

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO” –  
UNESP, FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA –  
FMVZ/BOTUCATU

OBTENÇÃO DE FONTES PREBIÓTICAS ALTERNATIVAS E USO  
EM RAÇÕES DE FRANGO DE CORTE

MAYARA RODRIGUES PIVETTA

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação  
em Zootecnia como parte das exigências para a  
obtenção do título de Doutor.

Botucatu, São Paulo

Junho de 2016

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO” –  
UNESP, FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA –  
FMVZ/BOTUCATU

OBTENÇÃO DE FONTES PREBIÓTICAS ALTERNATIVAS E USO  
EM RAÇÕES DE FRANGO DE CORTE

MAYARA RODRIGUES PIVETTA

Zootecnista

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Luciana Francisco Fleuri

Co-orientador: Prof. Dr. Antonio Celso Pezzato

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação  
em Zootecnia como parte das exigências para a  
obtenção do título de Doutor.

Botucatu, São Paulo

Junho de 2016

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO - DIRETORIA TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - UNESP - FCA - LAGEADO - BOTUCATU (SP)

P693o Pivetta, Mayara Rodrigues, 1987-  
Obtenção de fontes prebióticas alternativas e uso em rações de frango de corte / Mayara Rodrigues Pivetta. - Botucatu : [s.n.], 2016  
vii, 73 f. : fots. color., grafs. color., tabs.

Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu - 2016

Orientador: Luciana Francisco Fleuri  
Coorientador: Antonio Celso Pezzato  
Inclui bibliografia

1. Frango de corte - Alimentação e rações. 2. Yacon. 3. *Aspergillus niger*. 4. Glicose. 5. Frutose. 6. Inulina. I. Fleuri, Luciana Francisco. II. Pezzato, Antonio Celso. III. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Câmpus de Botucatu). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. IV. Título.

## **Dedico**

*À minha querida mãezinha Maria de Lourdes Rosa, exemplo de vida e dedicação, minha eterna gratidão e respeito.*

*A minha irmãzinha Taynara Borak, por todo carinho e dedicação, amor eterno.*

*À meu esposo, Laércio Augusto Pivetta, pelo amor e alicerce nos momentos difíceis dessa caminhada.*

## **Ofereço**

*À Deus, pela graça e perdão. O Senhor é minha força e o meu escudo; nele o meu coração confia.*

## **Agradecimentos**

*À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - FMVZ/UNESP – pela oportunidade e suporte na realização do doutorado.*

*À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de estudo (Processo: 2013/15481-4).*

*À Professora Luciana Francisco Fleuri pela admirável orientação, muito mais que uma orientadora uma verdadeira amiga. Sempre sendo muito dinâmica e concisa em suas pesquisas e buscando nos motivar para alcançarmos a excelência.*

*Ao Prof. Antonio Celso Pezzato, pela co-orientação, sempre sugerindo novas ideias e dando grandes conselhos para condução dos experimentos.*

*Aos professores José Roberto Sartori, Dirlei Antonio Berto, Carlos Ducatti e Adriano Sakai Okamoto, pelo carinho e apoio na realização destes experimentos.*

*Aos professores da Universidade Estadual de Maringá, Paulo Cesar Pozza e Magali Soares dos Santos Pozza, sempre dispostos a ajudar no que for possível, conselheiros em decisões importantes da vida, grandes amigos, minha eterna gratidão.*

*Aos meus amigos, Ariane Dantas, Roberto França Teixeira, Aparecida da Costa Oliveira, Camila de Aquino Tomaz, Laerte Gustavo Pivetta, Paula Fernanda Teixeira, Dhyego Thomazoni, Thyago Thomazoni, Everton Moreno Muro, Mariana Kiyomi Maruno, Nathália Martins Guerra Causso, Ana Carolina Izidoro de Moraes, Igor Vellano, Ana Cristina Stradiotti, Paula Kern Novelli, Débora Zanoni do Prado, Milene Pereira, Clarissa Hamaio Okino Delgado e Edicarlos Batista de Castro pelo apoio, carinho e dedicação na realização deste experimento.*

*Aos colegas do Laboratório de Nutrição de Aves, Laboratório de Ornitopatologia e Laboratório de Bioprocessos meus sinceros agradecimentos.*

*Aos colegas de pós-graduação pelo companheirismo e amizade.*

*Aos docentes e funcionários do Departamento de Produção Animal, Departamento de Melhoramento e Nutrição Animal, Departamento de Química e Bioquímica e do Departamento de Clínica Veterinária pelo respeito e receptibilidade.*

*A toda a minha família e amigos pelo amor incondicional.*

## A Jesus seguir eu quero

*A Jesus seguir eu quero,  
Seja a sorte, sim, qualquer;  
Onde quer que vá meu Mestre,  
Seguirei, sem mais temer.*

***Ó Jesus, seguir-Te quero;  
Tu morreste, foi por mim.  
Mesmo que Te neguem todos,  
Eu Te sigo até o fim.***

*Se o caminho for custoso,  
Nele houver escuridão,  
Por ali Tu já passaste,  
E me tomas pela mão.*

*Se encontrar dificuldades,  
E envolver-me a tentação,  
Tu também tentado foste,  
E sofreste provação.*

*Se Tu queres conduzir-me  
Pela triste solidão,  
Tu andaste no deserto,  
E meus pés seguir-Te-ão.*

*E se for Tua vontade  
Que eu transponha o rio Jordão,  
Tu também o atravessaste;  
Seguirei com prontidão.*

*James Lawson Elginburg, 1886*

## SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS .....	v
LISTA DE FIGURAS .....	vi
CAPÍTULO I.....	1
Resumo .....	2
Abstract.....	3
1. Introdução .....	4
2. Hipótese e Objetivos .....	5
3. Revisão de Literatura .....	5
3.1. Inulina.....	5
3.2. Produção de inulinases por fermentação em estado sólido .....	7
3.3. Benefícios do consumo de inulina.....	9
4. Referências Bibliográficas .....	10
CAPÍTULO II .....	14
PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE INULINASES POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO UTILIZANDO RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS .....	15
Resumo .....	15
Introdução .....	16
Material e Métodos .....	18
Resultados e Discussão.....	23
Conclusões.....	36
Referências Bibliográficas .....	37
CAPÍTULO III.....	41
USO DO PREPARADO ENZIMÁTICO SÓLIDO DE FARINHA DE YACON COM <i>ASPERGILLUS NIGER</i> COMO PREBIÓTICO PARA FRANGOS DE CORTE .....	42
Resumo .....	42
Abstract.....	42
Introdução .....	43
Material e Métodos .....	45
Resultados e Discussão .....	54
Conclusões.....	65
Referências Bibliográficas .....	65
CAPÍTULO IV .....	70
IMPLICAÇÕES .....	71
ANEXOS.....	72

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO II

**Tabela 1.** Composição dos açúcares dos preparados enzimáticos sólidos (PES) selecionados para análise de CLAE ..... 34

**Tabela 2.** Composição bromatológica, atividade da lipase e antioxidante da farinha de yacon e do preparado enzimático sólido (PES) de farinha de yacon com *A. niger* 40018..... 35

### CAPÍTULO III

**Tabela 1.** Composições centesimais e nutricionais das dietas experimentais ..... 46

**Tabela 2.** Composições centesimais e nutricionais das dietas experimentais ..... 49

**Tabela 3.** Valores médios de peso inicial (PI), ganho de peso médio (GPM), consumo de ração (CR), conversão alimentar (CA) e peso final (PF) de frangos de corte, segundo os tratamentos nos períodos de 0 a 21 e 0 a 42 dias de idade. .... 55

**Tabela 4.** Valores médios de pH do conteúdo do ceco de frangos de corte aos 42 dias de idade. .... 56

**Tabela 5.** Perfil lipídico do soro sanguíneo de frangos de corte aos 42 dias de idade... 57

**Tabela 6.** Resumo da ANAVA da contagem de *Salmonella* Enteritidis no ceco de frangos de corte em função das dietas basal e suplementadas com preparado enzimático sólido (PES) e inulina+FOS (In+FOS). .... 59

**Tabela 7.** Equações de diluição isotópica do carbono-13 da mucosa intestinal e de crescimento de frangos de corte com suas respectivas constantes de *turnover* tecidual ( $k + m$ ), taxa de crescimento ( $k$ ), taxa metabólica ( $m$ ) do carbono-13, tempo de meia vida e de 99% de troca de tecido no período de 0 a 21 dias de idade em função das dietas basal e suplementadas com preparado enzimático sólido (PES) e inulina+FOS. .... 62

**Tabela 8.** Equações de diluição isotópica do carbono-13 da mucosa intestinal e de crescimento de frangos de corte com suas respectivas constantes de *turnover* tecidual ( $k + m$ ), taxa de crescimento ( $k$ ), taxa metabólica ( $m$ ) do carbono-13, tempo de meia vida e de 99% de troca de tecido no período de 21 a 35 dias de idade em função das dietas basal e suplementadas com preparado enzimático sólido (PES) e inulina+FOS. .... 63

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO II

- Figura 1.** Produção de inulinases fúngicas utilizando farinha de yacon (FY), farelo de trigo (FT) e farelo de soja (FS) em fermentação em estado sólido..... 24
- Figura 2.** Atividade de inulinase em fermentação em estado sólido em função do tempo de incubação para combinações de substratos e micro-organismos. FS – Farelo de soja, FT – Farelo de trigo, FY – Farinha de yacon..... 27
- Figura 3.** Atividade de inulinase em fermentação em estado sólido em função do pH para combinações de substratos e micro-organismos. FS – Farelo de soja, FT – Farelo de trigo, FY – Farinha de yacon..... 28
- Figura 4.** Atividade de inulinase em fermentação em estado sólido em função do pH de estabilidade para combinações de substratos e micro-organismos. FS – Farelo de soja, FT – Farelo de trigo, FY – Farinha de yacon..... 29
- Figura 5.** Atividade de inulinase em fermentação em estado sólido em função da temperatura para combinações de substratos e micro-organismos. FS – Farelo de soja, FT – Farelo de trigo, FY – Farinha de yacon..... 30
- Figura 6.** Atividade de inulinase em fermentação em estado sólido em função da temperatura de estabilidade para combinações de substratos e micro-organismos. FS – Farelo de soja, FT – Farelo de trigo, FY – Farinha de yacon. .... 31

### CAPÍTULO III

- Figura 1.** Contagem de *Salmonella* Enteritidis no ceco de frangos de corte em função das dietas basal e suplementadas com preparado enzimático sólido (PES) e inulina+FOS (In+FOS). .... 59
- Figura 2.** Halo de inibição de *Salmonella* Enteritidis por *Lactobacillus* sp. isolados do ceco de frangos de corte em função das dietas basal (n=7) e suplementadas com preparado enzimático sólido (PES) (n=18) e inulina+FOS (n=9). As barras verticais representam o erro padrão da média. .... 60
- Figura 3.** Curvas de diluição isotópica do carbono da mucosa intestinal de frangos de corte de 0 a 21 dias de idade, em função das dietas basal e suplementadas com preparado enzimático sólido (PES) e inulina+FOS (In+FOS). .... 62
- Figura 4.** Curvas de crescimento de frangos de corte de 0 a 21 dias de idade, em função das dietas basal e suplementadas com preparado enzimático sólido (PES) e inulina+FOS (In+FOS). .... 63
- Figura 5.** Curvas de diluição isotópica do carbono da mucosa intestinal de frangos de corte de 21 a 35 dias de idade, em função das dietas basal e suplementadas com preparado enzimático sólido (PES) e inulina+FOS (In+FOS). O dia 0 no eixo das abscissas representa 21 dias de idade das aves. .... 64

**Figura 6.** Curvas de crescimento de frangos de corte de 21 a 35 dias de idade, em função das dietas basal e suplementadas com preparado enzimático sólido (PES) e inulina+FOS (In+FOS). ..... 64

## **CAPÍTULO I**

## RESUMO

As inulinases catalisam a hidrólise da inulina, produzindo inulo-oligossacarídeos, frutose e glicose, por isso, possuem várias aplicações industriais. A fermentação submersa é mais usada na produção industrial de inulinase, contudo a fermentação em estado sólido tem demonstrado bons resultados quanto à obtenção de enzimas a baixo custo. O yacon (*Smallanthus sonchifolius*) é um tubérculo com alta concentração de antioxidantes e frutanos e por isso tem atraído o interesse na área de alimentos. A fermentação em estado sólido utilizando o yacon como substrato possui potencial para a produção de enzimas e também para utilização na alimentação animal. Objetivou-se com este trabalho avaliar a produção de inulinases utilizando 16 espécies fúngicas filamentosas cultivadas em fermentação em estado sólido utilizando resíduos agroindustriais como substrato, bem como identificar a melhor combinação substrato/micro-organismo para utilização do preparado enzimático sólido como prebiótico em rações de frango de corte. A atividade da inulinase foi muito superior com a utilização da farinha de yacon como substrato em fermentação em estado sólido em relação ao farelo de trigo, farelo de soja e bagaço de cana-de-açúcar, independente do fungo utilizado. As inulinases provenientes da farinha de yacon demonstraram grande amplitude de pH e temperatura, independente do micro-organismo fermentante. O preparado enzimático sólido de farinha de yacon com *Aspergillus niger* 40018 apresentou alta atividade de lipase e antioxidante e alta quantidade de fruto-oligossacarídeos e foi selecionado para os ensaios com frangos de corte. Não houve alteração no desempenho, pH cecal e perfil lipídico com a utilização do preparado enzimático sólido. O preparado enzimático sólido promoveu redução mais acentuada na contagem de *Salmonella* Enteritidis após a inoculação nas aves e, conseqüentemente, o *turnover* da mucosa intestinal foi menos acelerado. Conclui-se que o preparado enzimático sólido de farinha de yacon com *A. niger* 40018 apresenta efeito prebiótico.

**Palavras-chave:** Inulinase; *Smallanthus sonchifolius*, *Aspergillus niger*, fruto-oligossacarídeos, inulina.

## ABSTRACT

Inulinases catalyze the inulin hydrolysis, yielding inulo-oligosaccharides, fructose and glucose, therefore, they have many industrial applications. The submerged fermentation is more used at inulinase industrial production, however the solid state fermentation (SSF) has showed good results regarding to low cost enzymes. The yacon (*Smallanthus sonchifolius*) is a tuber root with high content of antioxidants and fructans and because of this it has attracted interest of food area. The solid state fermentation using the yacon root as substrate has potential to produce enzymes and to use in animal feeding. The aim of this work was to evaluate the inulinase production of 16 filamentous fungal species growing in solid state fermentation (SSF) on agroindustrial wastes as substrate, as well as to identify the best combination substrate/microorganism of the solid enzymatic preparation (SEP) to use as prebiotic in broilers diets. The inulinase activity was higher with yacon flour than wheat bran, soybean bran and sugarcane bagasse, independently of fungus. The inulinases from yacon flour showed large pH and temperature amplitude, independently of fungus. The SEP of yacon flour and *Aspergillus niger* 40018 showed high lipase and antioxidant activity and high fructooligosaccharides and it was selected to further trials with broilers. There was no alteration on performance, caecum pH and lipid profile with the SEP. The SEP promoted a stronger reduction of *Salmonella* Enteritidis number after the birds inoculation, and, consequently, the mucosal gut turnover was slower. It is concluded that the SEP of yacon flour with *A. niger* 40018 has prebiotic effect.

