolados

A partir das cinco diferentes amostras coletadas, foram isolados 27 fungos filamentosos (Tabela2).

Tabela 2. Fungos filamentosos isolados de diferentes materiais coletados.

Amostras	Fungos isolados a 30°C	Amostras	Fungos isolados a 30°C
Silagem de milho	F. 1 - Preto F. 2 - Verde F. 12 - Preto	Terra + Capim Tifton	F. 19 - Cinza F. 25 - Cinza
		Curral	F. 3 - Cinza F. 17 - Verde F. 24 - Cinza escuro F. 27 - Bege/cinza
Esterco de ovinos em decomposição	F. 4 - Amarelo F. 21 - Marrom F. 22 - Cinza claro F. 23 - Bege F. 26 - Bege		F. 5 - Roxo F. 6 - Roxo F. 9 - Rosa F. 10 - Verde F. 16 - Cinza F. 20 - Bege
Terra + Capim Tifton	F. 7 - Branco aveludado F. 8 - Cinza F. 11 - Branco F. 13 - Preto F. 14 - Bege/verde F. 15 - Verde F. 18 - Bege	Terra + Cana em decomposição	

Após os fungos serem submetidos à fermentação submersa a 30°C por 72 horas em meio SR contendo xilana 1%, os respectivos extratos intra e extracelular foram avaliados. Nos extratos extracelulares de cada microrganismo foram determinados os valores de pH final (Tabela 3). Apesar de dois fungos acidificarem o meio (pH 3,5-4,4; fungos 1 e 12), a maioria apresentou pH final alcalino (pH 8,0-9,2; 18 fungos) e apenas 6 fungos apresentaram pH na faixa de 7,1-7,8, próximos à neutralidade.

Tabela 3. Valores de pH final das diferentes culturas de fungos filamentosos avaliados.

Fungos	pH	Fungos	pH
F. 1	3,47	F. 15	8,53
F. 2	8,09	F. 16	8,42
F. 3	8,11	F. 17	7,54
F. 4	6,22	F. 18	8,88
F. 5	7,22	F. 19	9,11
F. 6	7,34	F. 20	8,51
F. 7	9,15	F. 21	8,20
F. 8	8,06	F. 22	8,11
F. 9	7,73	F. 23	9,22
F. 10	7,81	F. 24	9,00
F. 11	7,84	F. 25	8,82
F. 12	4,38	F. 26	8,75
F.13	8,54	F. 27	8,99
F. 14	8,25		

Observa-se na Tabela 4 os valores referentes à massa úmida dos micélios dos fungos e os teores de proteína intra e extracelular. Quanto à massa, pode-se concluir que os fungos 1, 2 e 4 apresentaram peso considerável do micélio (0,81g - 1,11g), o que corresponde a desenvolvimento adequado nas condições submetidas. Alguns fungos apresentaram crescimento intermediário, na faixa de 0,5g a 0,66g (Fungos 12, 14, 21 e 22), mas a maioria, contando com 12 fungos, permaneceu na faixa de 0,12g a 0,49g. Ficando 8 fungos com crescimento abaixo de 0,1g, representando baixo crescimento nas devidas condições.

A dosagem de proteínas em mg/mL foi realizada em todos os fungos tanto intra como extracelular, sendo que a maioria apresentou alto teor de proteínas, com destaque nos valores referentes ao extrato extracelular. Ainda assim esses valores são considerados baixos quando comparados com os dados encontrados na literatura. Alguns microrganismos apresentaram valores muito inferiores quando comparados com os demais (Fungos 7, 15, 16, 23, 24, 26 e 27), o que pode ser explicado pela baixa massa de micélio dos mesmos.

Tabela 4. Massa dos micélios e teores de proteína intra e extracelular dos fungos avaliados.

Fungos	Massa (g)	Proteína (mg tot.)	
		Intra	Extra
F. 1	1,11	7,28 ± 0,63	5,79 ± 0,04
F. 2	1,17	3,38 ± 0,21	5,07 ± 0,02
F. 3	0,12	3,13 ± 0,55	6,51 ± 0,08
F. 4	0,81	6,92 ± 0,02	7,06 ± 0,02
F. 5	0,26	4,15 ± 0,02	5,58 ± 0,02
F. 6	0,12	2,16 ± 1,10	8,48 ± 1,25
F. 7	0,05	0,53 ± 0,19	10,81 ± 1,50
F. 8	0,30	5,05 ± 1,75	8,78 ± 1,25
F. 9	0,30	5,01 ± 0,15	5,52 ± 1,33
F. 10	0,40	9,22 ± 1,23	8,46 ± 0,38
F. 11	0,16	3,66 ± 0,53	11,68 ± 0,25
F. 12	0,66	7,57 ± 0,63	7,45 ± 0,23
F. 13	0,25	6,01 ± 0,04	8,74 ± 0,36
F. 14	0,51	11,72 ± 3,05	7,19 ± 0,38
F. 15	0,12	0,97 ± 0,49	8,40 ± 0,06
F. 16	0,07	0,97 ± 0,49	7,02 ± 0,00
F. 17	0,49	4,89 ± 0,44	6,75 ± 0,53
F. 18	0,06	1,27 ± 0,25	9,14 ± 0,30
F. 19	0,09	1,25 ± 0,06	7,47 ± 0,53
F. 20	0,22	6,45 ± 0,15	4,46 ± 0,27
F. 21	0,56	5,50 ± 1,01	5,18 ± 0,87
F. 22	0,50	6,81 ± 1,52	5,29 ± 0,13
F. 23	0,02	0,42 ± 0,21	7,85 ± 1,50
F. 24	0,04	0,57 ± 0,06	9,18 ± 0,00
F. 25	0,25	4,44 ± 0,08	6,49 ± 0,06
F. 26	0,05	0,99 ± 0,61	8,71 ± 0,04
F. 27	0,08	0,89 ± 0,04	7,55 ± 0,32

Na tabela 5 estão apresentadas as atividades totais de xilanases e celulasas em U Total, as somatórias das atividades intra e extracelular e as atividades específicas em U Total / mg de proteína.

Os fungos 1, 2, 4, 5, 10, 12 e 17 apresentaram alta atividade total e específica de xilanase, sendo que apenas os fungos 1, 12 e 17 foram destacados como melhores produtores.

Os fungos 1, 4, 11, 14, 17 e 26 se destacaram pela maior produção de celulase quando comparados aos demais. Pode-se observar que a atividade específica tanto intra como extracelular foi relativamente baixa.

Tabela 5. Seleção de microrganismo para produção de xilanases e celulases.

Fungos	Xilanases					Celulases				
	Atividade Total (U total)		Atividade Total Intra + Extra	Atividade Específica (U/mg proteína)		Atividade Total (U total)		Atividade Total Intra + Extra	Atividade Específica (U/mg proteína)	
	Intra	Extra		Intra	Extra	Intra	Extra		Intra	Extra
F. 1	71,51 ± 1,49	104,49 ± 0,85	176,00	9,8	18,0	2,56 ± 0,12	1,89 ± 0,32	4,45	0,35	0,33
F. 2	46,61 ± 5,40	95,87 ± 1,84	142,48	13,8	18,9	0,68 ± 0,14	0,71 ± 0,21	1,39	0,20	0,14
F. 3	0,19 ± 0,39	49,30 ± 2,48	49,49	0,1	7,6	0,39 ± 0,09	0,60 ± 0,12	0,99	0,12	0,09
F. 4	47,09 ± 10,21	92,00 ± 0,66	139,09	6,8	13,0	1,01 ± 0,19	1,36 ± 0,27	2,37	0,15	0,19
F. 5	6,20 ± 1,51	111,09 ± 2,89	117,29	1,5	19,9	0,19 ± 0,04	0,92 ± 0,11	1,11	0,05	0,16
F. 6	4,07 ± 1,01	76,37 ± 1,76	80,44	1,9	9,0	0,12 ± 0,06	1,01 ± 0,16	1,13	0,06	0,12
F. 7	1,26 ± 0,68	10,59 ± 3,25	11,85	2,4	1,0	0,00 ± 0,01	0,76 ± 0,10	0,76	0,00	0,07
F. 8	5,52 ± 1,17	29,49 ± 3,48	35,02	1,1	3,4	0,10 ± 0,04	0,66 ± 0,16	0,76	0,02	0,08
F. 9	5,81 ± 1,01	74,52 ± 2,83	80,33	1,2	13,5	0,66 ± 0,11	0,45 ± 0,07	1,11	0,13	0,08
F. 10	25,68 ± 6,30	118,61 ± 2,41	144,29	2,8	14,0	0,54 ± 0,06	0,57 ± 0,08	1,11	0,06	0,07
F. 11	13,37 ± 0,58	42,23 ± 3,17	55,60	3,7	3,6	0,34 ± 0,04	1,79 ± 0,36	2,13	0,09	0,15
F. 12	75,87 ± 3,10	91,85 ± 2,69	167,72	10,0	12,3	2,70 ± 0,22	0,00 ± 0,00	2,70	0,36	0,00
F. 13	1,94 ± 0,57	35,75 ± 0,98	37,69	0,3	4,1	0,32 ± 0,05	0,92 ± 0,24	1,24	0,05	0,11
F. 14	7,27 ± 0,82	72,67 ± 3,08	79,93	0,6	10,1	1,44 ± 0,42	1,46 ± 0,23	2,90	0,12	0,20
F. 15	5,23 ± 0,89	88,09 ± 13,27	93,32	5,4	10,5	0,00 ± 0,00	0,94 ± 0,13	0,94	0,00	0,11
F. 16	0,00 ± 1,85	26,39 ± 1,43	26,39	0,0	3,8	0,01 ± 0,00	0,45 ± 0,12	0,46	0,01	0,06
F. 17	77,03 ± 5,07	95,39 ± 3,14	172,42	15,8	14,1	1,25 ± 0,17	1,37 ± 0,27	2,62	0,26	0,20
F. 18	0,19 ± 0,39	21,10 ± 13,17	21,29	0,1	2,3	0,02 ± 0,01	0,72 ± 0,18	0,74	0,02	0,08
F. 19	0,58 ± 0,67	9,97 ± 1,21	10,55	0,5	1,3	0,05 ± 0,02	1,13 ± 0,49	1,18	0,04	0,15
F. 20	4,46 ± 0,88	5,49 ± 1,96	9,95	0,7	1,2	0,28 ± 0,11	0,12 ± 0,07	0,40	0,04	0,03
F. 21	6,98 ± 2,73	31,06 ± 1,86	38,04	1,3	6,0	0,75 ± 0,44	0,95 ± 0,12	1,71	0,14	0,18
F. 22	7,95 ± 1,16	31,64 ± 4,00	39,59	1,2	6,0	0,30 ± 0,11	0,31 ± 0,07	0,61	0,04	0,06
F. 23	2,71 ± 0,39	8,65 ± 3,66	11,36	6,5	1,1	0,10 ± 0,02	1,20 ± 0,26	1,30	0,24	0,15
F. 24	2,91 ± 0,69	3,74 ± 1,78	6,65	5,1	0,4	0,00 ± 0,02	0,95 ± 0,21	0,95	0,00	0,10
F. 25	3,00 ± 1,02	5,35 ± 1,03	8,36	0,7	0,8	0,38 ± 0,04	0,59 ± 0,12	0,97	0,09	0,09
F. 26	0,97 ± 0,70	5,53 ± 2,45	6,50	1,0	0,6	0,03 ± 0,02	2,35 ± 0,93	2,38	0,03	0,27
F. 27	0,00 ± 0,84	5,65 ± 1,14	5,65	0,0	0,7	0,00 ± 0,02	0,62 ± 0,22	0,62	0,00	0,08

Foram selecionados os fungos 1, 10 e 17, devido à alta produção de xilanases. A identificação foi realizada na Faculdade Federal de Pernambuco, sendo eles *Aspergillus niger*, *Trichoderma viride* e *Aspergillus clavatus*, respectivamente. Optou-se seguir os experimentos utilizando o fungo *A. niger*.

3.2. Otimização das condições de cultivo e produção de enzimas fibrolíticas exógenas

O efeito do pH e da temperatura na atividade enzimática está apresentado na Figura 2. Observa-se que o pH ideal para maior atividade de xilanases (2,86U/mL) e CMCase (0,231U/mL) foi de 4,6 e 3,6, respectivamente. Com relação à temperatura, a maior atividade de xilanases e CMCase foi detectada a 60°C, com valores de 3,05 e 0,20 U/mL, respectivamente.

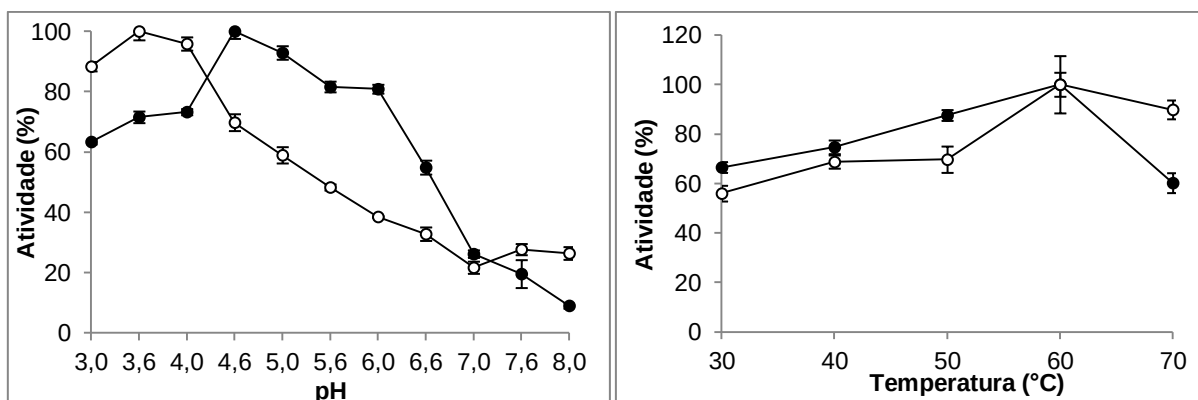


Figura 2. Influência do pH e da temperatura na atividade de xilanases (●) e CMCases (○) produzidas por *A. niger* em fermentação submersa com farelo de trigo como substrato a 30°C por 72 dias em agitação.

Os resultados da atividade de xilanases e CMCases em fermentação submersa com agitação e sem agitação estão apresentados nas Figuras 3 e 4, respectivamente. Observa-se na Figura 7 que o máximo da produção xilanolítica ocorreu após 96 horas de fermentação com agitação (3,02U/mL). No caso das CMCases, a máxima produção ocorreu após 120 horas de fermentação na mesma condição (0,218U/mL). Em relação à condição estática, a produção de xilanases foi maior após 168 horas de fermentação (23,64U/mL), nas CMcases foram observados dois picos de produção máxima, com o maior valor após 120 horas de fermentação (1,82U/mL). As atividades de ambas as enzimas foram maiores em condições estáticas.

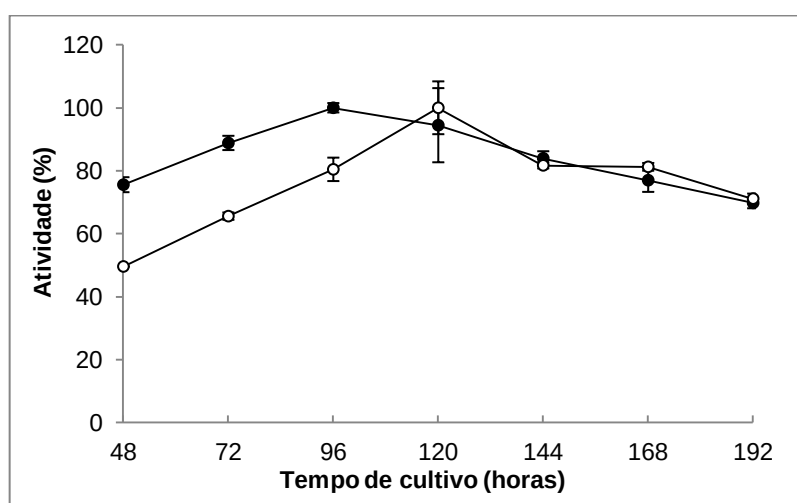


Figura 3. Produção de xilanases (●) e CMCases (○) em condições de fermentação submersa com agitação.

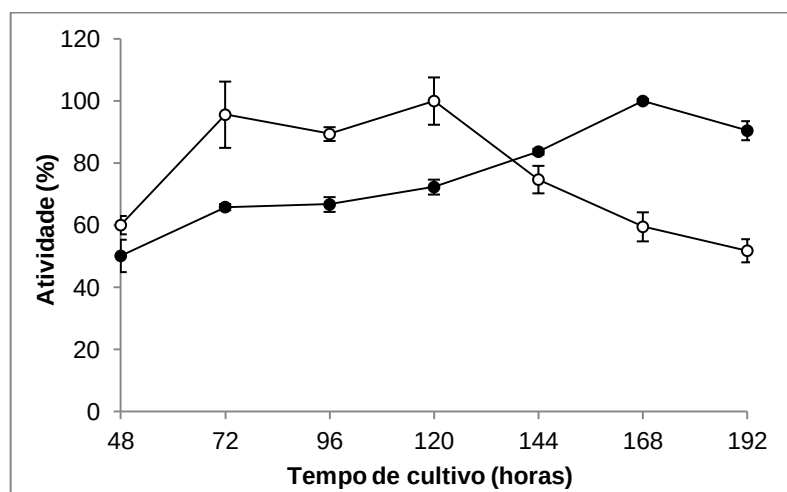


Figura 4. Produção de xilanases (●) e CMCase (○) em condições de fermentação submersa sem agitação.

Com relação à concentração de esporos, a Figura 5 mostra que a concentração ideal para maior produção de xilanase foi $1,5 \times 10^7$ esporos/mL. Observa-se que a atividade enzimática aumentou até a concentração ideal de conídios, diminuindo acentuadamente quando foram utilizadas maiores concentrações. Quanto à produção de CMCase, não foi verificado acentuado efeito da concentração de esporos, sendo $0,5 \times 10^7$ a concentração que apresentou maior produção de CMCase.

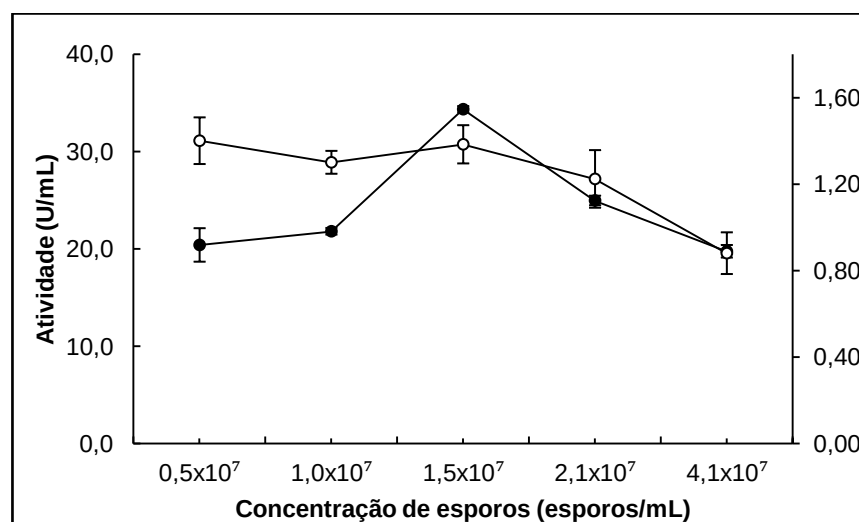


Figura 5. Efeito da concentração de esporos (esporos/mL) sobre a produção de xilanases (●) e CMCase (○).

Antes de iniciar a produção de enzimas para testes na nutrição de ruminantes, foi produzido um extrato bruto concentrado por meio de fermentação submersa com farelo de trigo como substrato por 168 horas a 30°C em condição estática, para verificar as diferenças nas atividades enzimáticas quando dosadas nas condições ideais das enzimas, como determinadas acima, versus condições de rúmen, 39°C e pH 6,0. Os resultados estão demonstrados na Figura 6. Observa-se que a atividade enzimática das duas enzimas é relativamente maior quando dosada nas suas condições ideais. Porém, a atividade enzimática de todo extrato bruto produzido para condução dos experimentos com nutrição de ruminantes foi dosada nas condições ruminais, visto que essa foi a condição imposta para a atuação enzimática.

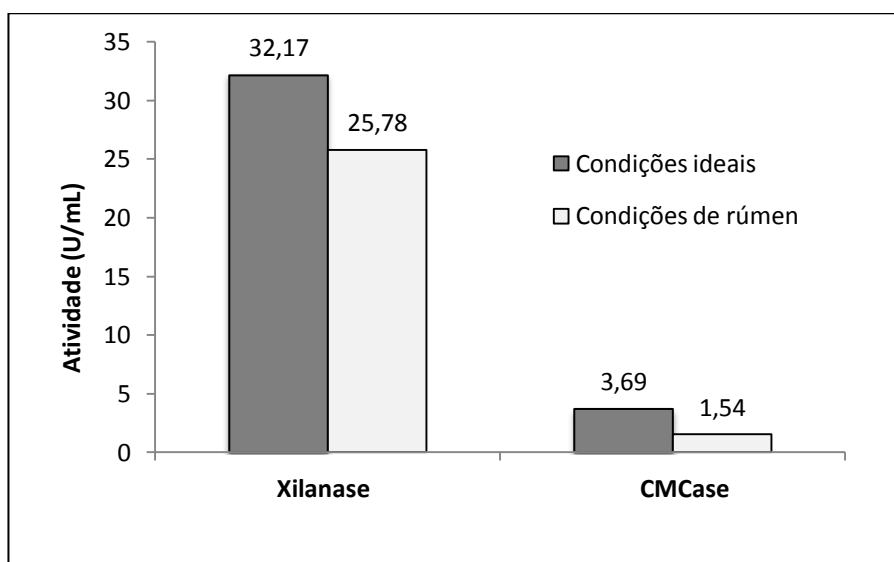


Figura 6. Atividade enzimática em pH e temperatura ideais (pH 4,6 – 60°C) versus condições de rúmen (pH 6,0 – 39°C).

3.3. Teste da estabilidade da enzima no ambiente ruminal

A análise da Tabela 6 expressa a atividade xilanásica do líquido ruminal dos animais inoculados ou não com extrato enzimático em diferentes tempos após a inoculação. Não foi encontrada atividade de CMCases. Diferença estatística foi verificada nos tratamentos e tempos de avaliação, porém não foi detectado interação. Animais que receberam extrato enzimático via cânula apresentaram maior atividade de xilanases (6,44U/mL) que os animais controle (4,90).

No momento em que foi inoculado o extrato enzimático no rúmen (0 horas), os animais tratados apresentaram maior quantidade de xilanases. Após meia hora, o nível de xilanases ainda permaneceu maior nos animais tratados, porém ocorreu queda nos dois tratamentos avaliados.

Durante todo o período analisado foi verificado maior atividade de xilanases no líquido ruminal dos animais que receberam o extrato enzimático diretamente no rúmen. Somente com oito horas de tratamento os níveis enzimáticos dos animais tratados se igualaram aos dos não tratados (Tabela 6 e Figura 7).

A figura 8 revela os valores de pH dos animais utilizados durante as 8 horas de avaliação. Observa-se que o pH diminui após a alimentação, chegando próximo ao valor de 5,9 com 6 horas.

Tabela 6. Atividade de xilanases presente nas amostras de líquido ruminal de cordeiros coletadas em diferentes horas após a inoculação do extrato enzimático.

Horas de avaliação	Atividade de xilanases (U/mL)
0	5,76 ab
0,5	4,46 b
1	4,77 b
2	5,07 ab
3	6,62 a
4	6,16 ab
5	6,13 ab
6	5,91 ab
7	6,24 a
8	5,61 ab
Tratamentos¹	
Controle	4,90 b
Enzima	6,44 a
Fontes de Variação	
Horas	*
Tratamentos	*
Horas x Tratamentos	ns
CV	13,78

¹Controle: Sem adição de enzimas e Enzima: Adição de 10 mL de extrato enzimático diretamente no rúmen de cordeiros.