**Keywords:** Inulinase; *Smallanthus sonchifolius*, *Aspergillus niger*, fructooligosaccharide, inulin.

## 1. INTRODUÇÃO

A produção de carne de frango no Brasil em 2015 foi de 13,1 milhões de toneladas, inferior apenas à produção dos Estados Unidos. Contudo, o Brasil é o maior exportador mundial, com 4.304 milhões de toneladas (ABPA, 2016).

Muitos países impõem diversas exigências para importar produtos cárneos, como por exemplo, a União Europeia (UE), onde há várias medidas para proteger a saúde do consumidor e assegurar que os alimentos de origem animal comercializados sejam seguros para o consumo. A UE requer para os países membros o estabelecimento de programas de vigilância nacional de resíduos para monitorar alimentos de origem animal quanto à presença tanto de medicamentos autorizados como de resíduos de antibióticos, hormônios e  $\beta$ -agonistas proibidos na União (KENNEDY, 2003).

Baseando-se em novos conceitos de segurança alimentar, produtos alternativos aos antibióticos vêm sendo pesquisados e desenvolvidos, como os alimentos funcionais e nutracêuticos, que já ocupam uma fração considerável do mercado de alimentos. De acordo com relatório recente da Global Information Inc., estimou-se que o mercado mundial de nutracêuticos ultrapassou US\$ 171,8 bilhões em 2014, podendo atingir US\$ 241,1 bilhões em 2019 (WANG et al., 2016).

Dentre os alimentos funcionais, destacam-se os prebióticos, que cada vez mais são utilizados na alimentação animal. Os prebióticos do tipo frutano apresentam grau de polimerização (GP) muito amplo, o que pode promover diferenças na fermentação e influenciar o seu efeito na microbiota. Pesquisas sugerem que frutanos com GP menor são mais utilizados pelas bactérias probióticas. De acordo com o grau de polimerização, os frutanos são classificados como oligofrutose (GP 2-8), fruto-oligossacarídeo (GP 2-4) e inulina (GP  $\geq$  9) (BIEDRZYCKA e BIELECKA, 2004). O grau de polimerização da inulina pode ser reduzido com a utilização de inulinases, sendo que estas podem ser obtidas a partir da produção de micro-organismos pela fermentação em estado sólido (FES) (XIONG et al., 2007).

## 2. HIPÓTESE E OBJETIVOS

A hipótese deste trabalho é que frutanos do preparado enzimático sólido (PES) podem apresentar efeito prebiótico em frangos de corte.

Objetivou-se com este trabalho:

- Selecionar um substrato alternativo que estimule maior crescimento de micro-organismos produtores de inulinases;
- Caracterizar a composição química e bromatológica do PES da melhor combinação substrato/micro-organismo, visando seu uso como prebiótico;
- Avaliar o efeito do fornecimento do PES no desempenho, pH cecal, parâmetros bioquímicos dos lipídeos, *turnover* na mucosa intestinal e parâmetros microbiológicos no conteúdo cecal em frangos de corte.

## 3. REVISÃO DE LITERATURA

### 3.1. INULINA

Os prebióticos são uma categoria de compostos agrupados, não necessariamente por semelhanças estruturais, mas pela capacidade de promover o crescimento de determinadas bactérias benéficas no intestino. Roberfroid (2007) definiu os prebióticos como substâncias não digeríveis que, quando consumidos, proporcionam um efeito fisiológico benéfico sobre o hospedeiro por estimular seletivamente o crescimento favorável ou a atividade de um número limitado de bactérias naturais da microbiota intestinal. Os frutanos atendem a esses requerimentos, principalmente os fruto-oligossacarídeos (FOS) e as inulinas.

A inulina é um frutano com característica prebiótica por ser um carboidrato não digerível, que tem sido parte das dietas diárias de humanos e animais por séculos e ocorre naturalmente em mais de 36.000 plantas, armazenada na forma de carboidratos, como por exemplo, no alho-poró, cebola, alho, trigo, chicória, alcachofra e banana (BRANDT, 2001).

Em escala industrial, a inulina é obtida principalmente a partir de raízes de chicória, sendo usada como ingrediente funcional, além de oferecer exclusiva combinação de propriedades nutricionais e benefícios tecnológicos. As propriedades

nutricionais da inulina promovem uma vasta gama de benefícios para a saúde e bem-estar (FRANCK e BOSSCHER, 2009).

A inulina consiste em cadeias lineares de ligação  $\beta$  (2-1) entre resíduos de frutose. Uma fração de glicose inicial pode estar presente, mas não é necessária (WATHERHOUSE e CHATTERTON, 1993). A molécula terminal é um resíduo de glicose por meio de uma ligação do tipo sacarose na extremidade redutora (PANDEY et al., 1999). Com relação à definição da inulina, tanto compostos GF<sub>n</sub> e Fn (G representa a molécula de glicose, F a molécula de frutose e n o número de unidades de frutose) são considerados inclusos sob essa nomenclatura. Na inulina de chicória, o número de unidades de frutose ligadas à uma glicose terminal pode variar de 2 a 60 unidades (DE LEENHEER e HOEBREGS, 1994), o que significa que a inulina é uma mistura de oligômeros e polímeros.

Apesar dos FOS e a inulina possuírem a mesma composição, muitos autores os separam por diferirem no grau de polimerização (GP). No entanto, na maioria das definições, os FOS e oligofrutose possuem GP de 3 a 9, enquanto que as inulinas apresentam GP superior a 9. O GP dos frutanos varia de 2 a 70 (STEVENS et al., 2001), dependendo do tipo da planta do qual foi isolado, época de plantio, época de colheita, condições de crescimento, idade fisiológica da planta e período de armazenagem (OLIVEIRA et al., 2004).

Os principais fatores responsáveis para a susceptibilidade à fermentação em sacarídeos são a estrutura química, composição das unidades de monômeros, GP, estrutura linear ou ramificada e solubilidade em água. Geralmente, sacarídeos de comprimento de cadeia curta não ramificada e solúvel em água são considerados mais susceptíveis à fermentação. Portanto, preparados menos purificados contendo monossacarídeos e dissacarídeos são melhores, e muitas vezes, não são seletivamente utilizados por bactérias (VAN LAERE et al., 1997).

A utilização da inulina por bifidobactérias (*Bifidobacterium* spp.) depende do GP das cadeias fruto-oligoméricas e da pureza. A predominância de bifidobactérias em uma microbiota é considerada a condição ideal para o intestino, o que resulta em estado saudável em todo o corpo (BIEDRZYCKA e BIELECKA, 2004).

Pesquisas mostraram que a maioria das bifidobactérias é capaz de utilizar cadeias curtas como os FOS e cadeias longas como a inulina (ROBERFROID et al.,

1998; ROSSI et al., 2005). Porém, a eficiência prebiótica dos frutanos do tipo inulina não só depende do GP, mas também dos níveis na dieta (VAN LOO, 2004).

Os oligossacarídeos não digeríveis de maior GP são mais resistentes à fermentação sacarolítica, onde o metabolismo ocorre na parte distal do cólon (HUGHES e ROWLAND, 2001), sendo que esta diferença de fermentação pode ser refletida sobre as mudanças do efeito prebiótico na microbiota e no metabolismo geral do cólon (LE BLAY et al., 2003).

Biedrzycka e Bielecka (2004) avaliaram, *in vitro*, a capacidade das bifidobactérias em metabolizar frutanos de diferentes GP, bem como a capacidade dos frutanos em estimular seletivamente as bifidobactérias do cólon em ratos. Os resultados indicaram maior especificidade das bifidobactérias em utilizar FOS (GP 2-4), oligofrutose (GP 2-8) e cadeias de inulina com baixa polimerização ( $GP \geq 9$ ) do que cadeias de inulina altamente polimerizadas ( $GP \geq 22$  e  $GP \geq 23$ ). Os resultados *in vivo* seguiram o mesmo comportamento.

A inulina e seus derivados não são produzidos no Brasil, as empresas que atendem o mercado brasileiro de prebióticos oferece os seguintes produtos: inulina padrão, que tem GP similar ao encontrado na chicória, variando de 3 a 60; inulina de cadeia longa, com GP maior que 23, obtida a partir da separação física da fração de menor GP e; oligofrutose, obtida pela hidrólise enzimática parcial da inulina por uma endoinulinase purificada, conferindo GP de 3 a 8 e a combinação de oligofrutoses e inulina de cadeia longa que foi desenvolvida com melhoria das propriedades nutricionais (FRANCK e BOSSCHER, 2009).

Considerando o efeito sinérgico da utilização conjunta de frutanos com variados GP e a importância em reduzir a dependência por insumos externos, torna-se fundamental a inovação e o desenvolvimento biotecnológico na produção de frutanos.

### 3.2. PRODUÇÃO DE INULINASES POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO

A fermentação em estado sólido (FES) é um processo no qual os microorganismos crescem na superfície de materiais sólidos. Nesse processo, a composição do material pode ser modificada pela adição de nutrientes ou água para otimizar o meio ou para regular a atividade de água, durante a fermentação. A FES oferece algumas vantagens em relação à fermentação submersa, incluindo o uso de meios de produção

compostos de resíduos agro-industriais, menor demanda de esterilidade devido à baixa atividade de água, maior concentração final e estabilidade dos produtos (SINGHANIA et al., 2009), menor liberação de efluentes, simplicidade, capacidade de trabalhar com pequenos volumes, baixo consumo de energia e facilidade de separação do produto (PENG e CHEN, 2008).

Diversos tipos de micro-organismos, incluindo bactérias, algas e fungos, são usados na fermentação em estado sólido, mas os fungos filamentosos são mais comumente utilizados e estudados para a FES. Esta preferência ocorre devido à sua capacidade de crescer naturalmente em superfícies sólidas com baixa umidade e pela formação de hifas, que podem penetrar mais profundamente no substrato (PENG e CHEN, 2008; GRAMINHA et al., 2009).

A produção de enzimas por FES ganhou muita atenção em estudos de biotecnologia para a produção de lipases, proteases, pectinase, xilanase,  $\alpha$ -amilase, tanase, fitase, quitinase,  $\beta$ -glucanase (AJILA et al., 2012) e inulinasas (SELVAKUMAR e PANDEY, 1999). A seleção de um micro-organismo adequado é um aspecto importante da FES para a produção de enzimas. O micro-organismo deve ser capaz de crescer em substrato umidificado com pouca água, ser GRAS (Generally Recognized as Safe) e aceito pela FDA (Food and Drug Administration) (MAZUTTI et al., 2006), ou seja, seguros para alimentação validados pelos órgãos competentes.

Inulinasas (2,1- $\beta$ -D-frutano frutanolidase, EC 3.2.1.7) catalisam a hidrólise da inulina, produzindo inulo-oligossacarídeos, frutose e glicose como principais produtos (NEAGU e BAHRIN, 2011). As inulinasas podem ser divididas em exoinulinasas ( $\beta$ -D-frutano frutanolidase, EC 3.2.1.80) e endoinulinasas (2,1- $\beta$ -D-frutano frutanolidase, EC 3.2.1.7). A exoinulinase catalisa a remoção dos resíduos de frutose terminal da extremidade não redutora da inulina, enquanto a endoinulinase, hidrolisa as ligações internas da molécula de inulina produzindo inulotriose, inulotetraose e inulopentose como produtos principais (CHI et al., 2011).

Inulinasas são produzidas por vários micro-organismos incluindo fungos filamentosos, leveduras e bactérias. Entre eles, *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp., *Bacillus* spp., *Clostridium* spp., *Pseudomonas* spp., *Arthrobacter* spp., *Staphylococcus* spp., *Xanthomonas* spp., *Kluyveromyces* spp., *Cryptococcus* spp., *Pichia* spp., *Sporotrichum* spp. e *Candida* spp. (SELVAKUMAR e PANDEY, 1999). Os fungos

filamentosos de maior interesse industrial para a produção de enzimas incluem os *Aspergillus oryzae* e *Aspergillus niger* que são considerados não tóxicos, sendo avaliados como micro-organismos seguros pelo FDA e GRAS (FAWOLE e ODUNFA, 2003; WANG et al., 2003; TAILOR e RICHARDSON, 1979).

A inulinase pode ser utilizada em uma vasta gama de aplicações, como produção de xarope de alto teor de frutose, bioetanol, inuloligossacarídeos (NEAGU e BAHRIN, 2011), fruto-oligossacarídeos (XIONG et al., 2007), ácido cítrico, ácido láctico, 2,3 butanodiol, óleos e proteínas de organismos unicelulares (CHI et al., 2011).

### 3.3. BENEFÍCIOS DO CONSUMO DE INULINA

Muitos efeitos benéficos têm sido atribuídos às bifidobactérias, apoiando o seu potencial como bactérias promotoras de saúde. Como a população de bifidobactérias aumenta após a ingestão de inulina, uma concomitante diminuição na população de micro-organismos patogênicos é esperada com o uso deste prebiótico, uma vez que a microbiota intestinal atua como uma barreira à infecção por esses micro-organismos, contribuindo para resistência à colonização (GIBSON et al., 1997).

Bifidobactérias e Lactobacilos (*Lactobacillus* spp.) podem prevenir a colonização de patógenos através de vários mecanismos. Os ácidos secretados por essas bactérias, que são o resultado da fermentação dos carboidratos, reduz o pH do cólon inibindo o crescimento patogênico. Além disso, podem produzir compostos inibidores contra uma série de patógenos gastrointestinais, pelo menos em estudos *in vitro* (GIBSON e WANG, 1994).

Em experimento com codornas gnotobióticas inoculadas com a microbiota de um bebê com enterocolite necrosante causada por *Clostridium butyricum*, a maioria das aves foram à óbito. No entanto, as codornas que receberam bifidobactérias apresentaram recuperação completa. Este foi um dos primeiros estudos que demonstraram os efeitos de bifidobactérias na saúde dos seres vivos (BUTEL et al., 1998). Okamoto et al. (2009) observaram que o fornecimento de *Lactobacillus* spp. à pintinhos de 1 dia de idade podem contribuir para a regeneração da mucosa intestinal, frente às lesões provocadas pelo desafio com *Salmonella* Enteritidis.

O efeito de prebióticos na resistência à colonização intestinal foi demonstrado por Yusrizal e Chen (2003a), que observaram menor população de *Campylobacter* spp.

e *Salmonella* spp. em frangos de corte suplementados com frutanos. Além disso, Van Leeuwen et al. (2005), citado por Van Loo e Vancraeynest (2008), relataram recuperação mais rápida em frangos de corte artificialmente desafiados com *Salmonella* Typhimurium, *Eimeria acervulina*, *Clostridium perfringens* e *Campylobacter jejuni* que consumiram prebióticos tipo frutanos. Os FOS também têm demonstrado capacidade de diminuir a colonização de bactérias, tais como *Escherichia coli* e bactérias dos gênero *Salmonella*, e aumentar o crescimento de micro-organismos benéficos (YUSRIZAL e CHEN, 2003a).

Yusrizal (2012) aplicou 2% de *Lactobacillus* sp ( $2,6 \times 10^6$  UFC/g) e 2% de FOS em 150 g de fezes coletadas de um aviário comercial e observou que ambos reduziram a volatilização de amônia, o pH fecal e a população de *E. coli*, *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp. e aumentaram a população de lactobacilos.

Os frutanos tipo inulina também podem influenciar o metabolismo lipídico, no entanto, são escassos os estudos sobre os efeitos da inulina e do FOS em frangos de corte.

Yusrizal e Chen (2003b) avaliaram a suplementação (10 g/kg de dieta basal) de inulina e oligofrutose na dieta de frangos de corte e observaram que ambos os frutanos reduziram os níveis de colesterol no soro sanguíneo e gordura abdominal.

Velasco et al. (2010) avaliaram a adição de inulina (5-10 g/kg de dieta basal) em dietas com duas fontes de óleo (óleo de palma e girassol) para frangos de corte e observaram redução do teor hepático de lipídios totais e colesterol total (apenas na última fase das aves alimentadas com dietas contendo óleo de girassol) e diminuição da concentração de triglicerídeos do soro sanguíneo e colesterol VLDL. Também observaram benefícios no perfil de ácidos graxos do tecido adiposo abdominal, peito e coxa. A relação de ácidos graxos poli-insaturados por ácidos graxos saturados na gordura abdominal aumentou quando as aves foram suplementadas com inulina e óleo de girassol.

#### 4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABPA, Associação Brasileira de Proteína Animal. Relatório anual 2015. São Paulo, 2015. Disponível em <http://abpa-br.com.br/files/publicacoes/c59411a243d6dab1da8e605be58348ac.pdf>.

AJILA, C.M.; BRAR, S.K.; VERMA, M.; TYAGI, R.D.; GODBOUT, S.; VALÉRO, J.R. Bio-processing of agro-byproducts to animal feed. **Critical Reviews in Biotechnology**, v.32, p.382-400, 2012.

BIEDRZYCKA, E.; BIELECKA, M. Prebiotic effectiveness of fructans of different degrees of polymerization. **Trends in Food Science & Technology**, v.15, 170-175, 2004.

BRANDT, L.A. Prebiotics enhance gut health. **Prepared Foods**, v.170, p.7-10, 2001.

BUTEL, M.; ROLAND, N.; HIBERT, A.; POPOT, F.; FAVRE, A.; TESSEDRE, A.C.; BENSAAIDA, M.; RIMBAULT, A.; SZYLIT, O. Clostridial pathogenicity in experimental necrotising enterocolitis in gnotobiotic quails and protective role of bifidobacteria. **Journal of Medical Microbiology**, v.47, p.391-399, 1998.

CHI, Z.M.; ZHANG, T.; CAO, T.S.; LIU, X.Y.; CUI, W.; ZHAO, C.H. Biotechnological potential of inulin for bioprocesses. **Bioresource Technology**, v.102, p.4295-4303, 2011.

DE LEENHEER, L.; HOEBREGS, H. Progress in the elucidation of the composition of chicory inulin. **Starch**, v.46, p.193-196, 1994.

FAWOLE, O. B.; ODUNFA, S. A. Some factors affecting production of pectic enzymes by *Aspergillus niger*. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v.52, p.223-227, 2003.

FRANCK, A.; BOSSCHER, D. Inulin. In: CHO, S.S.; SAMUEL, P. (Eds.) **Fiber ingredients: food application and health benefits**. Boca Raton: CRC Press, 2009. pp. 41-60.

GIBSON, G.R.; SAAVEDRA, J.M.; MACFARLANE, S.; MACFARLANE, G.T. Probiotics and intestinal infections. In: FULLER, R. (Ed.) **Probiotics 2: Applications and Practical Aspects**. London: Chapman and Hall, 1997, pp. 10-39.

GIBSON, G.R.; WANG, X. Regulatory effects of bifidobacteria on the growth of other colonic bacteria. **Journal of Applied Bacteriology**, v.77, p.412-420, 1994.

GRAMINHA, E.B.N.; GONCALVES, A.Z.L.; PIROTA, R.D.P.B.; BALSALOBRE, M.A.A.; SILVA, R.; GOMES, E. Enzyme production by solid-state fermentation: application to animal nutrition. **Animal Feed Science and Technology**, v.144, p.1-22, 2009.

HUGHES, R.; ROWLAND, I.R. Stimulation of apoptosis by two prebiotic chicory fructans in the rat colon. **Carcinogenesis**, v.22, 43-47, 2001.

KENNEDY, G. Nitrofurans em avicultura. In: SIMPÓSIO BRASIL SUL DE AVICULTURA, 4., 2003, Chapecó. **Palestras...** Concórdia: Embrapa Suínos e Aves, 2003. p.20-32.

LE BLAY, G.M.; MICHEL, C.D.; BLOTTIERE, H.M.; CHERBUT, C.J. Raw potato starch and short-chain fructo-oligosaccharides affect the composition and metabolic activity of rat intestinal microbiota differently depending on the caecocolonic segment involved. **Journal of Applied Microbiology**, v.94, p.312-320, 2003.

MAZUTTI, M.; BENDER, J.P.; TREICHEL, H.; DI LUCCIO, M. Optimization of inulinase production by solid-state fermentation using sugarcane bagasse as substrate. **Enzyme and Microbial Technology**, v.39, p.56-59, 2006.

NEAGU, C.; BAHRIM, G. Inulinases - a versatile tool for biotechnology. **Innovative Romanian Food Biotechnology**, v.9, p.1-11, 2011.

OKAMOTO, A. S.; ANDREATTI FILHO R. L.; LIMA E. T.; NOUJAIM J. C. Histopatologia da mucosa intestinal de pintos tratados com *Lactobacillus* spp. e desafiadas com *Salmonella enterica*, subespécie *enterica*, sorotipo Enteritidis. **Ciência Animal Brasileira**, v. 10, p. 568-573, 2009.

OLIVEIRA, R.A.; PARK, K.J.; CHIORATO, M.; PARK, K.J.B.; NOGUEIRA, R.I. Otimização da extração de inulina de raízes de chicória. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v.6, p.131-140, 2004.

PANDEY, A.; SOCCOL, C.R.; SELVAKUMAR, P.; SOCCOL, V.T.; KRIEGER, N.; JOSE, D. Recent developments in microbial inulinases, its production, properties and industrial applications. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.81, p.35-52, 1999.

PENG, X.W.; CHEN, H.Z. Single cell oil production in solid-state fermentation by *Microsphaeropsis* sp. from steam-exploded wheat straw mixed with wheat bran. **Bioresource Technology**, v.99, p.3885-3889, 2008.

ROBERFROID, M. B. Inulin-type fructans: functional food ingredients. **Journal of Nutrition**, v.137, p.2493-2502, 2007.

ROBERFROID, M.B.; VAN LOO, J.A.E.; GIBSON, G.R. The bifidogenic nature of chicory inulin and its hydrolysis products. **Journal of Nutrition**, v.128, p.11-19, 1998.

ROSSI, M.; CORRADINI, C.; AMARETTI, A.; NICOLINI, M.; POMPEI, A.; ZANONI, S.; MATTEUZZI, D. Fermentation of fructooligosaccharides and inulin by bifidobacteria: a comparative study of pure and fecal cultures. **Applied and Environmental Microbiology**, v.71, p.6150-6158, 2005.

SELVAKUMAR, P.; PANDEY, A. Solid state fermentation for the synthesis of inulinase from *Staphylococcus* sp. and *Kluyveromyces marxianus*. **Process Biochemistry**, v.34, p.851-858, 1999.

SINGHANIA, R.R.; PATEL, A.K.; SOCCOL, C.R.; PANDEY, A. Recent advances in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v.44, p.13-18, 2009.

STEVENS, C.; MERIGGI, A.; BOOTENS, K. Chemical modification of inulin, a valuable renewable resource and its industrial applications. **Biomacromolecules**, v.2, p.1-16, 2001.

TAILOR, M. J.; RICHARDSON, T. Application of microbial enzymes in food systems and in biotechnology. **Advances in Applied Microbiology**, v. 25, p.7–35, 1979.

VAN LAERE, K.M.J.; BOSVELD, M.; SCHOLS, H.A.; BELDMAN, G.; VORAGEN, A.G.J. Fermentative degradation of plant cell wall derived oligosaccharides by intestinal bacteria. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM 'NON-DIGESTIBLE OLIGOSACCHARIDES: HEALTHY FOOD FOR THE COLON?', 1997, Wageningen. **Anais...** Wageningen: The Netherlands, 1997. p 37-46.

VAN LOO, J. The specificity of the interaction with intestinal bacterial fermentation by prebiotics determines their physiological efficacy. **Nutrition Research Reviews**, v.17, p.89-98, 2004.

VAN LOO, J.; VANCRAEYNEST, L.D. Prebiotics and Animal Nutrition. In: GIBSON, G.R.; ROBERFROID, M.B. (Eds.). **Handbook of Prebiotics**. Boca Raton: CRC Press, 2008. pp.421-436.

VELASCO, S.; ORTIZ, L.T.; ALZUETA, C.; REBOLÉ, A.; TREVIÑO, J.; RODRÍGUEZ, M.L. Effect of inulin supplementation and dietary fat source on performance, blood serum metabolites, liver lipids, abdominal fat deposition, and tissue fatty acid composition in broiler chickens. **Poultry Science**, v.89, p.1651-1662, 2010.

WANG, L.; DARIN, R.; TINGYUE, G.; MOO-YOUNG, M. Effects of process parameters on heterologous protein production in *Aspergillus niger* fermentation. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v.78, p.1259–1266, 2003.

WANG, J.; GULERIA, S.; KOFFAS, M.A.G.; YAN, Y. Microbial production of value-added nutraceuticals. **Current Opinion in Biotechnology**, v.37, p.97-104, 2016.

WATHERHOUSE, A.L.; CHATTERTON, N.J. Glossary of fructan terms. In: SUZUKI, M.; CHATTERTON, N.J. (Eds.). **Science and Technology of Fructans**, Boca Raton: CRC Press, 1993. pp.2-7.

XIONG, C.; JINHUA, W; DONGSHENG, L. Optimization of solid state medium for the production of inulinase by *Kluyveromyces S 120* using response surface methodology. **Biochemical Engineering Journal**, v.34, p.179-184, 2007.

YUSRIZAL, Y. Microbial and oligosaccharides treatments of feces and slurry in reducing ammonia of the poultry farm. **Media Peternakan**, v.35, p.152-156, 2012.

YUSRIZAL, Y.; CHEN, T.C. Effect of adding chicory fructans in feed on fecal and intestinal microflora and excreta volatile ammonia. **International Journal of Poultry Science**, v.2, p.188-194, 2003a.

YUSRIZAL, Y.; CHEN, T.C. Effect of adding chicory fructans in feed on broiler growth performance, serum cholesterol and intestinal length. **International Journal of Poultry Science**, v.2, p.214-219, 2003b.

## **CAPÍTULO II**

## PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE INULINASES FÚNGICAS POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO UTILIZANDO RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS

**Resumo.** As inulinases catalisam a hidrólise da inulina, produzindo inulo-oligossacarídeos, frutose e glicose, por isso, possuem várias aplicações industriais. A fermentação submersa é mais utilizada na produção industrial de inulinase, contudo a fermentação em estado sólido tem demonstrado bons resultados quanto à obtenção de enzimas a baixo custo. Objetivou-se com este trabalho avaliar a produção de inulinases utilizando 16 espécies fúngicas cultivadas em fermentação em estado sólido (FES) utilizando resíduos agroindustriais como substrato, bem como a cinética enzimática e caracterização bioquímica (pH e temperatura ótimos e de estabilidade) da atividade de inulinases. A atividade da inulinase foi superior com a utilização da farinha de yacon como substrato em FES em relação ao farelo de trigo, farelo de soja e bagaço de cana-de-açúcar, independente do fungo utilizado. Para a maioria dos fermentados a maior atividade ocorreu no período de 72 a 120 horas de incubação. Com 48 horas de fermentação da farinha de yacon pelos fungos *Fusarium* sp. 13, *Aspergillus niger* 40018 e *A. niger* 01 foi obtida a produção máxima de inulinase. As inulinases produzidas utilizando farinha de yacon como substrato, apresentaram pH ótimo de atividade na faixa de 4 a 7 e estabilidade até o pH 10. Para o mesmo substrato, à exceção do *A. niger* 40018, a inulinase apresentou maior atividade à 95°C, sendo estável até esta mesma temperatura. A atividade de inulinases produzidas por *A. niger* 40018 em farinha de yacon apresentou temperatura ótima a 65°C, com um pico de 128 U mL<sup>-1</sup>. A fermentação da farinha de yacon por *A. niger* 40018, *A. niger* 01 e *Fusarium* sp. 13 por 48 horas proporciona alto teor de FOS e frutose. Além da alta quantidade de FOS, o preparado enzimático sólido da farinha de yacon por *A. niger* 40018 possui alta atividade de lipase e antioxidante, o que o constitui como promissor para utilização como aditivo em rações.

**Palavras-chave:** *Smallanthus sonchifolius*, fruto-oligossacarídeo, inulinases, prebióticos.

## PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF FUNGAL INULINASES BY SOLID STATE FERMENTATION USING AGROINDUSTRIAL WASTES

**Abstract.** The inulinase catalyzes the inulin hydrolysis, what produces inuloligosaccharides, fructose and glucose, therefore, it has many industrial applications. The submerged fermentation is more used on the industrial production of inulinase, however, the solid state fermentation has showed good results regarding to low cost enzymes. The aim of this work was to evaluate the inulinase production of 16 fungal species growing in solid state fermentation (SSF) on agroindustrial wastes as substrate, as well as enzymatic kinetics and biochemical characterization (optimal and stability of pH and temperature) of the inulinase activity. The inulinase activity was higher with yacon flour than wheat bran, soybean bran and sugarcane bagasse, independently of fungus. For the majority of fermented, the highest activity occurred between 72 and 120 hours of incubation. With 48 hours of fermentation of yacon flour by *Fusarium* sp. 13, *Aspergillus niger* 40018 and *A. niger* 01 it was obtained the maximum inulinase production. The inulinase produced using with yacon flour as substrate showed pH-optimal between 4 and 7, with good stability up to 10. For the same substrate, except for *A. niger* 40018, the inulinase showed highest activity to 95°C, being stable up to this same temperature. The activity of inulinase produced by *A. niger* 40018 with yacon flour showed optimum temperature at 65°C, with 128 U mL<sup>-1</sup>. The fermentation of yacon flour by *A. niger* 01, *A. niger* 40018 and *Fusarium* sp. 13 for 48 hours provides high FOS and fructose content. Besides the high amount of FOS, the solid enzymatic preparation of yacon flour with *A. niger* 40018 showed high lipase and antioxidant activity, what make it as a promising feed additive in diets.

**Key words:** *Smallanthus sonchifolius*, fructooligosaccharide, inulinases, prebiotics.

## INTRODUÇÃO

Inulinases (2,1-β-D-frutano frutanohidrolase, EC 3.2.1.7) catalisam a hidrólise da inulina, produzindo inulo-oligossacarídeos, frutose e glicose como principais produtos (NEAGU e BHRIN, 2011). As inulinases podem ser divididas em

exoinulinases ( $\beta$ -D-frutano frutohidrolase, EC 3.2.1.80) e endoinulinases (2,1- $\beta$ -D-frutano frutanohidrolase, EC 3.2.1.7). A exoinulinase catalisa a remoção dos resíduos de frutose terminal da extremidade não redutora da inulina, enquanto a endoinulinase hidrolisa as ligações internas da molécula de inulina produzindo inulotriose, inulotetraose e inulopentose como produtos principais. (CHI et al., 2011).