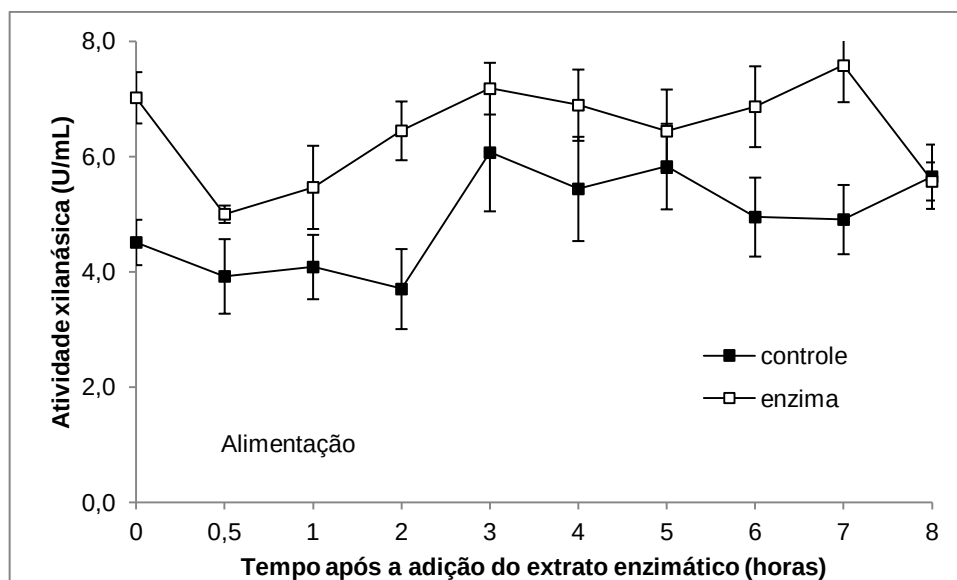


Figura 7. Atividade xilanásica (U/mL) em rúmen de ovinos tratados e não tratados com extrato enzimático.

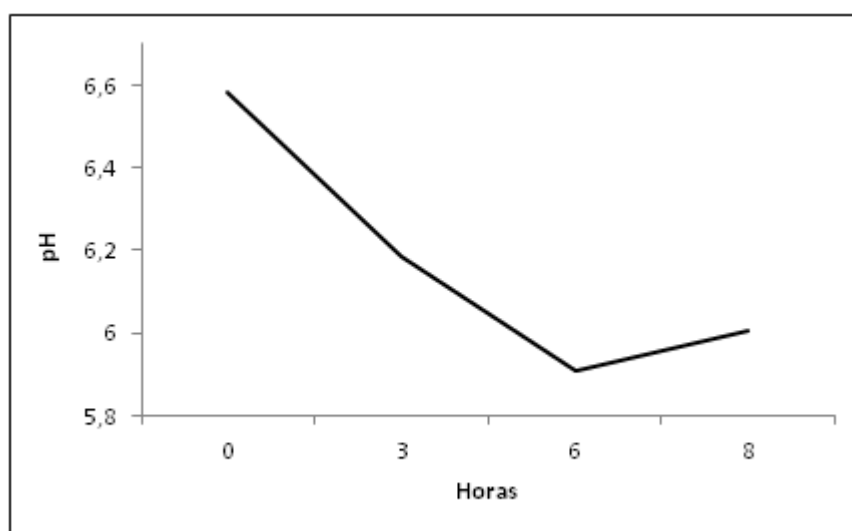


Figura 8. Valores de pH dos animais que receberam ou não o extrato enzimático no rúmen durante 8 horas após a inoculação.

4. Discussão

A coleta e seleção de microrganismos é uma etapa importante, uma vez que, permite avaliar cada espécie quanto à produção das proteínas de interesse. Neste estudo, foram isolados 27 fungos das 5 amostras coletadas em diferentes locais (Silagem de milho; esterco de ovinos em decomposição; Terra + Capim Tifton; Curral e Terra + Cana de açúcar em decomposição). Cada microrganismo foi

avaliado quanto à produção de xilanases e celulasas através de fermentação submersa em meio SR, contendo xilana Birchwood como substrato.

Alguns fungos se destacaram quanto à produção de xilanases, mas ainda assim esses valores são considerados baixos quando comparados com os dados encontrados na literatura. Foi observado que em algumas cepas, a atividade intracelular de xilanases foi maior, isso acontece porque cada microrganismo requer um tempo para produzir as enzimas e liberá-las para o meio extracelular.

Quanto à produção de celulasas, esta foi relativamente baixa, porém, esses fungos foram inoculados em meio contendo xilana Birchwood, o que não otimizou a produção de celulasas.

Apesar dos valores de atividade enzimática serem relativamente baixos, estão dentro do encontrado na literatura. Em estudo visando testar 22 produtos enzimáticos comerciais para ruminantes, Colombatto et al., 2003 verificaram atividades de xilanases que variaram de 17 a 3160 U/g de produto e 0,0 a 1047 U/g de produto nas celulasas, provando que mesmo produtos comerciais apresentam grande variabilidade de atividade enzimática, e isso não significa que a enzima não tenha efeito quando aplicada no setor de interesse.

No presente estudo, três fungos se destacaram por produzirem maiores quantidades de xilanases e celulasas nas condições submetidas, sendo o fungo *Aspergillus niger* escolhido para dar continuidade às pesquisas. A escolha do *A. niger* se justificou devido à alta produção de xilanases e por ser um microrganismo de fácil manejo e rápido crescimento, além de ser usado em indústrias alimentícias devido à pouca produção de toxinas.

O fato de o gênero *Aspergillus* ter sido selecionado como produtor de xilanases e celulasas, isso vai de encontro a algumas pesquisas, uma vez que este gênero tem se destacado como bom produtor de enzimas do complexo xilanolítico (Rizzatti, 2000; Rizzatti et al., 2001, 2004; Sandrim et al., 2005).

Após a seleção do microrganismo, iniciaram-se os estudos de padronização das condições de cultivo visando aumentar a produção de enzimas. Foram determinados valores de pH e temperatura que proporcionaram maior atividade enzimática, além de diferentes tempos de cultivo e concentração de esporos ideais para maior produção de xilanase e celulase.

A fermentação submersa foi realizada em meio SR contendo farelo de trigo 1% como substrato. A escolha do farelo de trigo foi importante por ser um resíduo agroindustrial, de baixo custo em comparação à xilana e quando usado para produção de xilanases pode resultar em um produto final com um custo mais baixo (Peixoto Nogueira et al., 2009).

Em relação ao pH ideal que expressou atividade máxima da xilanases e celulasas, observaram-se resultados semelhantes aos apresentados na literatura sobre as xilanases produzidas por *Aspergillus*, mostrando que a maioria apresenta atividade maior em pH ácido entre pH 4,5 e 5,5 (Polizeli et al., 2005).

Em relação à temperatura, Lucena Neto et al. (2004), trabalhando com xilanases de *H. grisea*, observaram maior atividade enzimática entre 55 e 60°C. Neste estudo CMcases apresentaram 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 & Yoshioka, 1980).

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.

O tempo requerido por *A. niger*, para síntese e secreção de xilanases, neste estudo (168 horas), está de acordo com o reportado na literatura para *A. awamori* e *A. oryzae* (Techapun et al., 2003), já *A. tamarii* requereu 120 horas (Techapun et al., 2003).

Foi observada melhor produção enzimática quando o fungo foi submetido à fermentação em condições estáticas nas duas enzimas em estudo, porém, a atividade de celulase foi maior com 120 horas de fermentação com ou sem agitação.

A contagem de esporos é outra variável importante, pois influencia diretamente no desenvolvimento da massa micelial e consequentemente na produção de enzimas. Neste estudo foi verificada uma concentração ideal de $1,5 \times 10^7$ e $0,5 \times 10^7$ nas xilanases e celulasas, respectivamente. Comparando-se com a literatura, verificou-se que o *Paecilomyces variotii*, para produção de amilases (Michelin et al., 2008), necessitou de uma concentração próxima a 10^6 conídios/mL.

Após os experimentos para padronização da produção de enzimas, um teste foi realizado a fim de verificar a diferença na atividade de xilanase e celulase quando submetidas às condições de pH e temperatura do rúmen. Observou-se menor atividade em condições ruminais nas duas enzimas em estudo, porém, foi decidido analisar a atividade enzimática a 39°C e pH 6,0, pois refletem as condições ruminais. De acordo com McAllister et al. (2001), esta abordagem pode ajudar a melhorar a seleção de enzimas para aplicação na nutrição animal.

Porém, para que as enzimas sejam eficazes como modificadoras da fermentação ruminal, elas devem resistir à proteólise por microrganismos do rúmen e ao pH e temperatura do meio durante um período de tempo suficientemente longo. Assim, realizou-se um experimento adicionando o extrato enzimático diretamente no rúmen de ovinos. Como resultado, não foi verificada atividade de celulase nas amostras coletadas, mas foi observado maior atividade de xilanases para os animais que receberam a enzima no rúmen até 7 horas após sua aplicação. Avaliando a variação do pH durante o período de incubação, observa-se que o pH diminuiu chegando próximo ao valor de 5,6 após 6 horas da inoculação, o que proporcionou condição mais favorável às xilanases, visto que o pH ideal de atuação das xilanases é de 4,6 a 6,0. Desse modo, a resistência das xilanases em estudo foi comprovada, assim como a não degradação das mesmas no rúmen, enfatizando que a adição dessas enzimas na alimentação de ruminantes poderá ter efeito benéfico na melhora da degradação da fração fibrosa do alimento.

O mesmo foi observado por Queiroz et al. (2004), o qual afirmaram que o extrato bruto, contendo as xilanases produzidas por *A. japonicus*, foi estável às condições ruminais. Em pesquisa para verificar a estabilidade de enzimas no líquido ruminal, Morgavi et al. (2000) concluíram que, na maioria delas, isso não constitui um fator limitante para sua utilização em dietas para ruminantes. Já Beauchemin et al. 1998, citado por Beauchemin et al. (1999), encontraram evidências de que a aplicação de enzimas, principalmente na forma líquida, sobre os alimentos, aumenta sua adsorção, com consequente aumento da resistência das enzimas à proteólise, o que prolongaria sua viabilidade no ambiente ruminal.

Segundo McAllister et al. (2001), o modo de ação das enzimas exógenas é extremamente complexo, acarretando respostas variáveis quando da sua utilização

em dietas de ruminantes. Assim mais estudos devem ser realizados com o objetivo de buscar, além da padronização da produção de enzimas e de atividade enzimática, a melhor maneira de aplicar as enzimas na dieta para ruminantes.

5. Conclusão

O fungo *Aspergillus niger* apresentou alta produção de xilanases e celulasas com condições de cultivo favoráveis à aplicação práticas dessas proteínas. As condições ótimas de produção das enzimas através do cultivo estático foram 120 e 168 horas de fermentação, com concentração de esporos de $1,5 \times 10^7$ e $0,5 \times 10^7$ esporos/mL nas xilanases e celulasas, respectivamente. As melhores condições para dosagens das atividades de celulasas e xilanases foram pH 3,6 e 4,6, com temperatura de 60°C em ambas as enzimas. Concluiu-se que as enzimas sobreviveram às condições ruminais, além de apresentarem resistência à degradação pelos microrganismos do rúmen.

6. Referências

- Beauchemin, K. A., Yang, W. Z. and Rode, L. M. 1999. Effects of grain source and enzyme additive on site and extent of nutrient digestion in dairy cows. **J. Dairy Sci.** 82: 378 390.
- Beauchemin, K.A.; Colombatto, D.; Morgavi, D.P.; Yang, W.Z. 2003. Use of exogenous fibrolytic enzymes to improve feed utilization by ruminants. **J Anim Sci**, v. 81, E37 E47.
- Colombatto, D.; Morgavi, D.P.; Furtado, A.F.; Beauchemin, K.A. 2003. Screening of exogenous enzymes for ruminant diets: Relationship between biochemical characteristics and in vitro ruminal degradation. **Journal of Animal Science**, v.81, p.2628- 2638.
- Da Silva, R., E.S. Lago, C.W. Merheb, M.M. Macchione, Y.K. Park, E. Gomes, 2005. Production of xylanase and cmcase on solid substrate fermentation in different residues by *Thermoascus aurantiacus* miehe. *Braz. J. Microbiol.*, 36: 235-241.
- Emerson, R. 1941. **An experimental study of the life cycles and taxonomy of Allomyces**. *Lloydia*, v. 4, p. 77-144.
- Facchini, F. D. A. 2010. Bioprospecção em fungos filamentosos com habitat em regiões de pastagens: produção de ligninase, xilanase e celulase visando à aplicação em nutrição animal. Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão para a obtenção do título de Mestre em Bioquímica. 240 p.

Gao, J., Weng, H., Zhu, D., Yuan, M., Guan, F., Xi, Y. 2008. Production and characterization of cellulolytic enzymes from the thermoacidophilic fungal *Aspergillus terreus* M11 under solid-state cultivation of corn stover. **Bioresour. Technol.** 99: 7623–7629.

Hawksworth, D.L.; Kirk, P.M.; Sutton, B.C. & Pegler, D.N. Ainsworth & Bisby.s, 1995. Dictionary of the Fungi. 8th. edn., CAB **International**, **Wallingford**, UK, 616 pp.

Hayashida, S.; Yoshioka, H. 1980. Production and purification of Thermostable cellulases from *Humicola isolens* YH-8. **Agric. Biol. Chem.**, 44, 1721-1728.

Lowry O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr A.L.; Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J Biol Chem**, 193:265–275.

Lucena-Neto A.S., Filho E.X.F., 2004. Purification and characterization of a new xylanase from *Humicola grisea* var. *thermoidea*. **Brazilian Journal of Microbiology** 35:86–90.

Martins S. A.; Vieira F. P.; Berchielli, T. T. et al. 2006. Taxa de passagem e parâmetros ruminais em bovinos suplementados com enzimas fibrolíticas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.35, n. 03, suppl. 0, p. 1-11.

McAllister, T. A.; Hristov, A. N.; Beauchemin, K. A.; Rode, L. M. and Cheng, K. J. 2001. Enzymes in ruminant diets. In: **Bedford, M.R.; Partridge, G.G.** (Ed.). Enzymes in farm animal nutrition. Oxon: Cab International. p. 273-297.

Michelin, M., Ruller, R., Ward, R. J., Moraes, L. A., Jorge, J. A., Terenzi, H. F., Polizeli M. L. T. M. 2008. Purification and biochemical characterization of a thermostable extracellular glucoamylase produced by the thermotolerant fungus *Paecilomyces variotii*. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.** 35(1): 17-25.

Miller, G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Anal Chem**, v. 31, no 3, p. 426-428.

Morgavi, D.P.; Newbold, C.J.; Beever, D.E.; Wallace, R. J. 2000. Stability and stabilization of potential feed additive enzymes in rumen fluid. **Enzyme and Microbial Technology**, v.26, n.2-4, p.171-177.

Peixoto-Nogueira, S.C. 2008. 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.

Peixoto-Nogueira, S.C.; Michelin, M.; Betini, J. H. A.; Jorge, J. A.; Terenzi, H. F.; Polizeli, M. L. T. M. 2009. Production of xylanase by *Aspergilli* using alternative carbon sources: application of the crude extract on cellulose pulp biobleaching. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 36, p. 149-155.

Polizeli, M. L. T.; Rizzatti, A. C. S.; Monti, R.; Terenzi, H. F.; Jorge, H. F.; Amorim, D. S. 2005. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, Berlin, v. 67, p. 577-591.

Polizeli, M.L.T.M. 2008. Properties and commercial applications of xylanases from fungi. In: **Mycotechnology: current trends and future prospects**, RAI, M.K. (editor), I.K. International Publisher, New Delhi, chapter.

Queiroz, R.C.; Bergamaschine, A.F.; Bastos, J.F.P. et al. 2004. Uso de produto à base de enzima e levedura na dieta de bovinos: Digestibilidade dos nutrientes e desempenho em confinamento. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.33, n.6, p.1548-1556.

Reis, A. P. 2007. **Purificacao, caracterizacao bioquimica e aplicacoes biotecnologicas de α - galactosidases de *Aspergillus terreus***. Vicosa: Pós-graduacao em Bioquímica, Universidade Federal de Vicosa, Minas Gerais, 108 p. Dissertacao (Mestrado).

Rizzatti, A. C. S. 2000. Estudo das atividades xilanásica e beta-xilosidásica produzidas pelo fungo *Aspergillus phoenicis*. **Medicina, Ribeirão Preto**, v. 33, n.3, p. 344-345.

Rizzatti, A.C.S.; Jorge, J. A.; Terenzi, H.F.; Rechia, C.G.V., Polizeli, M.L.T.M. 2001. Purification and properties of a thermostable extracellular β -D-xylosidase produced by thermotolerant *Aspergillus phoenicis*. **J Ind Microbiol Biotechnol**, vol.26, p.156-160.

Rizzatti, A.C.S.; Sandrim, V.C.; Jorge, J.A.; Terenzi, H.F.; Polizeli, M.L.T.M. 2004. Influence of temperature on the properties of xylanolytic enzymes of the thermotolerant fungus *Aspergillus phoenicis*. **J. Ind Microbiol Biotech**, 31:88–93.

Sandrim, V. C.; Rizzatti, A. C. S.; Terenzi, H. F.; Jorge, J. A.; Milagres, A. M. F.; Polizeli, M. L. T. M. 2005. Purification and biochemical characterization of two xylanases produced by *Aspergillus caespitosus* and their potential for Kraft pulp bleaching. *Process Biochemistry*. Elsevier – Holand, v. 40, p. 1823-1828, 2005.

Sardar M.; Roy I.; Gupta M.N. 2000. Simultaneous purification and immobilization of *Aspergillus niger* xylanase on the reversibly soluble polymer Eudragit™ L-100. **Enzyme Microbial. Tech.**, 27: 672-679.

Senthilkumar, S.R.; Ashokkumar, B.; ChandraRaj, K.; Gunasekaran, P. 2005. Optimization of medium composition for alkali-stable xylanase production by *Aspergillus fischeri* Fxn 1 in solid-state fermentation using central composite rotary design. **Bioresour. Technol.** 96: 1380-1386.

Techapun, C.; Poosaran, N.; Watanabe, M. and Sasaki, K. 2003. Optimization of aeration and agitation rates to improve cellulose-free xylanase production by

thermotolerant *Streptomyces* sp. Ab106 and repeated fed-batch cultivation using agricultural waste. **J. Biosci. Bioeng.**, 95, 298-301.

Varga, G.A.; Kolver, E.S. 1997. Microbial and animal limitations to fiber digestion and utilization. **Journal of Nutrition**, v.127, p.819-823.

CAPITULO 3 – AVALIAÇÃO DE ENZIMAS FIBROLÍTICAS EXÓGENAS NA COMPOSIÇÃO QUÍMICA, PERFIL FERMENTATIVO E ESTABILIDADE AERÓBIA DE SILAGEM DE MILHO

RESUMO – Objetivou-se com o presente trabalho, avaliar os efeitos da utilização de enzimas fibrolíticas exógenas sobre os parâmetros de fermentação, composição química e estabilidade aeróbia de silagem de milho. A planta de milho foi colhida quando apresentou teor de matéria seca de 27% e foi submetida a quatro tratamentos (**Controle**: Sem adição de enzimas; **E5**: Ensilagem com 5,0 mL de extrato enzimático/Kg de forragem; **E10**: Ensilagem com 10,0 mL de extrato enzimático/Kg de forragem; **E15**: Ensilagem com 15,0 mL de extrato enzimático/Kg de forragem), distribuídos em um delineamento inteiramente casualizado com três repetições. As enzimas fibrolíticas foram produzidas através do cultivo de *Aspergillus niger* em meio SR contendo 1% de farelo de trigo, através de fermentação submersa sem agitação por 168 horas. O extrato enzimático apresentou atividade de xilanases de 20,59 U/mL e 1,04 U/mL de celulasas (em pH 6,0 a 30°C). Foram utilizados baldes experimentais como mini silos, onde as silagens foram mantidas até a abertura para avaliação das mesmas (2, 7, 14, 21 e 60 dias). A forragem ensilada, assim como as amostras coletadas durante a fermentação e fase de avaliação da estabilidade aeróbia, foram avaliadas quanto às características fermentativas, composição química, microbiologia e perdas fermentativas. A adição de diferentes doses de enzimas na ensilagem de milho não melhorou as características fermentativas das silagens avaliadas, porém proporcionou pequenas alterações no conteúdo de fibra das mesmas no início do processo fermentativo. O conteúdo de carboidratos solúveis no início da fermentação da silagem foi maior naquelas silagens tratadas e nenhum efeito verificado na degradabilidade e produção de gás *in vitro*. A adição de enzimas não alterou o pH e ocorrência de microrganismos no pós abertura. A silagem que recebeu a maior dose de enzima foi a que apresentou maior estabilidade aeróbia (46 horas).

Palavras-chave: *Aspergillus niger*, celulasas, ensilagem, xilanases

2. Introdução

A confecção de silagens é uma alternativa para minimizar os efeitos da estacionalidade da produção de forragem das pastagens. Esta prática possibilita melhor aproveitamento do volumoso no período de alta produção e oferta satisfatória de alimento de qualidade durante o período de escassez.

De acordo com Woolford (1984), o potencial de uma planta para ensilagem é dependente do teor original de umidade, que deve ser de 66 a 72%, do conteúdo de carboidratos solúveis, acima de 8,0% na matéria seca, e do baixo poder tampão, que não deve oferecer resistência à redução do pH para valores de 3,8 a 4,0.

Assim, alguns aditivos, em especial enzimas fibrolíticas, têm sido adicionadas na forragem no momento da ensilagem com o objetivo de melhorar a fermentação e por consequência a performance animal. A planta de milho apresenta todas as características desejadas para uma ótima fermentação da silagem. Porém, pode conter grandes quantidades de fibras estruturais, as quais limitam o consumo de matéria seca e a digestibilidade da forragem (Chen et al., 1994).

Enzimas adicionadas na ensilagem melhoram a fermentação porque podem disponibilizar maiores quantidades de carboidratos solúveis para as bactérias ácido lácticas, o que resulta em rápida queda do pH. Além disso, essas enzimas podem atuar na degradação da parede celular da forragem, diminuindo o conteúdo de fibra e potencializando o desempenho animal.

Uma vantagem adicional poderia ser que, pela degradação da parede celular da forragem, a taxa e extensão da digestão da silagem no rúmen podem ser aumentadas (Bolsen et al., 1995). Porém, quando o FDN rapidamente fermentável é degradado, essa fermentação extensiva da forragem antes da alimentação pode diminuir a digestibilidade do FDN restante (Van Vuuren, 1995) devido ao aumento da proporção do FDN indigestível. Silagens tratadas com enzimas comerciais produziram menos gás e foram degradadas mais lentamente que a silagem controle, o que implicou que o substrato menos fermentável estava disponível para os microrganismos do rúmen (Colombatto et al., 2004).

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

solúveis ou tão complexos como a remoção de íons de barreiras estruturais. O efeito depende do tipo de alimento e do tipo de enzima utilizada (Krueger & Adesogan, 2008).

Pesquisas anteriores têm demonstrado que enzimas reduzem os componentes fibrosos da silagem de milho, embora os efeitos na taxa e extensão da degradação no rúmen têm sido inconsistentes (Spoelstra et al., 1992 ; Sheperd & Kung, 1996b). A respeito, Hristov & McAllister (2002), notaram que ao adicionar aditivos enzimáticos, uma melhor preservação da forragem ensilada foi conseguida, assim como alta concentração de açúcares solúveis e maior degradabilidade ruminal.

Outro fator que merece atenção e deve ser estudado é o nível de enzima a ser aplicado tanto na ensilagem como diretamente na dieta do animal. Este é um fator muito variável, pois depende do produto enzimático a ser utilizado, da forragem a ser ensilada e da dieta a ser fornecida. Muitas vezes, doses elevadas podem prejudicar a eficácia das enzimas, mas também doses muito baixas não expressam o potencial enzimático.

Nsereko et al. (2002) especularam que a aplicação de um nível moderado de enzimas na alimentação de ruminantes causou uma ruptura benéfica da estrutura da superfície dos alimentos, antes ou após a ingestão. Em outros estudos, demonstraram que a adição de níveis elevados de enzimas podem ser menos eficazes do que níveis mais baixos e, o nível ótimo pode depender da dieta (Beauchemin et al., 2003).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a composição química, perfil fermentativo e estabilidade aeróbia de silagem de milho inoculada com enzimas fibrolíticas exógenas, principalmente xilanases e celulasas, produzidas por fermentação submersa de *Aspergillus niger*

2. Material e métodos

O experimento foi conduzido no setor de Forragicultura da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista (FCAV/UNESP), campus de Jaboticabal. O milho utilizado foi o 2B688 (Dow Agrosience) cultivado sob irrigação. A colheita foi realizada quando o mesmo apresentou 27% de MS,

sendo o corte realizado manualmente a 10 cm da superfície do solo e picado por uma forrageira acoplada ao trator.