As inulinases industriais geralmente são produzidas por fermentação submersa, no entanto pesquisas demonstram que a fermentação em estado sólido (FES) tem potencial de produção mais econômica (PANDEY et al., 1999). A seleção de micro-organismos adequados é um aspecto importante para a FES e, conseqüente, produção de enzimas. Para FES o micro-organismo deve ser capaz de crescer em baixa atividade de água, e para ser aplicado em alimentos deve ser GRAS (Generally Recognized as Safe) e aceito pela FDA (Food and Drug Administration) (MAZUTTI et al., 2006).

Inulinases são produzidas por vários micro-organismos incluindo fungos filamentosos, leveduras e bactérias; e entre eles, *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp., *Bacillus* spp., *Clostridium* spp., *Pseudomonas* spp., *Arthrobacter* spp., *Staphylococcus* spp., *Xanthomonas* spp., *Kluyveromyces* spp., *Cryptococcus* spp., *Pichia* spp., *Sporotrichum* spp. e *Candida* spp. (SELVAKUMAR e PANDEY, 1999). Os fungos filamentosos de maior interesse industrial para a produção de enzimas incluem os *Aspergillus oryzae* e *Aspergillus niger* que são considerados não tóxicos, sendo avaliados como micro-organismos seguros pelo FDA e GRAS (FAWOLE e ODUNFA, 2003; WANG et al., 2003; TAILOR e RICHARDSON, 1979). Nas últimas três décadas, esforços significativos foram feitos para encontrar a melhor fonte microbiana para a extração de inulinase (VIJAYARAGHAVAN et al., 2009).

A produção de inulinases microbianas tem chamado a atenção recentemente, pois estas enzimas oferecem várias vantagens industriais. A inulinase pode ser utilizada em uma vasta gama de aplicações, como produção de xarope de alto teor de frutose, bioetanol, inuloligossacarídeos (NEAGU e BAHRIN, 2011), fruto-oligossacarídeos (XIONG et al., 2007), ácido cítrico, ácido láctico, 2,3 butanodiol e óleos e proteínas de organismos unicelulares (CHI et al., 2011). Ela também possui uso na medicina, como ferramenta para o diagnóstico de problemas renais (KUEHNLE et al., 1992).

A inulina, substrato utilizado para induzir a produção de inulinases, é um frutano com característica prebiótica por ser um carboidrato não digerível, que tem sido parte

das dietas de humanos e animais por séculos e ocorre naturalmente em mais de 36.000 plantas, armazenada na forma de carboidratos, como por exemplo, no alho-poró, cebola, alho, trigo, chicória, alcachofra, banana, yacon entre outros (BRANDT, 2001).

Em escala industrial, a inulina é obtida principalmente a partir de raízes de chicória, sendo usada como ingrediente funcional, além de oferecer exclusiva combinação de propriedades nutricionais e benefícios tecnológicos. As propriedades nutricionais da inulina promovem uma vasta gama de benefícios para a saúde e bem-estar (FRANCK e BOSSCHER, 2009).

A FES tem sido amplamente usada na elaboração de produtos para a alimentação animal para melhorar o valor nutritivo de subprodutos agrícolas e para produção de enzimas. Sua utilização aumentou devido à maior quantidade de resíduos produzidos nos países em desenvolvimento, o que representa uma potencial solução para alimentação de animais (ROBINSON e NIGAM, 2003).

Visando aliar nutrição com saúde animal é de suma importância que o substrato juntamente com o micro-organismo usado para FES, além de possuírem valores energéticos e proteicos possam, após a fermentação, agregar moléculas bioativas como enzimas, antioxidantes, ácidos orgânicos, carboidratos prebióticos, entre outros.

Objetivou-se com este trabalho avaliar a produção de inulinases por 16 linhagens fúngicas cultivadas em fermentação em estado sólido (FES) utilizando-se resíduos agroindustriais como substrato, bem como a cinética enzimática, caracterização bioquímica (pH e temperatura ótimo e de estabilidade) e averiguar o potencial uso do preparado enzimático sólido (PES) como aditivo na ração animal.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Micro-organismos**

As linhagens de fungos filamentosos obtidas de cepas liofilizadas de *Aspergillus niger* (INCQS 40018), *A. niger* (INCQS 40065), *A. oryzae* (INCQS 40068), *A. brasiliensis* (INCQS 40036), *A. flavipes* (INCQS 40024), *A. wentii* (INCQS 40016) *A. niger* (INCQS 40015) e *Penicillium roqueforti* (INCQS 40074) pertencentes ao Instituto Osvaldo Cruz (FIOCRUZ), foram ressuspendidas e inoculadas diretamente em *slants* contendo meio *Potato Dextrose Agar* (PDA), e incubados a 30°C até o crescimento satisfatório dos micro-organismos (incubação variou de 72 a 120 horas dependendo do

micro-organismo). Após o crescimento dos fungos, estes foram transferidos para novo *slants* contendo o mesmo meio de cultura e dessa forma, sob camada de vaselina esterilizada, foram conservados em refrigerador a 4°C. As linhagens foram repicadas a cada três meses de armazenamento.

As linhagens adquiridas da FIOCRUZ, juntamente com os fungos 51, 58, 77, 129, 159, 162, *A. niger* 01 e *Fusarium* sp. 13 da coleção do Laboratório de Microorganismos do Departamento de Química e Bioquímica do Instituto de Biociências da Unesp de Botucatu, foram utilizados para a produção enzimática.

### **Produção de inulinases em resíduos agroindustriais**

A produção de inulinases pelos fungos filamentosos foi realizada através de Fermentação em Estado Sólido (FES) utilizando como substratos o farelo de trigo, farelo de soja, farinha ou casca de yacon e bagaço de cana-de-açúcar, de forma isolada. Para a produção foi utilizado meio de cultura composto por 50% do substrato e 50% de água (p/v). Os frascos Erlenmeyers de 250 mL contendo 10g do meio de cultura foram esterilizados por 15 minutos à temperatura de 121°C, a 1 atm de pressão, e posteriormente inoculados com 2 mL de suspensão de esporos ( $10^7$ /mL) com 96 h de crescimento do fungo em meio inclinado PDA.

Os frascos foram incubados a 30°C por 96 h. Após a incubação foram adicionados 50 mL de água destilada em cada frasco. Os meios de cultura foram homogeneizados com bastão de vidro e após permanecerem em repouso por 1 h com agitação ocasional, foram filtrados em gaze e coletados em recipiente único. O filtrado foi considerado fonte de enzima, sendo a atividade de inulinases determinada como descrito no item determinação da atividade enzimática. Nesta etapa foram selecionados os seis fungos melhores produtores de inulinases. A fermentação foi realizada em duplicata.

### **Determinação da atividade enzimática**

Alíquota de 0,5 mL proveniente de diluições contendo 100 µl do extrato da enzima e 2,0 mL de inulina 1% (p/v), dissolvida em tampão citrato-fosfato 0,1 M (pH = 6,0) foi incubada a 45°C por 1 h. A reação foi paralisada em banho de gelo. Os produtos da reação foram centrifugados (6.000 rpm por 5 min a 5°C) e retirada uma

alíquota de 1 mL do sobrenadante, onde foi estimado os açúcares redutores pelo método Somogy-Nelson (NELSON, 1944). Os açúcares redutores liberados foram estimados pela curva de calibração utilizando como padrão frutose. Uma unidade (U) de atividade de inulinase foi definida como a quantidade de enzima que catalisa a liberação de 1  $\mu\text{mol}$  de frutose por minuto sob as condições de ensaio. Esta determinação, assim como todas as posteriormente descritas, foi realizada em triplicata.

### **Cinética de produção enzimática**

A cinética de produção da inulinase foi realizada com os fungos com maior capacidade de produção. O experimento foi conduzido como descrito no item produção de inulinase em resíduos agroindustriais, sendo que os frascos foram incubados 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 h. Assim, foi avaliado o melhor tempo de fermentação para a produção da enzima pelos fungos selecionados.

### **Caracterização bioquímica**

#### **Determinação do pH ótimo**

Foram preparadas soluções tampão (0,1M) para diferentes valores de pH, a saber: tampão acetato de sódio pH 4 e 5; tampão fosfato de sódio pH 6 e 7; tampão ácido bórico e borax pH 8 e 9 e tampão borax – NaOH pH 10. A determinação do pH ótimo da inulinase foi determinada como descrito no item determinação da atividade enzimática somente alterando a solução tampão do meio reacional.

#### **Determinação do pH de estabilidade**

Os extratos enzimáticos foram incubados em soluções tampão com diferentes valores de pH como descrito no item anterior, durante 24 horas a 25°C. Após o tratamento foi determinada a atividade enzimática residual, como descrito no item determinação da atividade enzimática.

#### **Determinação da temperatura ótima**

A temperatura ótima da inulinase foi verificada pela medição da atividade enzimática como descrita no item determinação da atividade enzimática, utilizando os

extratos enzimáticos em diferentes temperaturas de incubação. As temperaturas testadas foram 25 °C, 35°C, 45°C, 55°C, 65°C, 75°C, 85°C e 95°C.

### **Determinação da temperatura de estabilidade**

Os extratos enzimáticos foram tratados a diferentes temperaturas 25°C, 35°C, 45°C, 55°C, 65°C, 75°C, 85°C e 95°C, por 1 hora. Após o tratamento térmico a atividade enzimática residual foi determinada como descrito no item determinação da atividade enzimática.

### **Preparado Enzimático Sólido (PES)**

A produção do PES foi realizada através de fermentação em estado sólido (FES) utilizando como substrato farinha de yacon com *A. niger* 01, *A. niger* 40015, *A. niger* 40018, *A. flavipes* e *Fusarium* sp. 13. Para a produção foi utilizado meio de cultura composto por 50% do substrato e 50% de água (p/v). Os frascos Erlenmeyers de 500 mL contendo 40g do meio de cultura foram esterilizados por 15 minutos a 121°C, 1 atm de pressão, e posteriormente inoculados com 6 mL de suspensão de esporos ( $10^7$ /mL). Os frascos foram incubados a 30°C por 48 horas.

### **Quantificação de açúcares por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)**

A caracterização e quantificação dos açúcares foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com equipamento da marca VARIAN modelo PRO STAR 410, com duas bombas binárias e injetor automático (AUTO SAMPLER 410) e detector IR (índice de refração). A coluna utilizada foi a HPX 87P (fase estacionária de chumbo) e a pré-coluna 125-0119, ambas BIO-RAD<sup>®</sup>, com temperatura da coluna a 85°C. O tempo de corrida foi de 30 minutos, com fluxo de 0,6 mL por minuto. Os padrões utilizados para comparação foram glicose, frutose e sacarose produzidos pela Synth.

Todos os fermentados selecionados para análise de CLAE tiveram a farinha de yacon como substrato, sendo que para *A. niger* 01, *A. niger* 40018 e *Fusarium* sp. 13 a incubação foi por 48 horas, enquanto que para *A. flavipes* e *A. niger* 40015 a incubação foi por 72 horas.

A quantificação dos fruto-oligossacarídeos dos preparados enzimáticos sólidos (PES) foi realizada em função da porcentagem de área dos fruto-oligossacarídeos em relação à área total dos açúcares. As amostras foram filtradas em membrana fluoreto polivinidileno (PVDF) com 0,22 mm de poro, 13 mm de diâmetro, hidrofílica, marca MILLI PORE, com auxílio de um *rolder* e seringa de 1 mL, para reter o material sólido e, finalmente, colocado em frasco do injetor automático para a leitura.

### **Atividade da enzima lipase do PES**

A atividade lipolítica das frações foi medida seguindo o método descrito por Macedo et al. (1997) e Lopes et al. (2011), modificados. Foram utilizado 5 mL do substrato composto por azeite de oliva extra virgem e solução de goma arábica 7% (na proporção de 1:4, v/v), 3 mL de solução tampão fosfato (0,1 M, pH 7,0) e 1g do extrato enzimático. O sistema reacional foi incubado por 30 min à 40°C em banho termostaticado com agitação de 130 oscilações por minuto. A reação foi paralisada pela adição de solução acetona:etanol (1:1, v/v). Os ácidos graxos liberados pela hidrólise dos lipídeos do azeite foram titulados com solução de NaOH (0,05 M) utilizando fenolftaleína como indicador. Para a avaliação da atividade, cada unidade de atividade lipolítica foi definida como a quantidade de lipase necessária para liberar 1µmol de ácido graxo por minuto, nas condições descritas anteriormente. Para cada amostra foi analisado um branco de amostra, composto por extrato enzimático desnaturado por elevada temperatura e pela adição da solução paralisadora antes do banho termostaticado. O resultado de cada branco de amostra obtido na titulação foi descontado da amostra correspondente. Foi analisado branco de reagentes (sem extrato enzimático) como garantia de que os resultados obtidos na titulação eram referentes à reação com os extratos enzimáticos e não dos ácidos presentes no substrato.

### **Determinação da atividade antioxidante do PES**

A medida da atividade sequestrante de radicais DPPH (1,1- difenil-2-picrilidrazil) nos extratos (PES) foi realizada de acordo com metodologia descrita por Zhu et al. (2002) e Chen et al. (2003). Uma alíquota de 200 µL do extrato do (PES) foi homogeneizada com 3 mL de etanol P.A.

A solução foi deixada em repouso por 10 minutos, sendo que 300 µL do sobrenadante foi utilizado para a atividade antioxidante. Posteriormente foi adicionado aos 300 µL do sobrenadante, 2,0 mL da solução do radical DPPH (0,01g/50mL de etanol) ao sobrenadante, sendo que a diminuição da absorbância foi medida a 517 nm, após 30 minutos à temperatura ambiente.

A concentração de DPPH no meio reacional foi calculada com uma curva de calibração (trolox equivalente), determinada pela regressão linear ( $R^2 = 0,98$ ).

A atividade antirradical foi determinada em termos de porcentagem de inibição (PI), a qual foi calculada através da taxa de declínio da absorção da solução de DPPH, após o tempo de reação, com a absorção da solução controle, de acordo com a Equação 1:

$$\text{Equação 1: PI (\% de inibição)} = [A(0) - A(t) / A(0)] \times 100$$

Onde A (0) = Abs da solução referência de DPPH-etanol

A (t) = Abs da solução DPPH-produto

### **Análises bromatológicas do PES**

Para avaliação da composição químico-bromatológica do PES, foram efetuadas as determinações de matéria seca (MS), proteína bruta (PB), fibra bruta (FB), extrato etéreo (EE) e matéria mineral (MM), segundo AOAC (2000). A energia bruta foi determinada em bomba calorimétrica (C200, IKA, Staufen, Alemanha).