Foram avaliadas as seguintes silagens: **Controle** – Ensilagem sem adição de enzimas; **E5** – Ensilagem com 5,0 mL de extrato enzimático/Kg de forragem; **E10** – Ensilagem com 10,0 mL de extrato enzimático/Kg de forragem; **E15** – Ensilagem com 15,0 mL de extrato enzimático/Kg de forragem. O extrato enzimático foi produzido através da fermentação submersa de *Aspergillus niger* em meio SR contendo 1% de farelo de trigo como substrato. O tempo de fermentação foi de 168 horas sem agitação. A concentração de esporos inoculada no meio de cultivo foi de $1,5 \times 10^7$. O extrato enzimático continha 20,59 U/mL e 1,04 U/mL de atividade de xilanases e celulases, respectivamente, determinadas através da metodologia descrita por Miller (1959), utilizando ácido 3', 5' – dinitrossalicílico (DNS). As condições de dosagem das atividades enzimáticas foram pH 6,0 a 40°C.

2.1. Ensilagem e Fermentação

A planta de milho, após ser picada (tamanho de partícula de 10 mm), foi dividida em quatro lotes. O primeiro lote foi pulverizado com 15 mL de água destilada/Kg de forragem, sendo os outros três lotes pulverizados com 5,0; 10,0 e 15,0 mL de extrato enzimático/Kg de forragem, completando assim os quatro tratamentos avaliados. Como mini silos experimentais, foram usados baldes com capacidade de 5 litros.

O extrato enzimático foi produzido através de fermentação submersa em meio SR contendo 1% de farelo de trigo como substrato. O cultivo do fungo foi em condição estática, a 30°C por 168 horas. O extrato enzimático foi adicionado na proporção 1% da matéria natural total a ser ensilada nos mini silos, sendo esta a dose média. Segundo Beauchemin e Rode (1996), a inclusão de enzimas com 0,01% a 1% da dieta apresenta atividade fibrolítica 10 a 100 vezes maior por grama de alimento, que silagens tratadas com aditivos.

Antes da ensilagem, os baldes foram pesados e após serem completados com a planta de milho picada, foram pesados novamente. Duas amostras de forragem úmida foram coletadas para caracterizar a planta de milho no momento da ensilagem (Dia 0).

A compactação foi realizada, manualmente, com ajuda de bastões de ferro até atingir densidade de aproximadamente 600 Kg/m³. Os baldes foram fechados com tampas, lacrados com fita adesiva e o peso registrado. Posteriormente foram armazenados em sala com temperatura ambiente. Após 2, 7, 14, 21 e 60 dias, os respectivos baldes foram pesados, abertos e amostras coletadas para avaliação de perdas e perfil fermentativo.

Para a determinação da recuperação da matéria seca (MS) e perdas da mesma, foi utilizado metodologia descrita por Jobim et al. (2007). As perdas por gases foram quantificadas de acordo com equação descrita abaixo:

$$PG = (PSI - PSF) / MSI * 100, \text{ sendo:}$$

onde:

PG= produção de gases;

PSI= peso do silo no momento da ensilagem (kg);

PSF= peso do silo no momento da abertura (kg);

MSI= matéria seca ensilada (quantidade de forragem (kg) * % matéria seca).

Amostras foram coletadas tanto na ensilagem como nos dias de fermentação para avaliação da composição química das silagem. Amostras de forragem úmida e silagem foram armazenadas em freezer e posteriormente processadas para obtenção de extrato aquoso segundo Kung Jr. et al. (1984). Assim, o pH foi determinado usando um pHmetro (Modelo MA522, Marconi equipamentos para Laboratório, Piracicaba, SP, Brasil). Os ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), como ácido acético, propiônico e butírico foram mensurados por meio de cromatografia gasosa utilizando aparelho Shimadzu GC2014 (Shimadzu, Kyoto, Japão), e o ácido láctico (AL) foi determinado através do método colorimétrico (Barker & Summerson, 1941). A concentração de nitrogênio amoniacal (N-NH₃) foi mensurada por destilação (AOAC, 1996, 941.04). Os carboidratos solúveis foram mensurados segundo metodologia descrita por Nelson-Somogyi (1994).

Outra amostra de forragem úmida foi reservada para imediata análise microbiológica. Em laboratório para avaliação microbiológica de silagens, 25g de amostra foram adicionadas a 225 mL de solução autoclavada de peptona a 0,1% (0,1g de peptona por litro de água destilada). Após homogeneização das amostras,

1 mL foi coletado para realização de diferentes diluições (10^{-1} a 10^{-5}), a partir dessas diluições, foram realizados inóculos de 0,1 mL em placas de Petri contendo meio ágar batata acidificado (Difco). Em seguida, as placas foram levadas para estufa bacteriológica por 72 horas a 28°C para contagem de leveduras e por 120 horas para contagem de fungos filamentosos (Jobim et al., 1999).

A última amostra coletada foi pesada e levada à estufa com ventilação forçada a 55°C por 72 horas para determinação da 1ª MS. Posteriormente foram moídas utilizando peneira com crivos de 1mm e analisadas quanto à 2ª MS (105°C por 12h) e cinzas (500°C por 5h). Fibra em detergente neutro (FDN) e detergente ácido (FDA) foram determinadas segundo metodologia de Van Soest et al. (1991) utilizando bolsas de filtro (F-57, Ankon Technology, Macedon, NY) sem adição de sulfito de sódio. Foi utilizada α -amilase termoestável para análise de FDN. A lignina foi mensurada após hidrólise da celulose em ácido sulfúrico 72% no resíduo da amostra submetida ao detergente ácido (Van Soest & Robertson, 1985). Análise da proteína bruta da silagem foi realizada por rápida combustão usando LECO F528 (LECO Corporation, St. Joseph, MI, USA) e calculada como N*6,25.

Amostras referentes aos 60 dias de fermentação foram utilizadas para avaliação *in vitro* da produção de gás e degradabilidade da FDN após 24 e 48 horas de incubação. Foram utilizadas bolsas de filtro (F57, ANCON), as mesmas foram pesadas antes de receberem 0,5 g de amostra e após serem seladas, foram pesadas novamente e inseridas em tubos de vidro com capacidade de 115 mL. Foi injetado dentro dos tubos, 60 mL de uma mistura contendo solução tampão (Goering & Van Soest, 1970) e fluído ruminal na proporção de 4:1. Os tubos foram lacrados e incubados em banho maria a 39°C por 48 horas. A produção de gás, resultante da fermentação do substrato, foi mensurada após 3, 6, 9, 12, 24 e 48 horas após a incubação. Para cálculo da produção de gás acumulada foi utilizada a equação: Volume de gas (mL)= (5,4766*pressão)+0,0934, obtida nas mesmas condições do experimento.

Após 24 e 48 horas, os tubos foram removidos, colocados imediatamente no gelo e posteriormente deslacrados para remoção das bolsas de filtro. As mesmas foram lavadas com água limpa e corrente até a água apresentar aspecto claro. As bolsas de filtro foram levadas para análise da FDN em equipamento Ankom 2000

(Ankom Technologies, Macedon, NY, USA). Após, foram levadas à estufa 60°C por 48 horas e posteriormente pesadas para avaliação da degradação da FDN.

2.2. Avaliação da estabilidade aeróbia

Os silos foram abertos após 60 dias de fermentação, sendo descartado o material deteriorado, o restante homogeneizado e colocado em baldes plásticos acondicionados em uma sala em temperatura ambiente. No intuito de avaliar as silagens durante a exposição aeróbia, as mesmas foram avaliadas nos dias 0 (abertura), 1, 3 e 5 após a abertura.

A leitura da temperatura foi registrada a cada meia hora por meio de um *data logger* inserido no centro da massa ensilada e, a temperatura ambiente foi medida por meio de *data logger* localizado próximo aos silos experimentais.

Os parâmetros para avaliação da instabilidade aeróbia constituíram-se no aumento em 2°C da temperatura da silagem em relação ao ambiente após a abertura dos silos (Moran et al., 1996; Taylor et al., 2002).

Amostras frescas foram coletadas em cada tempo de avaliação para determinação do pH, N-NH₃ e análises microbiológicas, como descrito no item 2.1. Uma segunda amostra foi coletada para avaliação do teor de MS da silagem.

2.3. Análise estatística

As silagens foram distribuídas em um delineamento inteiramente casualizado com quatro tratamentos e três repetições. Os dados experimentais foram analisados através do software SAS (SAS Inst. Inc., Cary, NC). A pressuposição de normalidade dos erros foi analisada utilizando o teste de Box-Cox e homogeneidade das variâncias Distância de Cook. Os dados foram analisados como medidas repetidas no tempo (*Split-plot in time*) através do PROC MIXED, o qual analisou a melhor estrutura da matriz das covariâncias e procedeu-se a comparação das médias dos tratamentos teste de Tukey a 5% de probabilidade conforme a variável analisada.

3. Resultados

3.1. Perfil fermentativo

A composição química das amostras no momento da ensilagem como também nos diferentes tempos de fermentação avaliados está apresentada na Tabela 1 e Figuras 1 e 2. Somente as variáveis que apresentaram interação tempo x tratamento, foram representadas em forma de gráficos.

Com relação à PB ($p < 0,05$), a silagem controle apresentou o menor teor quando comparada com as demais na maioria dos tempos de fermentação. Na Figura 1 verificou-se que os teores de PB de todas as silagens avaliadas diminuíram com dois dias de fermentação, com posterior aumento e nova queda após 21 dias.

O mesmo foi observado com relação ao conteúdo de N amoniacal das silagens, onde a controle apresentou menor conteúdo dessa variável (26,4 g/Kg Ntotal), porém não diferiu estatisticamente das E5 e E10 (33,03 e 39,35 g/Kg MS). Porém ao contrário do comportamento das silagens em relação aos teores de PB, foi verificado aumento de N amoniacal em todas as silagens aos 2 dias de fermentação, com média de 41,74 g/Kg Ntotal. Após esse período foram verificadas oscilações nos teores dessa variável.

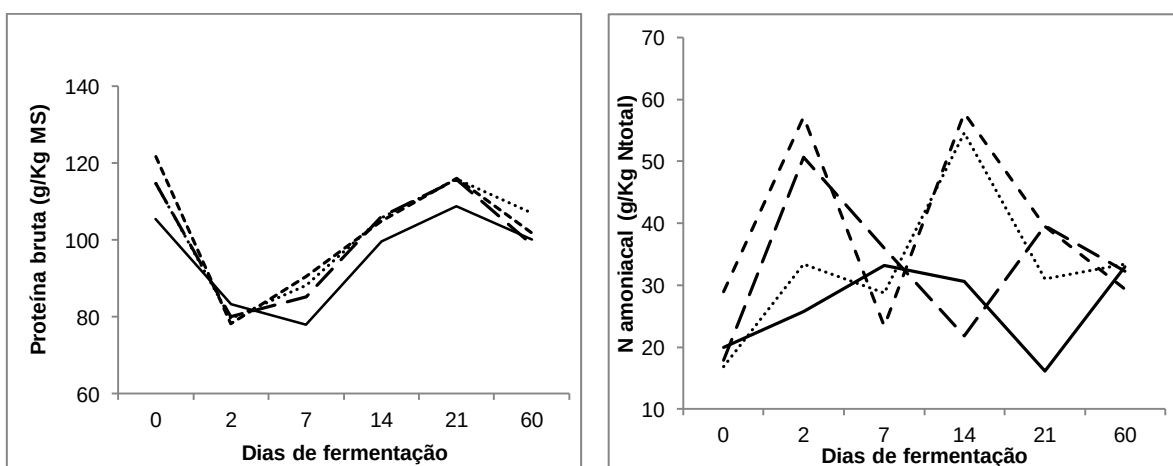


Figura 1. Comportamento das silagens inoculadas com enzimas fibrolíticas durante os tempos de fermentação com relação à proteína bruta e N amoniacal. Os tratamentos foram silagem sem enzima (—); E1, E2 e E3: silagem com 5 (---), 10 (.....) e 15 (-.-.-) mL de extrato enzimático/Kg de forragem.

Aos dois dias de fermentação, houve aumento no teor de FDN na silagem controle (634,1 g/Kg MS), porém menores valores foram observados nas silagens tratadas no mesmo dia (E1: 592,1; E2: 574,2 e E3: 567,3 g/Kg MS), não havendo diferença estatística entre as silagens E1, E2 e E3 (Tabela 1 e Figura 2). Após dois dias houve queda nos teores de FDN, com seguido aumento no final da fermentação. Com relação a celulose o tratamento controle o que apresentou maior valor (300,32 g/Kg MS).