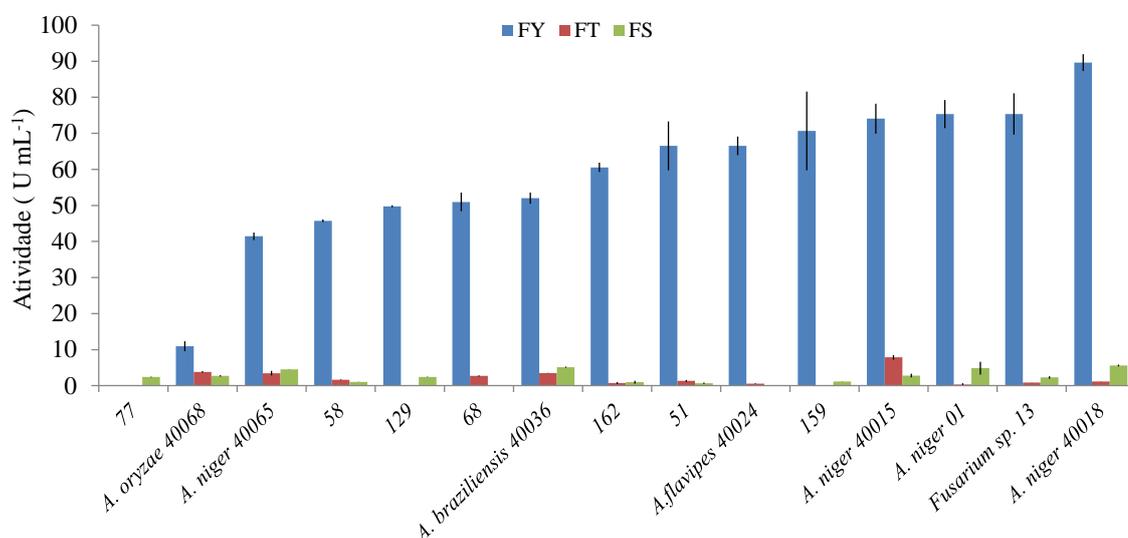
## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **Produção enzimática para seleção**

A produção de inulinase por FES foi avaliada com os substratos farelo de trigo, farelo de soja, bagaço de cana-de-açúcar e farinha de yacon usando 16 linhagens fúngicas. Para os fungos que não apresentaram nenhum crescimento no substrato não foram aferidas as atividades enzimáticas.

O micro-organismo que apresentou maior atividade de inulinase em farelo de trigo foi o *A. niger* 40015 (7,9 U mL<sup>-1</sup>), seguido pelo *A. oryzae* 40068 (3,8 U mL<sup>-1</sup>), *A. brasiliense* 40036 (3,5 U mL<sup>-1</sup>), *A. niger* 40065 (3,5 U mL<sup>-1</sup>) e em menor grau pelos outros fungos estudados (Figura 1).

Selvakumar e Pandey (1999) avaliaram a atividade de inulinase em FES de *Staphylococcus* sp. e *Kluyveromyces marxianus* em diferentes substratos. Para *Staphylococcus* sp. as atividades foram de 16,4 U mL<sup>-1</sup> em farelo de trigo moído grosso; 19,4 U mL<sup>-1</sup> em farelo de trigo moído fino; 12,6 U mL<sup>-1</sup> em farelo de arroz; 13,4 U mL<sup>-1</sup> em resíduo de côco e 3,2 U mL<sup>-1</sup> em farinha de milho. Para *Kluyveromyces marxianus* as atividades foram de 21,3 U mL<sup>-1</sup> em farelo de trigo moído grosso; 19,6 U mL<sup>-1</sup> em farelo de trigo moído fino; 17,6 U mL<sup>-1</sup> em farelo de arroz; 16,4 U mL<sup>-1</sup> em resíduo de côco e 4,3 U mL<sup>-1</sup> em farinha de milho. De maneira geral ambos os micro-organismos possuem maior atividade nos farelos de trigo e menor na farinha de milho, com destaque para a preferência pela granulometria mais fina do farelo de trigo pelo *Staphylococcus* sp. e mais grossa *Kluyveromyces marxianus*. A atividade enzimática da inulinase produzida no farelo de trigo do presente estudo foi inferior à obtida por Selvakumar e Pandey (1999).



**Figura 1.** Produção de inulinases fúngicas utilizando farinha de yacon (FY), farelo de trigo (FT) e farelo de soja (FS) em fermentação em estado sólido. As barras representam o erro padrão da média.

Para Chen et al. (2011) ao estudar o *Aspergillus ficuum* JNSP5-06 em FES a atividade de inulinase encontrada foi de 205,63 U/gSS, ou seja, 40,84 U mL<sup>-1</sup>, sendo que o substrato utilizado foi o farelo de trigo com acréscimo de inulina e licor de infusão de milho, o que possivelmente induziu a produção da enzima.

A atividade enzimática no farelo de soja foi maior que no trigo, sendo que as principais linhagens que produziram inulinase foram *A. niger* 40018, *A. brasiliensis* 40036, *A. niger* 01 e *A. niger* 40065 (Figura 1).

Para bagaço de cana-de-açúcar a atividade de inulinase dos fungos estudado foi baixa, com valores de 0,04, 0,02, 0,02, 0,02, 0,02 e 0,02 para *A. brasiliensis* 40036, *A. niger* 40065, *A. niger* 01, *A. niger* 40015, *A. flavipes* 40024 e *A. oryzae* 40068, respectivamente. Possivelmente, as linhagens de fungos utilizadas em nosso experimento não foram capazes de metabolizar o bagaço de cana-de-açúcar, devido ao alto teor de fibra, ou o substrato pode ter apresentado pH que inviabilizou o crescimento microbiano.

Abd El Aty et al. (2014) avaliaram a FES e atividade de inulinase de *Aspergillus terreus*, *A. versicolor*, *A. parasiticus*, *Penicillium brevicompactum* e *Kluyveromyces marxianus* NRRL 7571 nos substratos raiz de chicória, folha de alcachofra, folha de banana, resíduo de alho, casca de laranja e bagaço de cana-de-açúcar. Os micro-organismos que apresentaram maior atividade para cada substrato foram os seguintes: *Penicillium brevicompactum* em raiz de chicória ( $0,886 \text{ U g}^{-1}$ ), *A. terreus* em folha de alcachofra ( $4,433 \text{ U g}^{-1}$ ), *K. marxianus* NRRL 7571 em folha de banana ( $1,352 \text{ U g}^{-1}$ ) e resíduo de alho ( $0,886 \text{ U g}^{-1}$ ), *A. versicolor* em casca de laranja ( $1,917 \text{ U g}^{-1}$ ) e *A. parasiticus* para bagaço de cana-de-açúcar ( $1,319 \text{ U g}^{-1}$ ). Apesar das unidades serem diferentes, nota-se que para estes autores a atividade no bagaço cana-de-açúcar não foi tão baixa, como à observado no presente experimento.

Dessa forma, pode-se constatar a diversidade de resultados dependente do micro-organismo, substrato e condições do meio de cultivo. A grande variação entre os micro-organismos e inclusive entre cepas do mesmo micro-organismo está relacionada com a variabilidade genética. A composição de resíduos agroindustriais que são utilizados como substrato para FES é variável conforme manejo, tempo, temperatura, solo e outros fatores, podendo interferir diretamente como é aproveitado pelos micro-organismos e, conseqüentemente, na produção de seus metabólitos. Quanto ao meio de cultivo, as variações na umidade, temperatura, pH, tempo de incubação, entre outros, interferem na atividade dos micro-organismos.

Observa-se uma alta atividade de inulinase ao utilizar a farinha de yacon como substrato (Figura 1), indicando que este substrato é excelente para o crescimento de

algumas linhagens de fungos. Apresenta aproximadamente 14% de inulina em sua composição, o que sugere que os fungos estão metabolizando o substrato, produzindo assim grandes quantidades de inulinas, mecanismo esse denominado de indução de produção enzimática ou seja, como a principal fonte de carbono no meio é inulina, o micro-organismo precisa produzir inulinas para hidrolisá-la e aproveitar para seu metabolismo. É um mecanismo que pode ocorrer ou não, pois há também as enzimas constitutivas que são produzidas independentemente do meio e que fazem parte do metabolismo natural do micro-organismo.

Yu et al. (2009) usando fermentação submersa com inulina como substrato e extrato de levedura *Pichia guilliermondii* mutante M-30, obtiveram atividade de inulinase de 127,7 U mL<sup>-1</sup>. Apesar dos autores realizarem meio de fermentação diferente, é nítido que a produção de inulinase foi induzida pela presença da inulina no substrato. O mesmo comportamento também foi observado no presente experimento, ao utilizar a FES de *A. niger* 01 e *Fusarium* sp. 13 em farinha de yacon, a atividade de inulinase foi de 75,4 U mL<sup>-1</sup> para ambos os micro-organismos.

### **Cinética enzimática**

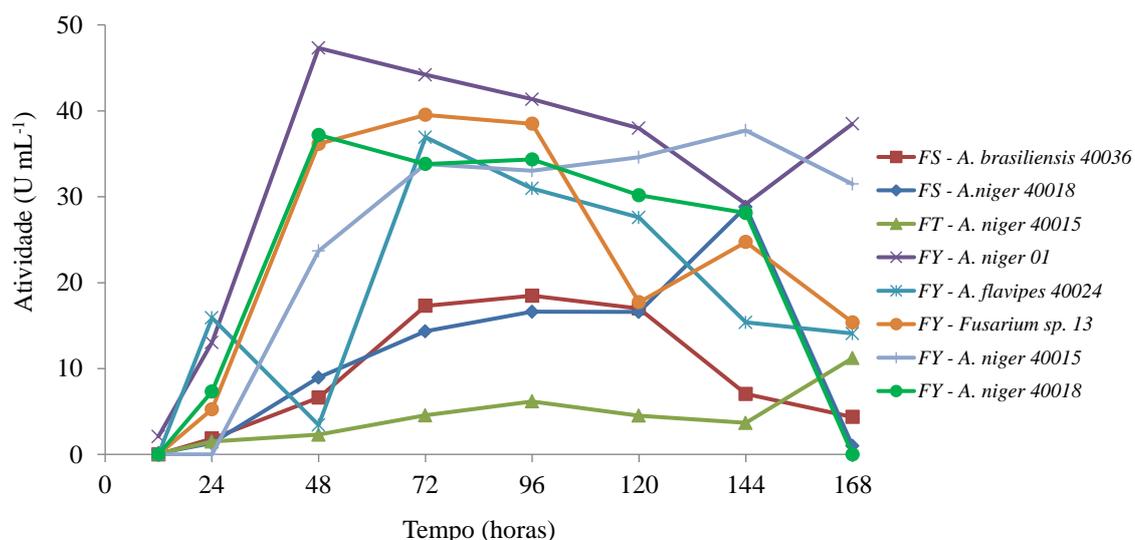
As linhagens fúngicas e substratos selecionados para o estudo da cinética foram cinco fermentados com yacon com maior produção de inulinase, à exceção do *A. flavipes* 40024, pois este produziu pouco menos que o 159 (Figura 1), mas foi selecionado por apresentar menor variabilidade (sendo o erro padrão de 2,6 mL<sup>-1</sup> para *A. flavipes* 40024 e 10,9 mL<sup>-1</sup> para 159). Sendo assim, além do *A. flavipes* 40024, foram selecionados para a farinha de yacon o *A. niger* 40018, *A. niger* 40015, *A. niger* 01 e *Fusarium* sp. 13. Apesar dos demais substratos proporcionarem menor atividade que a farinha de yacon, ainda foram selecionados dois fermentados com farelo de soja (*A. brasiliensis* 40036 e *A. niger* 40018) e um com farelo de trigo (*A. niger* 40015).

A atividade da inulinase até 24 horas de incubação foi baixa para todas as combinações de substratos e micro-organismos (Figura 2). Com 48 horas, três combinações se destacaram, a farinha de yacon com os fungos *Fusarium* sp. 13 (36,2 U mL<sup>-1</sup>), *A. niger* 40018 (37,2 U mL<sup>-1</sup>) e *A. niger* 01 (47,3 U mL<sup>-1</sup>), sendo que para este último 48 horas implicou na maior atividade dentre todos os tempos testados. Ainda

com 48 horas a farinha de yacon com *A. niger* 40015 apresentou atividade intermediária (23,7 U mL<sup>-1</sup>) e os demais fermentados apresentaram baixa atividade.

O comportamento para a maioria dos fermentados foi de alta atividade no período de 72 a 120 horas de incubação, com queda na atividade a partir de 144 horas. Diferentemente, os fermentados de soja com *A. niger* 40018 e trigo com *A. niger* 40015 apresentaram atividade intermediária no período de 72 a 120 horas e alcançaram sua máxima atividade nos maiores tempos de incubação.

De maneira geral, pode-se observar que não há um padrão na produção de inulinase em função do tempo, o que depende da combinação do substrato com o micro-organismo. A ausência de padrão é ainda mais nítida ao observar o comportamento diferencial do *A. niger* 40015 para farelo de trigo e farinha de yacon (Figura 2). Este mesmo comportamento foi encontrado por Narayanan et al. (2013), que obtiveram maior atividade de inulinase de *A. niger* em casca de banana com 48 h de fermentação, enquanto que para casca de alho e farelo de trigo e arroz, a maior atividade foi com 72 h. Ayyachamy et al. (2007) testaram a FES com *Xanthomonas campestris* pv phaseoli em diferentes substratos e observaram maior atividade com 24 h de incubação para casca de cebola, 48 h para casca de alho, farelo de cevada e farelo de trigo e 144 h para chicória e dente-de-leão.

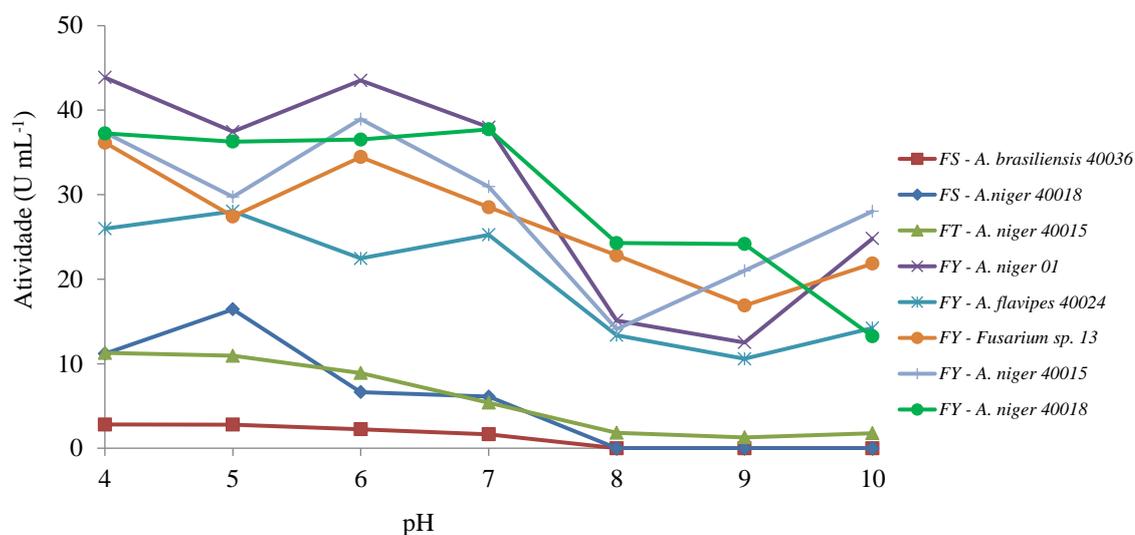


**Figura 2.** Atividade de inulinase em fermentação em estado sólido em função do tempo de incubação para combinações de substratos e micro-organismos. FS – Farelo de soja, FT – Farelo de trigo, FY – Farinha de yacon.

### Caracterização bioquímica das inulinases fúngicas

Para os fermentados com farinha de yacon, de maneira geral, o pH da inulinases fúngicas apresentaram-se entre 4 e 7, sendo que acima do pH 7 todos apresentaram decréscimo na atividade (Figura 3). Para os substratos farelo de trigo e de soja os valores de pH ótimo foram entre 4 e 5, demonstrando menor amplitude de pH. Vale destacar que no substrato farinha de yacon, à exceção do *A. niger* 40018, todos os fungos apresentaram um segundo pico de atividade da inulinase no pH 10, evidenciando a presença de isoenzimas. Independentemente do pH, a atividade da inulinase foi superior no substrato de farinha de yacon.