Observou-se aumento nos teores de carboidratos solúveis nas silagens tratadas (E1: 65,99; E2: 70,93; E3: 69,43g/Kg MS) no segundo dia de fermentação, ao contrário da silagem controle, que apresentou diminuição dessa variável (33,60 g/Kg MS). Após dois dias de fermentação verificou-se queda nos teores de carboidratos solúveis em todas as silagens avaliadas (Tabela 1 e Figura 2).

O pH não sofreu alteração pela adição de enzimas fibrolíticas, apresentando queda aos dois dias de fermentação, com média de 3,74 quando comparado com a ensilagem de 4,57. Após 2 dias de fermentação se manteve estável, até os 21 dias.

Com relação ao ácido láctico das silagens, houve queda aos 7 dias de fermentação com posterior aumento dessa variável no decorrer dos dias. Com 14 dias de fermentação foi verificada maior quantidade dessa variável nas silagens inoculadas (E5: 79,81 e E10: 68,40 e E15: 62,25 g/Kg MS) quando comparadas com a silagem controle (45,82g/Kg MS). A silagem que recebeu a menor dose foi a que apresentou maior conteúdo de ácido láctico, com média de (67,03 g/Kg MS).

Na Figura 2 pode-se observar que com dois dias de fermentação a silagem que não recebeu enzimas apresentou maior conteúdo de ácido acético (14,0g/Kg MS), diferindo das demais. Após esse período nenhum efeito foi verificado na quantidade dessa variável.

Tabela 1. Composição química de silagens de milho inoculadas com enzimas fibrolíticas no momento da ensilagem, expressa em g/Kg de matéria seca.

Variáveis ¹											
Dias de Fermentação	MS	MM	AC	AL	FDN	FDA	CEL	LIG	HEM	pH	CS
0	273,0a	64,99bc	-	-	543,28b	317,78d	264,83b	29,53c	246,11ab	4,57a	68,75a
2	272,7a	70,59b	8,91b	58,70a	591,91a	367,54a	302,81a	43,09a	255,46a	3,74b	59,98a
7	269,9a	65,70c	12,31a	49,32b	554,14b	335,86cd	275,59b	32,14bc	230,59b	3,57c	23,07bc
14	261,4c	67,77b	12,21a	64,06a	559,76b	349,89abc	292,19a	36,90b	230,49b	3,55cd	30,16b
21	263,9bc	67,37b	8,55b	60,96a	578,89ab	354,06ab	292,26a	40,49a	236,36ab	3,50d	22,50c
60	264,8abc	81,89a	11,02ab	59,70a	599,05a	378,86a	303,01a	40,72a	249,40ab	3,60c	20,03c
Tratamentos ³											
Controle	271,20	70,23	11,52	58,20b	585,02	361,45a	300,32a	38,00ab	252,98	3,73	37,43ab
E5	270,09	68,05	10,11	67,03a	568,45	339,12b	282,36b	36,10ab	242,78	3,80	34,29b
E10	264,94	71,95	10,39	52,88b	565,09	354,17a	286,48ab	34,52b	232,52	3,74	36,30ab
E15	263,04	68,75	10,38	56,09b	572,69	347,91ab	284,63ab	39,79a	237,24	3,74	41,64a
Fontes de Variação											
Dias	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Tratamentos	ns	ns	ns	*	ns	*	*	*	ns	ns	*
Dias x Tratamentos	ns	ns	*	*	*	ns	ns	*	ns	*	*

¹Variáveis: MS: Matéria seca; MM: Matéria mineral; PB: Proteína bruta; FDN: Fibra em detergente neutro corrigida para cinzas; FDA: Fibra em detergente ácido; CEL: Celulose; LIG: Lignina; HEM: Hemicelulose; CS: Carboidratos solúveis;

²N-NH₃: N amoniacal (g/Kg N total);

³ Controle: Silagem sem enzima; E1, E2 e E3: silagem com 5, 10 e 15 mL de extrato enzimático/Kg de forragem.

ns: não significativo e *: significativo (p<0,05)

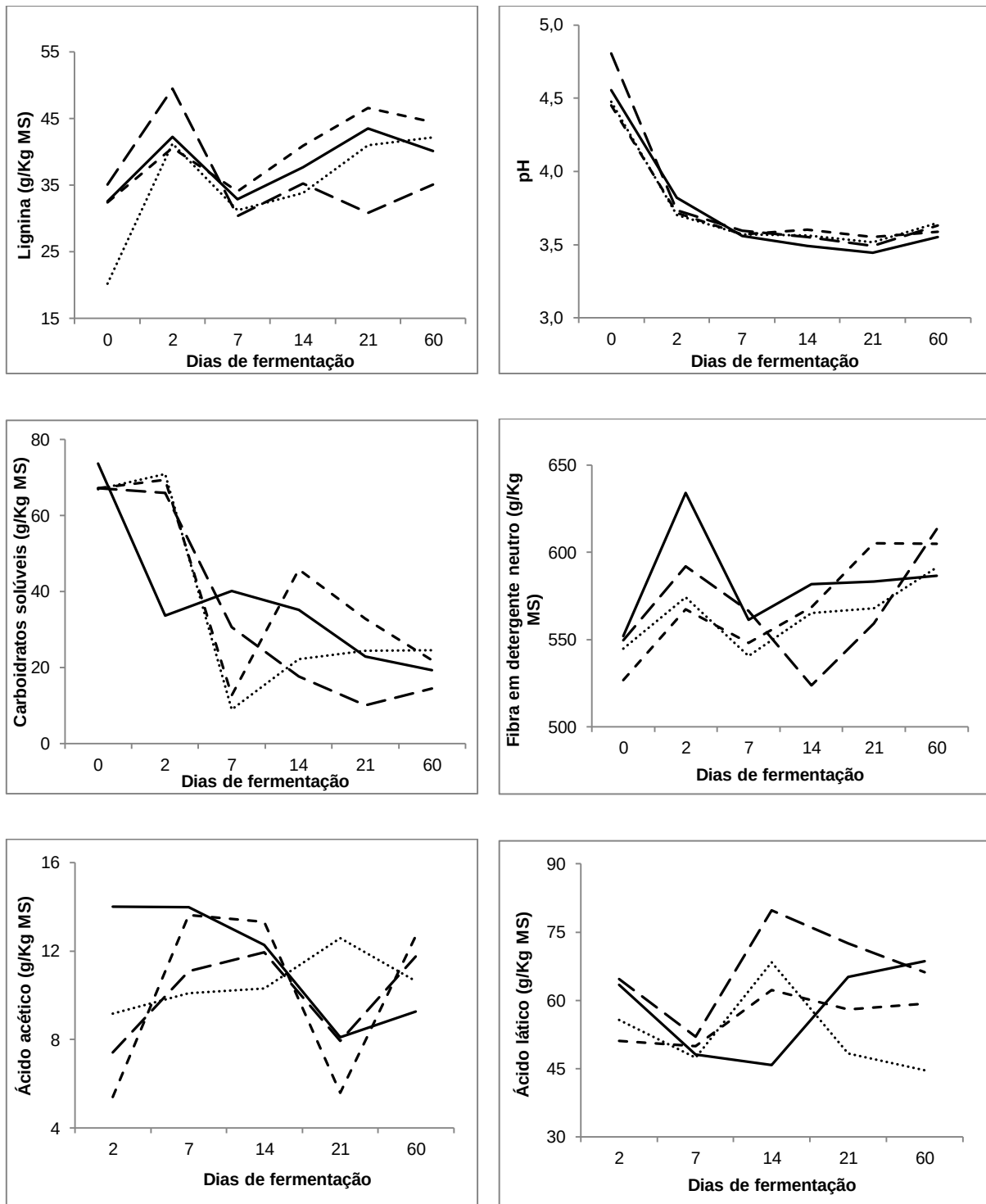


Figura 2. Comportamento das silagens inoculadas com enzimas fibrolíticas durante os tempos de fermentação apenas nas variáveis que apresentaram interação Tratamentos x Dias. Os tratamentos foram silagem sem enzima (—); E1, E2 e E3: silagem com 5 (---), 10 (.....) e 15 (-.-.-) mL de extrato enzimático/Kg de forragem.

O uso de enzimas fibrolíticas na ensilagem não influenciou nas perdas e recuperação da matéria seca, com efeito mínimo verificado nas perdas por gases (Tabela 2).

Tabela 2. Perdas fermentativas, recuperação da matéria seca e concentrações de ácidos láctico e acético em silagens de milho inoculadas com enzimas fibrolíticas no momento da ensilagem.

Variáveis ¹			
DIAS	RMS	PG	PMS
2	94,09	1,01b	5,75
7	94,29	1,02b	7,03
14	93,18	1,05b	6,79
21	93,76	1,12a	6,34
60	92,86	1,08ab	7,02
Tratamentos ²			
Controle	94,62	0,98b	5,43
E5	94,19	1,05ab	5,81
E10	91,25	1,13a	8,65
E15	94,48	1,08a	6,46
Fonte de Variação			
Dias	ns	*	ns
Tratamentos	ns	*	ns
Dias x Tratamentos	ns	*	ns

¹Variáveis: RMS: Recuperação da matéria seca (%); PG: Perdas por gases (%); PMS: Perdas de matéria seca (%); AC: Ácido acético (g/Kg MS); AL: Ácido láctico (g/Kg MS);

² Controle: Silagem sem enzima; E1, E2 e E3: silagem com 5, 10 e 15 mL de extrato enzimático/Kg de forragem. ns: não significativo e *: significativo (p<0,05)

3.2. Estabilidade aeróbia

Na avaliação durante a exposição ao ar, observou-se que a adição de enzimas fibrolíticas não alterou o pH das silagens (Tabela 3). O mesmo comportamento foi observado quando se avaliou a contagem de leveduras, porém, com relação a contagem de fungos filamentosos, houve diferença significativa entre silagens com relação ao primeiro dia após a abertura dos mini silos. As silagens contendo a menor e maior dose enzimática (E5 e E15) foram os que apresentaram maior contagem de fungos.

Tabela 3. Dinâmica de leveduras e fungos filamentosos, valores de pH e matéria seca de silagem de milho em função dos tratamentos e dias de exposição aeróbia.

Dias	Tratamentos ¹					Tratamentos ¹							
	Controle	E5	E10	E15	Médias	CV	Controle	E5	E10	E15	Médias	CV	
	pH						Matéria seca						
0	3,6	3,6	3,7	3,6	3,6C	0,01	265	272	261	260	265C	6,56	
1	3,6	3,6	3,6	3,6	3,6C	0,01	336a	316b	306c	273d	308B	8,79	
3	5,0	4,9	4,9	5,4	5,1B	0,01	382	386	372	391	383A	8,91	
5	7,0	7,0	7,1	7,4	7,1A	0,01	305	308	290	316	305B	7,63	
Média	4,8	4,8	4,8	5,0			322	321	307	310			
CV	0,001	0,003	0,006	0,001			13,52	16,33	12,72	16,58			
	FUNGOS (log10 ufc/g de silagem)						LEVEDURAS (log10 ufc/g de silagem)						
0	4,1	4,5	4,4	4,0	4,2C	0,12	1,2	2,5	0,0	4,1	1,9B	0,28	
1	3,8b	5,1a	3,9b	5,0a	4,5C	0,22	6,8	6,9	6,4	6,9	6,7A	0,14	
3	5,9	5,3	5,5	5,6	5,6B	0,19	7,2	7,0	7,3	6,7	7,1A	0,21	
5	6,3	6,4	6,4	6,4	6,3A	0,16	7,5	6,8	7,2	6,5	7,0A	0,19	
Média	5,0	5,3	5,0	5,3			5,7	5,8	5,2	6,1			
CV	0,35	0,22	0,30	0,29			0,83	0,65	0,92	0,39			

¹Controle= Silagem sem enzima; E1, E2 e E3= silagem com 5, 10 e 15 mL de extrato enzimático/Kg de forragem.

A temperatura da silagem aumentou em todos os tratamentos após a abertura dos mini silos, porém, em diferentes taxas (Figura 3). A silagem controle foi a primeira a quebrar a estabilidade (Valor de dois graus acima da temperatura ambiente), após aproximadamente 20 horas de exposição ao ar. As silagens E5 e E10 apresentaram comportamento semelhante, com quebra da estabilidade em torno de 42 horas de exposição, sendo a silagem que recebeu a maior dose enzimática, a que apresentou maior estabilidade aeróbia, apresentando quebra da mesma após 46 horas de abertura dos mini silos.