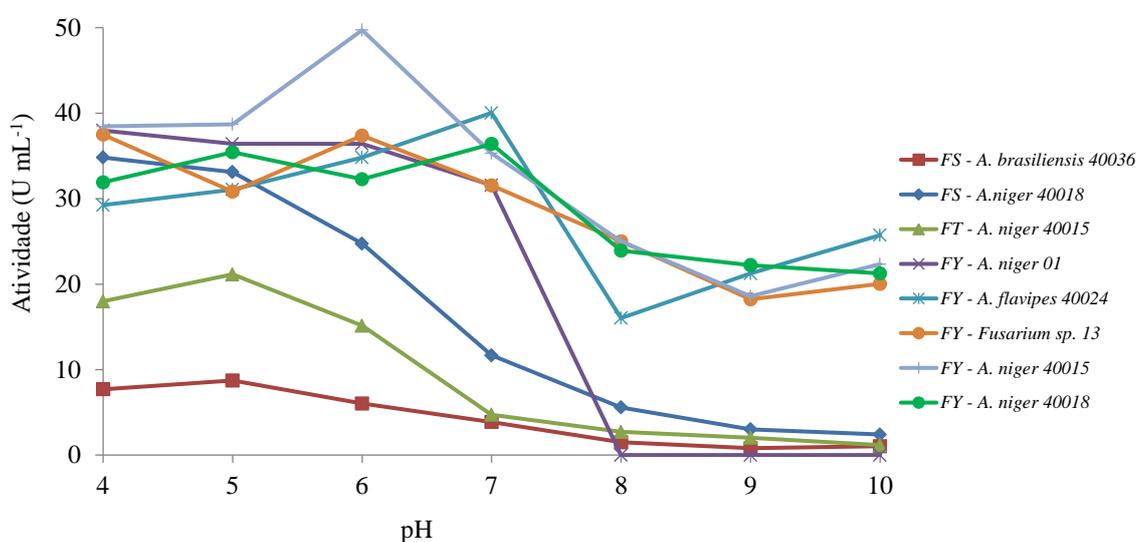
O pH de estabilidade da inulinase apresentou comportamento semelhante que o pH ótimo, sendo estável até 7 para a maioria dos casos (Figura 4). Este padrão difere da maioria dos resultados da literatura, como explicitado nas revisões de Ohta et al. (2004) e Pandey et al. (1999), com valores de pH ótimo na faixa de 4 a 6. Al-Dabbagh e Mahmood (2015) observaram pH ótimo de 4,5 para a atividade da inulinase em FES de alcachofra e feijão (1:1) por *A. niger*, entretanto a atividade relativa variou de 71% a pH 3,5 até 57% a pH 7,0. Narayanan et al. (2013) observaram maior atividade da inulinase em FES de *A. niger* à pH 4 para casca de alho e à pH 5 para casca de banana e farinhas de trigo e arroz. Da mesma forma, estes autores observaram atividades intermediárias desde pH 3 até 8.



**Figura 3.** Atividade de inulinase em fermentação em estado sólido em função do pH para combinações de substratos e micro-organismos. FS – Farelo de soja, FT – Farelo de trigo, FY – Farinha de yacon.

As situações mais discrepantes foram observados para o *A. niger* 40015 em farinha de yacon com pico de atividade no pH 6; *A. niger* 01 em farinha de yacon com atividade nula a partir do pH 8; e *A. niger* 40018 em farelo de soja com alta atividade nos menores valores de pH, assemelhando-se aos fermentados com farinha de yacon (Figura 3).

Ao avaliarem a atividade de inulinase ( $19,9 \text{ U mL}^{-1}$ ) por FES constituída por um *blend* de bagaço de cana-de-açúcar, água de maceração de milho e farelo de soja inoculado com *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571, observaram condições ideais de pH e temperatura de 5 e  $55^\circ\text{C}$ , respectivamente (MAZUTTI et al., 2010). Cazetta et al. (2005) observaram maior atividade de inulinase ( $4,1 \text{ U mL}^{-1}$ ) em pH 4, no entanto, a partir desse ponto a atividade decresceu atingindo 0 no pH 10, utilizando extrato enzimático obtido de *Kluyveromyces marxianus var. bulgaricus* em meio líquido contendo yacon.



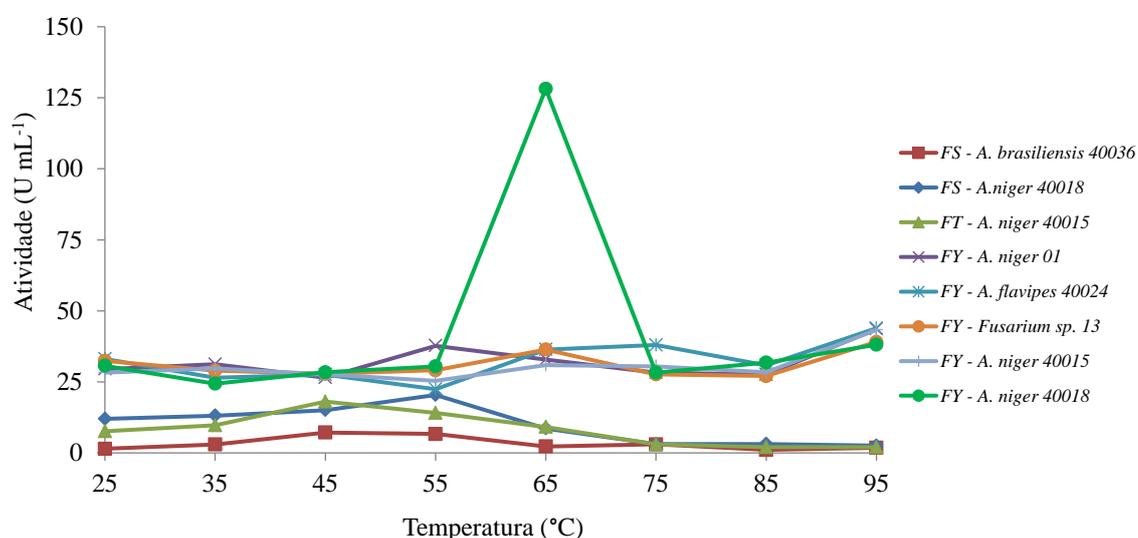
**Figura 4.** Atividade de inulinase em fermentação em estado sólido em função do pH de estabilidade para combinações de substratos e micro-organismos. FS – Farelo de soja, FT – Farelo de trigo, FY – Farinha de yacon.

O efeito do pH na atividade enzimática é determinado pela natureza dos aminoácidos constituintes, da protonação e desprotonação dos grupos ionizáveis da proteína tanto no sítio ativo (favorecendo ou não a atividade) quanto na conformação da proteína como um todo (alterando para uma estrutura mais ou menos ativa) (LEHNINGER et al., 2006).

O pH afeta também o modo de ação das exoinulinases, que são a forma predominante das inulinases fúngicas (PANDEY et al., 1999). Segundo Snyder e Phaff (1962), em pH 3,0, a exoinulinase proveniente de *Saccharomyces fragilis* ataca aleatoriamente diferentes moléculas de inulina, enquanto em maior pH (5,1 e 7,0) a enzima ataca uma molécula de inulina por vez, independente da temperatura.

Apesar da inulinase obtida da farinha de yacon apresentar boa atividade e estabilidade acima de pH 7, é importante notar que a atividade de inulinases do mesmo substrato não reduz de  $30 \text{ U mL}^{-1}$  entre a faixa de pH 4 a 7, o que é uma característica desejável para a indústria.

A atividade da inulinase em função da temperatura para os substratos a base de trigo e soja apresentaram comportamento semelhante, com valores ótimos entre 45 e 55°C, decrescendo mais acentuadamente a partir de 65°C (Figura 5). Esse comportamento é considerado como efeito padrão da temperatura sobre a atividade enzimática (PARKIN, 2010).



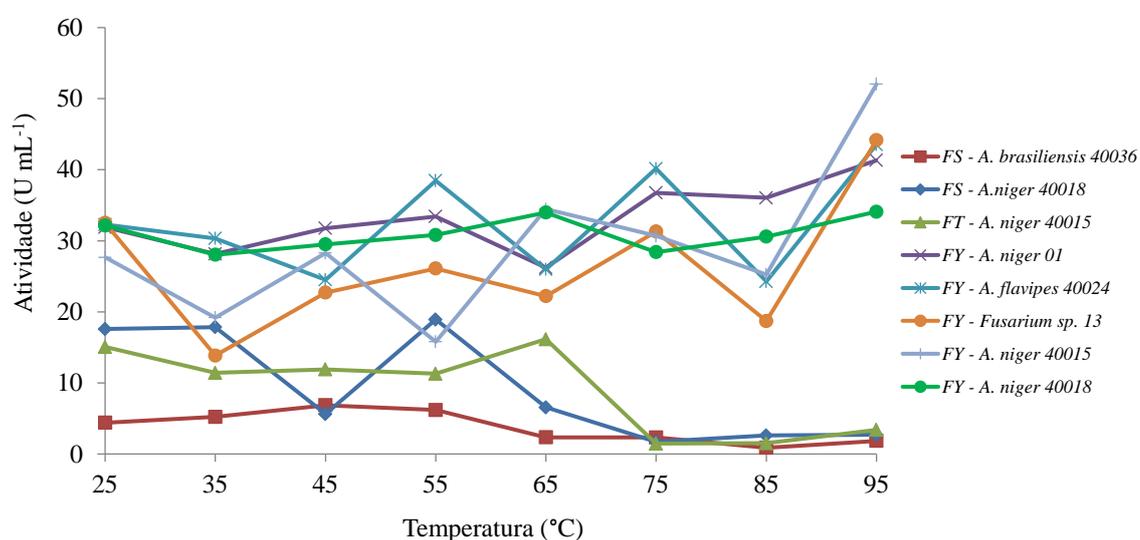
**Figura 5.** Atividade de inulinase em fermentação em estado sólido em função da temperatura para combinações de substratos e micro-organismos. FS – Farelo de soja, FT – Farelo de trigo, FY – Farinha de yacon.

A atividade no substrato de farinha de yacon, à exceção do *A. niger* 40018, apresentou comportamento semelhante entre os micro-organismos, mas distinto dos demais substratos, com valores estáveis ou com suave redução até 55°C, e aumento na atividade até a temperatura de 95°C, o que difere da maioria das publicações. A

atividade para o *A. niger* 40018 em farinha de yacon apresentou temperatura ótima a 65°C, com um pico de 128 U mL<sup>-1</sup>. Nas demais temperaturas a atividade permaneceu próxima do observado nos demais fungos. Considerando o pico de atividade a 65°C, a temperatura ótima ficou acima do encontrado na literatura. Em revisão à respeito de inulinasas fúngicas, Ohta et al. (2004) relataram que as endoinulinasas apresentaram temperatura ótima de 45 a 55°C, e as exoinulinasas de 45 a 60°C, dependendo do micro-organismo estudado.

Como a inulina possui baixa solubilidade a temperatura ambiente (Phelps, 1965), a produção de frutose a partir da inulina geralmente é realizada a 60°C (Flores-Gallegos et al., 2015). Dessa forma, a seleção de inulinasas termoestáveis é de grande interesse para a indústria.

A estabilidade da enzima em função da temperatura também se diferenciou entre os substratos (Figura 6). Para a farinha de yacon, todos os micro-organismos apresentaram atividade até 95°C. Para os substratos à base de soja e trigo, a enzima manteve atividade enzimática até 55-65°C, com redução drástica a partir de 75°C.



**Figura 6.** Atividade de inulinase em fermentação em estado sólido em função da temperatura de estabilidade para combinações de substratos e micro-organismos. FS – Farelo de soja, FT – Farelo de trigo, FY – Farinha de yacon.

Analisando a temperatura de estabilidade observou-se a presença de picos de atividade conforme a variação na temperatura, principalmente para a farinha de yacon, o que evidencia a presença de isoenzimas (Figura 6). As isoenzimas podem ser

produzidas pelo mesmo micro-organismo e são caracterizadas por catalisarem a mesma reação, entretanto, apresentam características bioquímicas distintas.

Utilizando inulina de chicória como substrato em fermentação submersa, Kango (2008) observou maior atividade de inulinase de *A. niger* NK-126 à temperatura de 50°C e pH 5,0. O mesmo autor avaliou diferentes substratos separadamente e observou alta atividade de inulinase nas raízes (52,5 U mL<sup>-1</sup>) e folhas (26,3 U mL<sup>-1</sup>) de dente-de-leão (*Taraxacum officinale*), comparados com a inulina de chicória (12,3 U mL<sup>-1</sup>), com este mesmo micro-organismo.

Narayanan et al. (2013) observaram maior atividade da inulinase em fermentação em estado sólido de *A. niger* à temperatura de 27°C para os quatro resíduos testados (cascas de banana e alho e farinhas de trigo e arroz), com redução linear até 57°C. Entretanto, os autores observaram maior atividade à 57°C pela casca de banana, e posteriormente verificaram que para este substrato a enzima apresentou boa estabilidade até 80°C.

Ettalibi e Baratti (2001) descreveram que algumas inulinases são excelentes para uso industrial devido à sua termoestabilidade, o que também foi observado no presente estudo. Também vale ressaltar que o substrato interfere na resposta da enzima à temperatura pelo micro-organismo. Silva et al. (2012) observaram que a atividade da inulinase de *A. japonicus* URM 5633, em casca de palma, foi máxima em 35°C e decresceu até 55°C, enquanto que para casca de mandioca a atividade máxima foi a 55°C.

Quando há o aumento da temperatura, aumenta a colisão entre enzima e substrato, implicando em maior velocidade de reação. O aumento da temperatura após o ponto ótimo implica em diminuição da atividade, devido à quebra das ligações responsáveis em manter a estrutura proteica com atividade biológica. Além disso, a proteína entra em estado de ionização, perde sua solubilidade resultando em diminuição da atividade (LEHNINGER et al., 2006).

Uma possível explicação para a alta estabilidade térmica observada nos fermentados com yacon é de que nesses tratamentos tenha ocorrido maior formação de manitol e glicerol. Além disso, é possível que haja ligações que estabilizam a estrutura proteica e que sejam resistentes às altas temperaturas. O efeito do manitol e do glicerol foram testados em fermentação submersa com inulinase purificada de *Streptomyces* sp.

ALKC 4 a 80°C por 1 h, e apresentaram atividade de 99% (manitol) e 93% (glicerol) em relação ao controle sem aquecimento, sendo que o controle com aquecimento a atividade foi de 30% (SHARMA e GILL, 2007).

Em condições de baixa atividade de água, como na fermentação em estado sólido, pode ocorrer o acúmulo pelos micro-organismos de íons, assim como de aminoácidos ou poliois, na tentativa de reduzir a perda de água de suas células. Os fungos geralmente acumulam poliois como glicerol, manitol, eritritol e arabitol (RUITJER et al., 2004). Dessa forma, levanta-se a hipótese de que o farelo de yacon tenha maior capacidade de promover a síntese desses poliois, uma vez que possui alta quantidade de glicose, frutose e sacarose, ou seja, fontes de carbono para essa síntese. Reina et al. (2015) observaram alta produção de manitol a partir da fermentação espontânea de yacon.

O comportamento diferencial das inulinases em função do pH e temperatura, comparando os observados com os valores encontrados na literatura, pode estar relacionado ao fato de que os micro-organismos produzem inulinases diferentes, como demonstrado na revisão de Ricca et al. (2007), onde foram relatadas as massas moleculares de inulinases variando de 53 kDa (*A. ficuum*) até 300 kDa (*A. niger*). A massa molecular pode variar entre inulinases produzidas pelo mesmo micro-organismo, como a variação em *Aspergillus ficuum* JNSP5-06 de 31 kDa para endoinulinase II a 70 kDa para exoinulinase I (CHEN et al., 2009).

### **Caracterização e quantificação dos açúcares por CLAE**

Os PES de farinha de yacon com *A. niger* 40018, *A. niger* 01 e *Fusarium* sp. 13 apresentaram porcentagens superiores de FOS (Tabela 1), sugerindo que além das enzimas inulinases que hidrolisam a inulina para formar FOS, houve a produção das enzimas  $\beta$ -D-frutossiltransferases, pois estas apresentam tanto a atividade de hidrólise quanto a atividade de transferase, em graus diferentes, o que contribui para a produção de FOS (GHAZI et al., 2007).

Os teores de FOS na farinha de yacon fermentados com *A. niger* 40018, *A. niger* 01 e *Fusarium* sp. 13 foram superiores aos teores de FOS na farinha de yacon obtidos por Rodrigues et al. (2011) de 25,7% e Vasconcelos et al. (2010) de 19,4%, e inferiores aos de Genta et al. (2005) de 44,2% e de Lobo et al. (2007) de 55,3%. No entanto, essas

variações podem ocorrer devido ao período de cultivo e da colheita, cultivar, tempo de armazenamento e das condições de estocagem, como também o método de secagem, sendo que a liofilização é um método mais eficiente do que a secagem em estufa e proporciona maior teor de FOS (LOBO et al., 2007). Além disso, pode ocorrer devido à ação enzimática quanto à produção de FOS.

**Tabela 1.** Composição dos açúcares dos preparados enzimáticos sólidos (PES) selecionados para análise de CLAE

PES	% de açúcares				
	Frutose	Glicose	Sacarose	FOS	Inulina
Farinha de yacon + <i>A. niger</i> 01	37,76	4,73	4,39	28,94	0,00
Farinha de yacon + <i>Fusarium</i> sp. 13	17,27	1,74	2,08	26,84	0,04
Farinha de yacon + <i>A. niger</i> 40015	4,78	0,58	0,56	3,51	0,02
Farinha de yacon + <i>A. flavipes</i> 40024	2,58	0,35	0,54	3,18	0,00
Farinha de yacon + <i>A. niger</i> 40018	36,72	4,30	5,15	33,31	0,06
Farinha de yacon**	-	-	-	27,00	14,00

\*\*dados do fabricante (Giroil®)

A fermentação com os fungos *A. niger* 40018, *A. niger* 01 e *Fusarium* sp. 13, além de proporcionarem maior teor de FOS, mantiveram maiores teores de frutose, glicose e sacarose, com destaque para a frutose. Considerando que o yacon possui aproximadamente 90% de carboidratos em sua matéria seca e estes carboidratos podem conter de 40 a 70% de frutanos (inulina e FOS) (MANRIQUE et al., 2005); 8,5 a 19,5% de sacarose; 3,2 a 21,6% de frutose e 2,0 a 5,4% de glicose (HERMANN et al., 1999); é provável que estes carboidratos já estivessem na composição da matéria prima, e não apenas provindo da inulina hidrolisada.

A fermentação com os fungos *A. niger* 40015 e *A. flavipes* 40024 apresentaram baixos valores de todos os carboidratos, possivelmente pelo maior tempo de fermentação (72 horas) em relação aos demais fermentados (48 horas), o que deve ter proporcionado a quebra desses carboidratos para a formação de outros compostos.

Como o PES da farinha de yacon com *A. niger* 40018 apresentou composição de açúcares promissora para a utilização na alimentação animal, foi realizada a caracterização bromatológica do mesmo (Tabela 2).

Padilha et al. (2012) observaram os valores de 3,36% de proteínas; 4,2 de cinzas, 282,35 kcal 100 g<sup>-1</sup> de valor calórico; 0,19% de lipídios; 66,8% de carboidratos; 12,21%

de fibras dietéticas e 1,45% de frutanos. Rodrigues et al. (2011) observaram os valores de 2,7% de proteínas; 5,4 de cinzas; 142,75 kcal 100 g<sup>-1</sup> de valor calórico; 0,15% de lipídios; 8,6% de glicose; 21,1% de frutose; 16,3% de sacarose; 38,95% de fibras totais e 25,7% de fruto-oligossacarídeos. Os valores de proteína e energia da farinha de yacon e do PES (Tabela 2) são maiores e as cinzas, lipídeos e fibras são menores que os apresentado por Padilha et al. (2012) e Rodrigues et al. (2011), apesar de haverem grandes variações.

**Tabela 2.** Composição bromatológica, atividade da lipase e antioxidante da farinha de yacon e do preparado enzimático sólido (PES) de farinha de yacon com *A. niger* 40018.

Componentes	Farinha de yacon	PES
Matéria seca (%)	91,93	45,85
Proteína bruta (%)	5,12	4,43
Extrato etéreo (%)	0,00	0,00
Matéria mineral (%)	3,29	2,94
Fibra bruta (%)	4,61	4,35
Energia bruta (cal 100 g <sup>-1</sup> )	368,6	373,6
Atividade da lipase (U mL <sup>-1</sup> )	14,86	20,24
Atividade antioxidante (% redução DPPH)	27,2	93,5

A quantidade de FOS (Tabela 2) também pode ser considerada superior aos autores supracitados. Como não há na literatura as mesmas avaliações para o PES, a comparação fica prejudicada. Considerando que o PES pode ser utilizado em rações como aditivo em baixas quantidades, a sua composição bromatológica não traz nenhuma restrição para a utilização com essa finalidade.

A atividade de lipase do PES foi de 20,24 U mL<sup>-1</sup>, enquanto que na farinha de yacon sem fermentação a atividade foi de 14,86 U mL<sup>-1</sup>, ou seja, uma diferença de 5,38 U mL<sup>-1</sup>. Considerando que a farinha de yacon tem baixa (RODRIGUES et al., 2011; PADILHA et al., 2012) ou nula (Tabela 2) quantidade de lipídeos, também demonstra que a lipase foi produzida também pelo fungo durante a fermentação de forma constitutiva.

A presença de lipase no PES, embora baixa (20,24 U mL<sup>-1</sup>), é interessante do ponto de vista da nutrição animal, principalmente no caso de animais jovens, que apresentam sistema enzimático imaturo e baixa eficiência em digerir lipídeos (PUGH, 1993).

A atividade antioxidante, mensurada pela porcentagem de redução do DPPH, foi de 93,5% para o PES, enquanto a farinha de yacon sem fermentação apresentou 27,2% de redução do DPPH, ou seja, a fermentação com *A. niger* 40018 promoveu aumento de 66,3% na atividade antioxidante da farinha de yacon. A atividade antioxidante do yacon foi associada com a presença de 48,5  $\mu\text{g g}^{-1}$  de ácido clorogênico e 14,6  $\mu\text{g g}^{-1}$  de L-triptofano (YAN et al., 1999). Os mesmo autores observaram redução do DPPH do yacon liofilizado de 13,8% até 93,2%, dependendo do solvente, sendo que a maior redução foi com o metanol como solvente.

Do ponto de vista da nutrição animal, a atividade antioxidante do PES pode ser interessante por promover maior durabilidade às rações após as misturas, mitigando as perdas oxidativas de vitaminas lipossolúveis e lipídeos em geral, apesar de que este efeito deve ser analisado conforme o nível de inclusão do PES.

A fermentação da farinha de yacon com *A. niger* 40018 potencializou a atividade antioxidante, efeito já relatado por outros autores para o gênero *Aspergillus*. Angelova et al. (2000) observaram atividade da enzima superóxido dismutase de 60 U  $\text{mg}^{-1}$  e da enzima catalase de 10 U  $\text{mg}^{-1}$  durante o crescimento do *A. niger* 26 em meio submerso. Arora e Chandra (2011) observaram alta produção de compostos fenólicos totais, no valor de 5,68  $\text{mg mL}^{-1}$ , além do potencial de 89,8% de redução de DPPH pelo fungo *A. fumigatus* em meio submerso. Conforme demonstrado, o *Aspergillus* tem potencial para produzir vários compostos antioxidantes, o que explica a grande diferença entre a redução do DPPH para a farinha de yacon sem fermentação.

## CONCLUSÕES

Independente do micro-organismo, a farinha de yacon promove maior atividade de inulinase que bagaço de cana-de-açúcar, farelo de trigo e farelo de soja. A inulinase produzida na fermentação da farinha de yacon apresenta maior atividade e estabilidade em uma ampla gama de pH e temperatura.

A fermentação da farinha de yacon por *A. niger* 40018, *A. niger* 01 e *Fusarium* sp. 13 por 48 horas proporciona alto teor de FOS e frutose, enquanto que a fermentação da farinha de yacon por *A. flavipes* 40024 e *A. niger* 40015 por 72 horas, proporciona redução dos carboidratos.

O preparado enzimático sólido da farinha de yacon por *A. niger* 40018 possui alta atividade de lipase e antioxidante.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABD EL ATY, A.A.; WEHAIDY, H.R.; MOSTAFA, F.A. Optimization of inulinase production from low cost substrates using Plackett–Burman and Taguchi methods. **Carbohydrate Polymers**, v.102, p.261–268, 2014.

AL-DABBAGH, Y.N.; MAHMOOD, W.A. Effect of Carbon, Nitrogen and pH on Inulinase Production from Local Isolate of *Aspergillus niger*. **Zanco Journal of Pure and Applied Sciences**, v.27, p.1-8, 2015.

ANGELOVA, M.B.; PASHOVA, S.B.; SLOKOSKA, L.S. Comparison of antioxidant enzyme biosynthesis by free and immobilized *Aspergillus niger* cells. **Enzyme and Microbial Technology**, v.26, p.544-549, 2000.

AOAC - Association of Official Analytical Chemists. **Official Methods of Analysis of the AOAC international**. 17.ed. Gaithersburg, Maryland, 2000. 1200p.

ARORA, D.S.; CHANDRA, P. Antioxidant Activity of *Aspergillus fumigatus*. **International Scholarly Research Network**, v.2011, p.1-11, 2011.

AYYACHAMY, M.; KHELAWAN, K.; PILLAY, D.; PERMAUL, K.; SINGH, S. Production of inulinase by *Xanthomonas campestris* pv phaseoli using onion (*Allium cepa*) and garlic (*Allium sativum*) peels in solid state cultivation. **Letters in Applied Microbiology**, v.45, p.439-444, 2007.

BRANDT, L.A. Prebiotics enhance gut health. **Prepared Foods**, v.170, p.7-10, 2001.

CAZETTA, M.L.; MARTINS, P.M.M.; MONTI, R.; CONTIERO, J. Yacon (*Polymnia sanchifolia*) extract as a substrate to produce inulinase by *Kluyveromyces marxianus* var. bulgaricus. **Journal of Food Engineering**, v.66, p. 301-305, 2005.

CHEN, C.N.; WU, C.L.; SHY, H.S.; LIN, J.K. Cytotoxic prenylflavanones from Taiwanese propolis. **Journal of Natural Products**, v.66, p.503-506, 2003.

CHEN, H.Q.; CHEN, X.M., LI, Y.; WANG, J.; JIN, Z.Y.; XU, X.M.; ZHAO, J.W.; CHEN, T.X.; XIE, Z.J. Purification and characterisation of exo- and endo-inulinase from *Aspergillus ficuum* JNSP5-06. **Food Chemistry**, v.115, p.1206–1212, 2009.

CHEN, H.Q.; CHEN, X.M.; CHEN, T.X.; XU, X.M.; JIN, Z.Y. Optimization of solid-state medium for the production of inulinase by *Aspergillus ficuum* JNSP5-06 using response surface methodology. **Carbohydrate Polymers**, v. 86, p. 249-254, 2011.

CHI, Z.M.; ZHANG, T.; CAO, T.S.; LIU, X.Y.; CUI, W.; ZHAO, C.H. Biotechnological potential of inulin for bioprocesses. **Bioresource Technology**, v.102, p.4295-4303, 2011.

ETTALIBI, M.; BARATTI, J.C. Sucrose hydrolysis by thermostable immobilized inulinases from *Aspergillus ficcum*. **Enzyme Microbial Technology**, v.28, p. 596-601, 2001.

FAWOLE, O.B.; ODUNFA, S.A. Some factors affecting production of pectic enzymes by *Aspergillus niger*. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v.52, p.223–227, 2003.

FLORES-GALLEGOS, A.C.; CONTRERAS-ESQUIVEL, J.C.; MORLETT-CHÁVEZ, J.A.; AGUILAR, C.N. RODRÍGUEZ-HERRERA, R. Comparative study of fungal strains for thermostable inulinase production. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.119, p.421-426, 2015.

FRANCK, A.; BOSSCHER, D. **Inulin**. In: CHO, S.S.; SAMUEL, P. (Eds.) Fiber ingredients: food application and health benefits. Boca Raton: CRC Press, 2009. pp. 41-60.

GENTA, S.B.; CABRERA, W.M.; GRAU, A; SÁNCHEZ, S.S. Subchronic 4-month oral toxicity study of dried *Smallanthus sonchifolius* (yacon) roots as a diet supplement in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v.43, n.11, p.1657-1665, 2005.

GHAZI, I.; FERNÁNDEZ-ARROYO, L.; GARCIA-ARELLANO, H.; FERRER, M.; BALLESTEROS, A.; PLOU, F.J.; Purification and kinetic characterization of a fructosyltransferase from *Aspergillus aculeatus*. **Journal of Biotechnology**, v.128, n.1, p.204-211, 2007.

HERMANN, M.; FREIRE, I.; PAZOS, C. **Compositional diversity of the yacon storage root**. In: INTERNATIONAL POTATO CENTER. Impact on a changing world: Program report 1997-98. International Potato Center (CIP): Lima, p. 425-432. 1999.

KANGO, N. Production of inulinase using tap roots of dandelion (*Taraxacum officinale*) by *Aspergillus niger*. **Journal of Food Engineering**, v.85, p.473-478, 2008.

KUEHNLE, H.F.; v. DAHL, K.; SCHMIDT, F.H. Fully enzymatic inulin determination in small volume samples without deproteinization. *Nephron*, v.61, 104-107, 1992.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios de Bioquímica**. 4.ed. São Paulo: Sarvier, 2006. 1202p.

LOBO, A.; COLLI, C.; ALVARES, E.P.; FILISETTI, T.M.C.C. Effects of fructanscontaining yacon (*Smallanthus sonchifolius* Poepp & Endl.) flour on caecum mucosal morphometry, calcium and magnesium balance, and bone calcium retention in growing rats. **British Journal of Nutrition**, v.97, n.4, p.776-785, 2007.

LOPES, D.B.; FRAGA, L.P.; FLEURI, L.F.; MACEDO, G.A. Lipase and esterase - to what extent can this classification be applied accurately? **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.31, p.608-613, 2011.

MACEDO, G.A.; PARK, Y.K.; PASTORE, G.M. Partial purification and characterization of an extracellular lipase from a newly isolated strain of *Geotrichum* sp. **Journal Brazilian Society for Microbiology**, v. 28, p. 90-95, 1997.