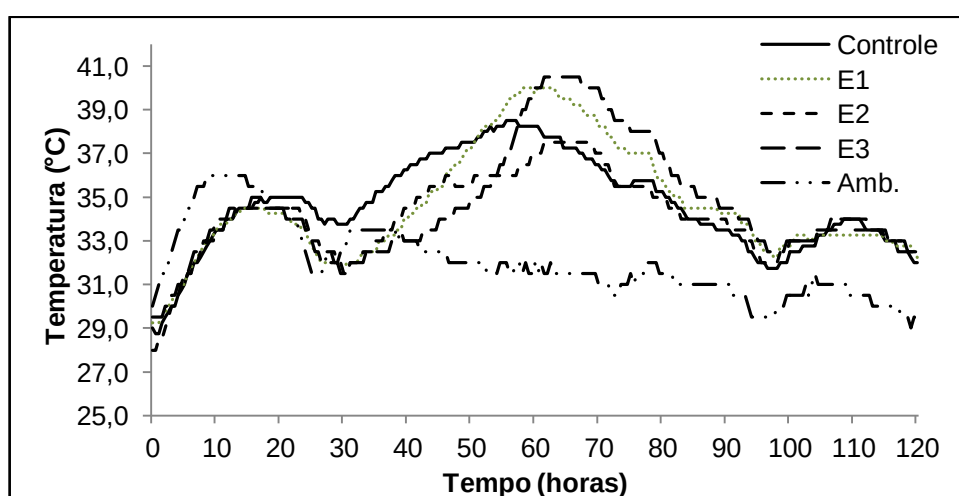


Figura 3. Gráfico da estabilidade aeróbia de silagem de milho não tratada (controle), e silagens de milho tratadas com 5, 10 e 15 mL de extrato enzimático (E1, E2, E3).

Nas Tabelas 4 e 5 pode-se verificar a produção de gás *in vitro* acumulada e a degradabilidade *in vitro* da FDN após 24 e 48 horas de incubação das silagens inoculadas com enzimas fibrolíticas no momento da ensilagem. Não foi verificada diferença estatística entre as silagens avaliadas.

Tabela 4. Produção de gás acumulada (mL/g MS) de silagens de milho ensiladas com enzimas fibrolíticas.

Tratamento ¹	Horas de incubação					
	3	6	9	12	24	48
Controle	62.41	99.11	130.10	153.36	183.54	235.17
E1	60.18	97.58	124.76	148.03	181.37	232.18
E2	61.71	100.38	129.39	151.85	182.17	226.83
E3	62.80	100.26	130.09	153.34	182.16	227.28

Fonte de variação

Tratamentos	ns	ns	ns	ns	ns	ns
-------------	----	----	----	----	----	----

¹Controle= Silagem sem enzima; E1, E2 e E3= silagem com 5, 10 e 15 mL de extrato enzimático/Kg de forragem. ns: não significativo e *: significativo (p<0,05).

Tabela 5. Degradabilidade (g/Kg MS) da FDN de silagens de milho ensiladas com enzimas fibrolíticas após 24 e 48 horas de incubação *in vitro*.

Tratamento ¹	Degradabilidade da FDN	
	24 horas	48 horas
Controle	17,08	40,08
E1	17,61	39,95
E2	17,37	38,58
E3	18,40	40,46

Fonte de variação

Tratamento	ns	ns
------------	----	----

¹Controle= Silagem sem enzima; E1, E2 e E3= silagem com 5, 10 e 15 mL de extrato enzimático/Kg de forragem. ns: não significativo e *: significativo (p<0,05).

4. Discussão

Os teores de MS da planta de milho no momento da ensilagem foram acima dos 25% preconizados por McDonald et al. (1991) como condição necessária para menores perdas e manutenção dos nutrientes de forragens ensiladas. Porém, fora da faixa ideal estabelecida por Nussio (1991), de 30 a 37% para que ocorra a fermentação da forragem ensilada garantindo condições para obtenção de silagens de boa qualidade. Apesar disso, a caracterização da planta de milho mostrou que a

mesma apresentou características satisfatórias para confecção da silagem quando comparada ao preconizado por Valares Filho et al. (2006).

Os valores de pH da planta de milho na ensilagem foram inferiores aos encontrados por FILYA et al. (2006) de 5,94, por FILYA (2003) de 5,86 e por DRIEHUIS et al. (1999) de 5,87, porém, isso não influenciou no processo de fermentação, resultando em silagem bem preservada.

Ocorreu queda do pH após dois dias de fermentação em todas as silagens avaliadas, não observando efeito da adição de enzimas no valor dessa variável. Em estudo avaliando adição de enzimas em silagem de milho com diferentes estágios de maturidade, Sheperd & Kung Jr. (1994) observaram diminuição do pH nas silagens que receberam as enzimas. Em alguns trabalhos revisados, o pH final da silagem de milho tratada com enzimas foi reduzido (Autrey et al., 1975; Sheperd & Kung, 1996a,b) ou manteve inalterado (Spoelstra et al., 1992; Higginbotham et al., 1994; Zhang et al., 1997).

Altas doses de enzimas fibrolíticas (10 e 15 mL), resultaram em silagens com menores conteúdos de ácido láctico observado na maioria dos tempos de fermentação. Na Figura 7 pode-se observar aument de ácido láctico no início da fermentação, com consequente diminuição do pH. Quanto ao ácido acético, a silagem que não recebeu as enzimas foi a que apresentou maior valor com 2 dias de fermentação, indicando que aquelas tratadas com enzimas foram capazes de inibir a ação de bactérias não desejáveis no início da fermentação. Diferença não significativa com relação à MS, pH, ácido láctico e acético foi encontrada por Sheperd & Kung Jr. (1994), que testaram enzimas fibrolíticas em silagem de milho.

A produção de ácido acético, no início da fermentação, se dá pela ação de enterobactérias. As mesmas consomem carboidratos solúveis produzindo ácidos, principalmente o ácido acético e CO₂, responsável por maiores perdas de MS. Apesar do maior teor de ácido acético na silagem controle, as perdas por gases foram menores na mesma silagem com relação às que receberam 10 e 15 mL de extrato enzimático.

Maiores conteúdos de PB foram encontrados nas silagens que receberam enzimas fibrolíticas na maioria dos tempos de fermentação. Em trabalho realizado com silagens de capins, Coan et al. (2005) verificaram menores teores de PB nas

silagens tratadas com inoculante enzimático bacteriano, enquanto o contrário foi observado por Bergamaschine et al. (1998).

Os menores teores de PB, referente a dois dias de fermentação, estão relacionados com os maiores teores de N-NH₃, indicando possível atuação de enzimas encontradas na planta, degradando a proteína verdadeira e liberando nitrogênio não proteico, através da proteólise. A adição de enzimas fibrolíticas não diminuiu a produção de N-NH₃ das silagens, resultado contrário ao observado por Chen et al. (1994), que verificaram redução desta variável em silagens de milho que receberam preparações enzimáticas.

Numericamente foram encontrados menores teores de FDN e FDA nas silagens que receberam enzimas fibrolíticas aos 2 dias de fermentação, ressaltando que houve pequena degradação da parede celular pela atuação dessas enzimas no início da fermentação. Vale ressaltar que com 60 dias o teor de FDN aumentou, o que pode ser explicado, proporcionalmente, pelo menor conteúdo de CS encontrados nesse mesmo dia.

No presente trabalho foi verificado efeito da adição de enzimas no início da fermentação, quando com a aplicação das enzimas pôde-se verificar redução do conteúdo de carboidratos solúveis até 7 dias, devido à fermentação por micro-organismos ácido láctico, concomitantemente até o segundo dia, aumento de FDN e lignina devido a efeito de diluição, uma vez que essas frações são expressas em termos percentuais. A diminuição de carboidratos solúveis tem relação direta com o aumento de ácido láctico e queda do pH. Além do efeito proporcional, o FDN pode ter reduzido devido à hidrólise ácida.

De acordo com dados de pesquisa, quando o substrato para fermentação é limitante, aditivos enzimáticos têm melhorado as características fermentativas devido à solubilização de parte da fração fibrosa (Stokes, 1992; Fredeen & McQueen, 1993). Desta forma, o conteúdo de fibra tem sido reduzido (Selmer-Olsen et al., 1993; Beuvink & Spoelstra, 1994; Stokes et al., 1996). A silagem de milho é uma forrageira rica em substrato fermentescível, o que pode ter mascarado a ação das enzimas e proporcionado alguns resultados inconsistentes. Chen et al. (1994), não encontraram efeito da adição de enzimas no conteúdo de fibra de silagem de milho. O contrário foi observado por Spoelstra et al. (1992), que ao adicionar uma

preparação enzimática comercial em silagem de milho, verificaram redução no conteúdo de fibra de 5-28%.

Embora alguns estudos tenham reportado melhoria na fermentação (Chamberlain & Robertson., 1992; McHan., 1986; Selmer-Olsen et al., 1993) ou produção animal (Stokes, 1992) quando silagens de capins foram tratadas com aditivos enzimáticos, dados de outros experimentos, nos quais enzimas foram adicionadas na silagem de milho têm apresentado resultados conflitantes (Autrey et al., 1975; Chen et al., 1994; Sheperd & Kung Jr. 1996; Spoelstra et al., 1992; Stokes, 1992). O tratamento enzimático diminuiu o conteúdo de FDN e FDA de silagens de capim e leguminosas (Chamberlain & Robertson., 1992; Selmer-Olsen et al., 1993; Sheperd & Kung Jr., 1996) mas não teve efeito no conteúdo de fibra de silagem de milho (Chen et al., 1994).

Colombatto et al. (2002) verificaram que as atividades enzimáticas explicaram, pelo menos, 84% da variação na liberação de açúcares solúveis a partir de silagem de milho ou de feno de alfafa, quando incubados com tampão e na ausência de fluido do rúmen. Estes resultados sugerem que a influência de enzimas sobre as características de silagens de milho pode ser parcialmente prevista com base em suas atividades enzimáticas, uma conclusão que também surgiu a partir de relatos anteriores (Spoelstra et al., 1992).

A adição de enzimas fibrolíticas na ensilagem tem como objetivo a degradação da fibra e liberação de maiores quantidades de carboidratos solúveis para atuação das bactérias ácido lácticas, que liberam maiores teores de ácido láctico, responsável pela rápida queda do pH da silagem. Porém, altas concentrações desse ácido, proporcionam maiores deteriorações no período de pós abertura do material ensilado. Contudo, neste trabalho, a adição de enzimas fibrolíticas não afetou o pH e a contagem de leveduras e fungos durante a exposição aeróbia das silagens, resultando em silagens mais preservadas do que a não tratada. A silagem que recebeu a maior dose enzimática apresentou maior estabilidade, com quebra da mesma após 46 horas da abertura. Segundo Muck & Kung Jr. (1997), a estabilidade aeróbia em silagens que receberam enzimas fibrolíticas, geralmente, apresenta resultados variáveis e inconsistentes em boa parte dos estudos.

Além disso, o uso do extrato enzimático na ensilagem não afetou a produção de gás, assim como a degradabilidade da FDN *in vitro*. Em trabalho testando dois coquetéis enzimáticos na ensilagem de milho, Colombatto et al (2003), verificaram que as silagens tratadas com Depol 40 produziram menos gás e foram degradadas a uma taxa menor que a silagem controle. Isso implica que menos substrato prontamente fermentável estava disponível para os micro-organismos do rúmen. Segundo Wang & McAllister (2004), a degradação da celulose e hemicelulose requer várias enzimas específicas, e diferenças na proporção e atividade dessas enzimas podem comprometer a degradação da parede celular. Isto poderia explicar a ineficácia das soluções utilizadas em romper certas ligações e estruturas que impediriam a aderência dos microrganismos ruminais.

No presente trabalho foi observado grande liberação de carboidratos solúveis no começo da fermentação, substrato esse que foi consumido pelos micro-organismos da silagem no decorrer dos dias. A não diferença estatística encontrada na produção de gás e degradabilidade pode ser justificada quando observamos as silagens aos 60 dias, onde menor quantidade de substrato prontamente fermentável (CS) estava disponível para os micro-organismos do rúmen.

Além disso, a degradação da fibra no início da fermentação das silagens inoculadas com enzimas pode ter disponibilizado silagem com maior teor de fibra indigestível. Sheperd e Kung (1996), descobriram que diminuição no teor de FDN das silagens de milho tratadas, foi acompanhado por redução da digestão *in vitro* da FDN, devido a maior participação de FDN indigestível na fração fibrosa decorrente da ação de enzimas sobre o FDN potencialmente digestível

As enzimas utilizadas nesse experimento foram produzidas em escala laboratorial e aplicadas na forma de extrato aquoso, estando completamente desprotegidas e susceptíveis a serem consumidas pelos microrganismos presentes na forragem e no rúmen. As enzimas xilanases e celulasas encontradas nesse extrato apresentaram ótima atividade a 60°C e valores de pH 4,6 e 3,6, respectivamente (Capítulo 2). Cumpre destacar que essas condições não são as mesmas encontradas na silagem de milho nos diferentes períodos de fermentação, o que pode ter inibido a ação dessas enzimas e proporcionado pouco ou nenhum efeito na fração fibrosa e degradabilidade das silagens, respectivamente.

Porém, no primeiro estudo foi verificada alta resistência das enzimas em condições ruminais, sendo que as mesmas sobreviveram após 7 horas da sua adição no rúmen. Esses resultados indicam possível efeito das enzimas quando adicionadas diretamente no rúmen ou no cocho, momentos antes da alimentação dos animais. Segundo Rode et al. (1999); Schingoethe et al. (1999) e Yang et al. (2000), a aplicação de enzimas fibrolíticas na forma líquida diretamente na dieta, momentos antes do consumo, pode apresentar efeito positivo na performance animal.

5. Conclusões

A adição de diferentes doses de enzimas na ensilagem de milho não melhorou as características fermentativas das silagens avaliadas, porém proporcionou pequenas alterações no conteúdo de fibra das mesmas e de carboidratos solúveis no início da fermentação. Enzimas fibrolíticas não melhoraram a produção de gás e degradabilidade da fibra em condições *in vitro*. Porém, enzimas fibrolíticas apresentam potencial para degradação da fibra e melhora da fermentação de silagens, assim, mais pesquisas devem ser realizadas a fim de avaliar criteriosamente a ação dessas enzimas e estreitar a variação existente entre resultados de diferentes pesquisas.

6. Referências

- AOAC, 1996. **Official Methods of Analysis**, 16th ed. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA.
- Autrey, K.M., McCaskey, T.A., Little, J.A., 1975. Cellulose digestibility of fibrous materials treated with *Trichoderma viride* cellulase. **J. Dairy Sci.** 58, 67–71.
- Barker, S.B., Summerson, W.H. 1941. The colorimetric determination of lactic acid in biological material. **J. Biolo. Chem.** 138, 535–554.
- Beauchemin, K.A., Colombatto, D., Morgavi, D.P., Yang, W.Z. 2003. Use of fibrolytic enzymes to improve feed utilization by ruminants. **J Anim Sci**, v. 81, E37–E47.
- Bergamaschine, A.F.; Isepon, O.J.; Guatura, A.S. et al. Efeitos da adição de resíduo de milho e da cultura enzimo-bacteriana sobre a qualidade da silagem do capim-tanzânia. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA,

35., 1998, Botucatu. **Anais...** Botucatu: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 1998. p.456.

Beuvink, J.M.W., Spoelstra, S.F., 1994. In vitro gas production kinetics of grass silages treated with different cell wall degrading enzymes. **Grass Forage Sci.** 49, 277–283.

Bolsen, K.K., G. Ashbell, J.M. Wilkinson. 1995. **Silage additives**. In: R.J. Wallace and A. Chesson (ed.) Biotechnology in animal feeds and animal feeding. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, Germany, p. 33-54.

Chamberlain, D. G., and S. Robertson. 1992. The effects of the addition of various enzyme mixtures on the fermentation of perennial ryegrass silage and on its nutritional value for milk production in dairy cows. **Anim. Feed Sci. Technol.** 37:257.

Chen, K. H.; Huber, J. T.; Theurer, C.; BSwingle, R. S.; Simas, J.; Chan, S. C.; WU, Z. and SULLIVAN J. L. 1994. Effect of steam-flaking of corn and sorghum grains on performance of lactating cows. **J. Dairy Sci.** 77:1038–1043.

COAN, R.M.; VIEIRA, P.F.; SILVEIRA, R.N. 2005. Inoculante enzimáticobacteriano, composição química e parâmetros fermentativos das silagens dos Tanzânia e mombaça. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.34, p.416-424.

Colombatto, D.; Mould, F. L.; Bhat, M. K.; Phipps, R. H.; Owen, E., 2004: In vitro evaluation of fibrolytic enzymes as additives for maize *Zea mays* L. silage: I. Effects of ensiling temperature, enzyme source and addition level. **Animal Feed Science and Technology** 111(1/4): 111-128.

Driehuis, F., Oude Elferink, S.J.W.H., Spoelstra, S.F., 1999. Anaerobic lactic acid degradation during ensilage of whole crop corn inoculated with *Lactobacillus buchneri* inhibits yeast growth and improves aerobic stability. **J. Appl. Microbiol.** 87, 583-594.

Filya, I., 2003. The effect of *Lactobacillus buchneri* and *Lactobacillus plantarum* on the fermentation, aerobic stability, and ruminal degradability of low dry matter corn and sorghum silages. **J. Dairy Sci.** 86, 3575-3581.

Filya, I., Sucu, E., Karabulut, A. 2006. The effect of *Lactobacillus buchneri* on the fermentation, aerobic stability and ruminal degradability of maize silage. **J. Appl. Microbiol.** 101, 1216-1223.

Fredeen, A.H., McQueen, R.E., 1993. Effect of enzyme additives on quality of alfalfa/grass silage and dairy cow performance. **Can. J. Anim. Sci.** 73, 581–591.

Goering, H. K. and P. J. Van Soest. 1970. Forage fibre analysis. **Agricultural Handbook** no. 379. Agricultural Research Service, US Department of Agriculture, Washington, USA.

Higginbotham, G.E., Mueller, S.C., Collar, C.A., Schultz, T.A., 1994. Effects of an enzyme addition on corn silage fermentation. **Prof. Anim. Sci.** 10, 163–168.

Hristov, A.N.; McAllister, T.A. 2002. Effect of inoculants on wholecrop barley silage fermentation and dry matter disappearance in situ. **Journal of Animal Science**, v.80, p.510-516.

Jobim, C. C., Reis, R. A., Schoken-Iturrino, R. P. 1999. Desenvolvimento de microrganismos durante a utilização de silagens de grãos úmidos de milho e de espigas de milho sem brácteas. **Acta Scientiarum**, v. 21, n. 3, p. 671-676.

Jobim, C.C.; Nussio, L.G.; Reis, R.A.; Schmidt, P. 2007. Avanços metodológicos na avaliação da qualidade da forragem conservada. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.36, p.101-119. (Suplemento especial).

Krueger, N. A. and Adesogan, A. T. Effects of different mixtures of fibrolytic enzymes on digestion and fermentation of bahia grass hay. **Anim Feed Sci Technol** 145:84–94, 2008.

Kung Jr., L.; Grieve, D.B.; Thomas, J.W. Huber, J.T. 1984. Added ammonia or microbial inoculant for fermentation and nitrogenous compounds of alfalfa ensiled at various percents of dry matter. **Journal of Dairy Science**, v.67, p.299-306.

McDonald, P.; Henderson, A .R.; Heron, S. J. E. 1991. **The biochemistry of silage**. 2.ed. Marlow: Chalcomb Publications, 340 p.

McHan, F. 1986. Cellulase-treated coastal bermudagrass silage and production of soluble carbohydrates, silage acids, and digestibility. **J. Dairy Sci.** 69:431.

MORAN, J.P.; WEINBERG, G.; ASHBELL, Y.H. et al. A comparison of two methods for the evaluation of the aerobic stability of whole crop wheat silage. In: INTERNATIONAL SILAGE CONFERENCE, 11., 1996, Aberystwyth. **Proceedings...** Aberystwyth: University of Wales Aberystwyth, p.162-163, 1996.

Muck, R.E.; Kung Jr., L. Effects of silage additives on ensiling. In: SILAGE: FIELD TO FEEDBUNK. NRAES-99, Herchey. **Proceedings...** Herchey, NRAES, 1997, p.187-199.

Nelson, N. 1944. A photometric adaption of the Somogyi method for the determination of glucos e. **J. Biol. Chem.** 153:375-380.

Nsereko, V. L., K. A. Beauchemin, D. P. Morgavi, L. M. Rode, A. F. Furtado, T. A. McAllister, A. D. Iwaasa, W. Z. Yang, and Y. Wang. Effect of a fibrolytic enzyme preparation from *Trichoderma longibrachiatum* on the rumen microbial population of dairy cows. **Can. J. Microbiol.** 48:14–20, 2002.

Rode, L. M, Yang, W. Z., Beauchemin K. A., 1999. Fibrolytic enzyme supplements for dairy cows in early lactation. **JDairy Sci** 82: 2121 – 2126.

SCHINGOETHE, D. J., STEGEMAN, G. A., TREACHER, R. J. 1999. Response of lactating dairy cows to a cellulase and xylanase enzyme mixture applied to forages at the time of feeding. **J. Dairy Sci.** 82:996–1003.

Selmer-Olsen, I., Henderson, A.R., Robertson, S., McGinn, R., 1993. Cell wall degrading enzymes for silage. 1. The fermentation of enzyme-treated ryegrass in laboratory silos. **Grass Forage Sci.** 48, 45–54.

Sheperd, A. C., L. Kung, Jr. 1994. Composition, rumen fermentation, and digestibility of enzyme-treated corn silages. *J. Anim. Sci.* 72 (Suppl. 2) :125.

Sheperd, A.C., Kung Jr., L. An enzyme additive for corn silage: effects on silage composition and animal performance. *J. Dairy Sci.* 79, 1760–1766, 1996a.

Sheperd, A. C.; Kung, L. Junior. Effects of an enzyme additive on composition of corn silage ensiled at various stages of maturity. **Journal of Dairy Science**, v. 79, p.1767-1773, 1996b.

Spoelstra, S. F., and P. G. Van Wikselaar. 1992. The effects of ensiling whole crop maize with a multi-enzyme preparation on the chemical composition of the chemical composition of the resulting silages. v.60, p.223-228. **J.Sci. Food Agric.**

Stokes, M.R., Chen. 1992. Effects of enzyme and bacteria treatments on the fermentation and composition of corn stover silage. **J. Anim. Sci.** 70(Suppl. 1): 191.(Abstr.)

Stokes, M.R., Wang, Y., Doherty, J., 1996. Effects of enzyme silage additives at different fermentation temperatures. In: **Proceedings of the XI International Silage Conference**, Aberswyth, Wales, pp. 124–125.

TAYLOR, C.C.; RANJIT, N.J.; MILLS, J.A.; NEYLON, J.M.; KUNG JR, L. The effect of treating whole-plant barley with *Lactobacillus buchneri* 40788 on silage fermentation, aerobic stability, and nutritive value for dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.85, p.1793-1800, 2002.

Valadares Filho, S.C.; Magalhães, K.A.; Rocha Junior, V.R.; Capelle, E.R. **Tabelas brasileiras de composição de alimentos para bovinos**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2006. 329p.

Van Soest, P.J., Robertson, J.B. **Analysis of forages and fibrous foods**, Cornell University, Ithaca, 1985.

Van Soest, P.J., Robertson, J.B. and Lewis, B.A. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and non starch polysaccharides in relation to animal nutrition. **J. Dairy Sci.** 74, 3583-3597, 1991.

Van Vuuren, A. M.; Huhtanen, P. and Dulphy, J. P. Improving the feeding and health value of ensiled forages. Pages 279–307 in Recent Developments in the Nutrition of Herbivores. Proc. IVth Int. Symp. Nutr. Herbivores. M. Journet, E. Grenet, M. H. Farce, M. Theriez, and C. Dermaquilly, ed. **National Institute for Agricultural Research**, Paris, France, 1995.

Yang, W. Z., K. A. Beauchem in and L. M. Rode. 2000. A comparison of methods of adding fibrolytic enzymes to lactating cow diets. **J. Dairy Sci.** 83:2512-2520.

WANG, Y.; McALLISTER, T. A. 2004. Rumen microbes, enzymes and feed digestion . Agriculture and Agri- Food Canada Research Centre, Canada, 1994. Disponível em: <http://rumen.snu.ac.kr/symposium/lectures/MaAllister-TA.polf>. Acesso em: 25 de fev.

Woolford, M.K. **The silage fermentation**. New York, Marcel Dekker. p.23-132, 1984.

Zhang, J., Kumai, S., Fukumi, R., Yikun, F., 1997. Effects of lactic acid bacteria and cellulase additives at different temperatures on the fermentation quality of corn and guineagrass silages. **Acta Prat. Sin.** 6, 66–75.