MANRIQUE, I.; PÁRRAGA, A.; HERMANN, M. (Eds.) **Conservación y uso de la biodiversidad de raíces y tubérculos Andinos: Una década de investigación para el desarrollo (1993-2003)**. Jarabe de yacón: principios y procesamiento. Lima: Centro Internacional de La Papa, 2005. 40p.

MAZUTTI, M.; BENDER, J.P.; TREICHEL, H.; DI LUCCIO, M. Optimization of inulinase production by solid-state fermentation using sugarcane bagasse as substrate. **Enzyme and Microbial Technology**, v.39, p.56-59, 2006.

MAZUTTI, M.A.; SKROWONSKI, A.; BONI, G.; ZABO, G.L.; SILVA, M.F.; OLIVEIRA, D.; DI LUCCIO, M.; MAUGERI FILHO, F.; RODRIGUES, M.I.; TREICHEL, H. Partial Characterization of Inulinases Obtained by Submerged and Solid-State Fermentation Using Agroindustrial Residues as Substrates: A Comparative Study. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.160, p. 682-693, 2010.

NARAYANAN, M.; SRINIVASAN, B.; GAYATHIRI, A.; AYYADURAI, A.; MANI, A. Studies on the Optimization and Characterization for the Biosynthesis of Inulinase under Solid state Fermentation. **International Journal of ChemTech Research**, v.5, n.1, p.376-384, 2013.

NEAGU, C.; BAHRIM, G. Inulinases - a versatile tool for biotechnology. **Innovative Romanian Food Biotechnology**, v.9, p.1-11, 2011.

NELSON, N.A. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. **Journal of Biological Chemistry**, v.153, n.2, p.375-380, 1944.

OHTA, K.; AKIMOTO, H.; MORIYAMA, S. Fungal Inulinases: Enzymology, Molecular Biology and Biotechnology. **Journal of Applied Glycoscience**, v.51, p.247-254, 2004.

PADILHA, V.M.; SALGADO, S.M.; ROLIM, P.M.; LIVERA, A.V.S.; ANDRADE, S. A.C.; GUERRA, N.B.; GUILHERME, R.C. Chemical composition and functional properties of chocolate cakes formulated with yacon tube roots (*Smallanthus sonchifolius*). **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.71, p.301-307, 2012.

PANDEY, A.; SOCCOL, C.R.; SELVAKUMAR, P.; SOCCOL, V.T.; KRIEGER, N.; FONTANA, J.D. Recent developments in microbial inulinases. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.81, n.1, p.35-52, 1999.

PARKIN, K.L. Enzimas. In: DAMODARAN, S.; PARKIN, K.L.; FENNEMA, O.R. **Química de Alimentos de Fennema**. Porto Alegre: Artmed, 2010, p.263-342.

PHELPS, C.F. The Physical Properties of Inulin Solutions. **Biochemical Journal**, v.95, p.41-47, 1965.

PUGH, R. The scope for enzymes in commercial feed formulations. In: **BIOTECHNOLOGY IN FEED INDUSTRY**, 9, 1993, Nottingham. **Proceedings...** Nottingham: Nottingham University Press, 1993. p.369-372.

REINA, L.D.; PÉREZ-DÍAZ, I.M.; BREIDT, F.; AZCARATE-PERIL, M.A.; MEDINA, E.; BUTZ, N. Characterization of the microbial diversity in yacon spontaneous fermentation at 20°C. **International Journal of Food Microbiology**, v.203, p.35-40, 2015.

RICCA, E.; CALABRÒ, V.; CURCIO, S.; IORIO, G. The State of the Art in the Production of Fructose from Inulin Enzymatic Hydrolysis. **Critical Reviews in Biotechnology**, v.27, p.129-145, 2007.

ROBINSON, T.; NIGAM, P. Bioreactor design for protein enrichment of agricultural residues by solid state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v.13, p.197-203, 2003.

RODRIGUES, F.C.; CASTRO, A.S.B.; MARTINO, H.S.D.; FERREIRA, C.L.L.F. Farinha de yacon (*Smallanthus sonchifolius*): produção e caracterização química. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.70, n.3, p.290-295, 2011.

RUIJTER, G.J.G.; VISSER, J.; RINZEMA, A. Polyol accumulation by *Aspergillus oryzae* at low water activity in solid-state fermentation. **Microbiology**, v.150, p.1095-1101, 2004.

SELVAKUMAR, P.; PANDEY, A. Solid state fermentation for the synthesis of inulinase from *Staphylococcus* sp. and *Kluyveromyces marxianus*. **Process Biochemistry**, v.34, p.851-855, 1999.

SHARMA, A.D.; GILL, P.K. Purification and characterization of heat-stable exo-inulinase from *Streptomyces* sp. **Journal of Food Engineering**, v.79, p.1172-1178, 2007.

SILVA, A.C.; QUEIROZ, A.E.S.F.; PORTO, T.S.; SPIER, M.R.; SOCCOL, C.R.; PORTO, A.L.F.; SOUZA-MOTTA, C.M.; MOREIRA, K.A. Partial Characterization of an Inulinase Produced by *Aspergillus japonicus* URM5633. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.55, p.671-676, 2012.

SNYDER, H.E.; PHAFF, H.J. Pattern of action of inulinase from *Saccharomyces fragilis* on inulin. **The Journal of Biological Chemistry**, v.237, p.2438-2441, 1962.

TAILOR, M.J.; RICHARDSON, T. Application of microbial enzymes in food systems and in biotechnology. **Advances in Applied Microbiology**, v. 25, p.7-35, 1979.

VASCONCELOS C.M.; SILVA C.O.; TEIXEIRA L.J.Q.; CHAVES J.B.P.; MARTINO H.S.D. Determinação da fração da fibra alimentar solúvel em raiz e farinha de yacon (*Smallanthus sonchifolius*) pelo método enzimático-gravimétrico e cromatografia líquida de alta eficiência. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.69, p.188-193, 2010.

VIJAYARAGHAVAN, K.; YAMINI, D.; AMBIKA, V.; ANDSOWDAMINI, N.S. Trends in inulinase production – a review. **Critical Reviews in Biotechnology**, v.29, p.67–77, 2009.

WANG, L.; DARIN, R.; TINGYUE, G.; MOO-YOUNG, M. Effects of process parameters on heterologous protein production in *Aspergillus niger* fermentation. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v.78, p.1259–1266, 2003.

XIONG, C.; JINHUA, W; DONGSHENG, L. Optimization of solid state medium for the production of inulinase by *Kluyveromyces* S 120 using response surface methodology. **Biochemical Engineering Journal**, v.34, p.179-184, 2007.

YAN, X.; SUZUKI, M.; OHNISHI-KAMEYAMA, M.; SADA, Y.; NAKANISHI, T.; NAGATA, T. Extraction and Identification of Antioxidants in the Roots of Yacon (*Smallanthus sonchifolius*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.47, p.4711-4713, 1999.

YU, X.; GUO, N.; CHI, Z.; GONG, F.; SHENG, J.; CHI, Z. Inulinase overproduction by a mutant of the marine yeast *Pichia guilliermondii* using surface response methodology and inulin hydrolysis. **Biochemical Engineering Journal**, v.43, p. 266-271, 2009.

ZHU, Q.Y.; HACKMAN, R.M.; ENSUNSA, J.L.; HOLT R.R.; KEEN, C.L. Antioxidative activities of oolong tea. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, p.6929-6934, 2002.

## **CAPÍTULO III**

## USO DO PREPARADO ENZIMÁTICO SÓLIDO DE FARINHA DE YACON COM *ASPERGILLUS NIGER* COMO PREBIÓTICO PARA FRANGOS DE CORTE

**Resumo.** A fermentação em estado sólido (FES) de farinha de yacon com o fungo *Aspergillus niger* 40018 resulta em um preparado enzimático sólido (PES) rico em fruto-oligossacarídeos (FOS), o que confere bom potencial para utilização como prebiótico em rações. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do PES de farinha de yacon com *Aspergillus niger* 40018 sobre o desempenho, pH cecal, parâmetros bioquímicos dos lipídeos, turnover na mucosa intestinal e parâmetros microbiológicos no conteúdo cecal em frangos de corte. No primeiro experimento foram testadas as dietas basal, promotor de crescimento Enradin® (0,125 g kg<sup>-1</sup>), inulina (1%), inulina + FOS (1%), FOS (1%) e PES (1%). Não houve alteração no desempenho, pH cecal e perfil lipídico com a utilização do PES. No segundo experimento foram testadas as dietas basal, inulina + FOS (1%) e PES (1%). O PES promoveu redução mais acentuada na contagem de *Salmonella* Enteritidis (SE) após a inoculação nas aves e, conseqüentemente, o *turnover* da mucosa intestinal foi mais lento. Os *Lactobacillus* spp. isolados dos cecos das aves não apresentaram diferenças na inibição da SE. Conclui-se que o preparado enzimático sólido de farinha de yacon com *A. niger* 40018 apresenta efeito prebiótico em frangos de corte.

**Palavras-chave:** *Smallanthus sonchifolius*, fruto-oligossacarídeos, *turnover*, *Salmonella* Enteritidis.

## USE OF SOLID ENZYMATIC PREPARATION OF YACON FLOUR WITH *ASPERGILLUS NIGER* 40018 AS PREBIOTIC TO BROILER

**Abstract.** The solid state fermentation (SSF) of yacon flour with *Aspergillus niger* 40018 results in a solid enzymatic preparation (SEP) rich in fructooligosaccharides (FOS), considered a good potential to use as a prebiotic in animal diets. The aim of this work was to evaluate the effect of SEP of yacon flour with *Aspergillus niger* 40018 on performance, caecal pH, biochemical parameters, gut mucosal turnover and

microbiological parameters of caecal content of broilers. In the first trial it were tested the diets: basal, growth promoter Enradin® (0,125 g kg<sup>-1</sup>), inulin (1%), inulin+FOS (1%) and SEP (1%). There was not change on performance, caecal pH and lipidic profile with the use of SEP. In the second trial it were tested the diets: basal, inulin+FOS (1%) and SEP (1%). The SEP promoted a stronger reduction of *Salmonella* Enteritidis number after the birds inoculation, and, consequently, the mucosal gut turnover was slower. The isolated *Lactobacillus* spp. from birds caecum did not show differences on *Salmonella* Enteritidis inhibition. It is concluded that the SEP of yacon flour with *A. niger* 40018 has prebiotic effect in broilers.

**Keywords:** *Smallanthus sonchifolius*, fructooligosaccharide, turnover, *Salmonella* Enteritidis.

## INTRODUÇÃO

Os alimentos nutracêuticos e funcionais, além de suas funções primordiais de nutrir, têm também características específicas que promovem a saúde, devido aos seus compostos bioativos. Os compostos podem ser agrupados pelos mecanismos de ação, como a atividade antioxidante, antibacteriana, anti-hipercolesterolêmico, anti-inflamatória, anticarcinogênico, proteção contra osteoporose, entre outros (WILDMAN e MIKE, 2006).

Os nutracêuticos movimentam um mercado de bilhões de dólares devido à grande demanda de produtos para prevenção e tratamento de doenças. No entanto, as dificuldades de extração a partir de fontes naturais, tais como plantas e animais, restringem a produção em larga escala e encarecem o produto. Uma alternativa sustentável tem sido a produção via fermentação microbiana, que sintetiza diversos produtos como fitoquímicos, prebióticos, polissacarídeos, aminoácidos e outras biomoléculas (WANG et al., 2016).

A fermentação em estado sólido (FES) é um processo no qual os microorganismos crescem na superfície de materiais sólidos. Nesse processo, a composição do material pode ser modificada pela adição de nutrientes ou água para otimizar o meio ou para regular a atividade da água durante a fermentação (SINGHANIA et al., 2009).

Diversos tipos de micro-organismos, incluindo bactérias, leveduras e fungos, são usados na FES, mas os fungos filamentosos são mais comumente utilizados e estudados. Esta preferência ocorre devido à sua capacidade de crescer naturalmente em superfícies sólidas com baixa atividade da água e pela formação de hifas, que podem penetrar mais profundamente no substrato (PENG e CHEN, 2008; GRAMINHA et al., 2009). Os fungos filamentosos de maior interesse industrial para a produção de enzimas incluem os *Aspergillus oryzae* e *Aspergillus niger* que são considerados não tóxicos, sendo avaliados como micro-organismos seguros pelo FDA e GRAS (FAWOLE e ODUNFA, 2003; WANG et al., 2003; TAILOR e RICHARDSON, 1979).

O resultado da FES é um preparado enzimático sólido (PES) rico em diversas moléculas com atividade biológica, como enzimas, ácido cítrico, ácido láctico, 2,3 butanodiol, óleos e proteínas de organismos unicelulares (CHI et al., 2011). Dentre essas enzimas pode-se produzir inulinases (2,1- $\beta$ -D-frutano frutanohidrolase, EC 3.2.1.7) que catalisam a hidrólise do carboidrato prébiotico inulina, produzindo inulo-oligossacarídeos, frutose e glicose como principais produtos (NEAGU e BAHRIN, 2011) e  $\beta$ -D-frutossiltransferases, pois estas apresentam atividade de transferase, o que contribui para a produção do prebiótico FOS (GHAZI et al., 2007).

Os prebióticos são compostos alimentícios que chegam ao intestino grosso intactos, não sofrendo digestão pela acidez do estômago e enzimas digestivas, e servem como substrato seletivo de grupos específicos de micro-organismos benéficos à saúde, já presentes na microbiota intestinal como as bifidobactérias e os lactobacilos (ROBERFROID, 2007).

O yacon (*Smallanthus sonchifolius*) é um tubérculo conhecido como uma fonte abundante de  $\beta$  - (2 $\rightarrow$ 1) fruto-oligossacarídeos (FOS) e inulina (GOTO et al., 1995). O efeito prebiótico do yacon foi demonstrado *in vitro* pela fermentação seletiva de bifidobactérias e lactobacilos (PEDRESCHI et al., 2003). Além de suas propriedades prebióticas, é um excelente antidiabético, antioxidante e antimicrobiano (OJANSIVU et al., 2011).

Em ensaios prévios, no processo de FES utilizou-se o substrato de farinha de yacon com o fungo *Aspergillus niger* 40018 e obteve-se como resultado um PES rico em inulinases que disponibilizou maior quantidade de FOS no meio reacional.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do PES de farinha de yacon com *Aspergillus niger* 40018 sobre o desempenho, pH cecal, parâmetros bioquímicos dos lipídeos, turnover na mucosa intestinal e parâmetros microbiológicos no conteúdo cecal em frangos de corte.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Desempenho (Experimento I)

O experimento foi conduzido de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (Protocolo 156/2013-CEUA) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

O experimento foi conduzido no Laboratório de Nutrição de Aves do Departamento de Melhoramento e Nutrição Animal, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP, Campus de Botucatu. Seiscentos pintos de corte machos, da linhagem Cobb, com um dia de idade, vacinados no incubatório contra as doenças de Gumboro, Marek e Bouda aviária, foram distribuídos em delineamento inteiramente casualizados, com seis tratamentos e 4 repetições de 25 aves cada. Os tratamentos foram assim constituídos: dieta basal; dieta suplementada com promotor de crescimento Enradin®; dieta suplementada com inulina; dieta suplementada com inulina + FOS (1:1); dieta suplementada com FOS e dieta suplementada com preparado enzimático sólido (PES) contendo 33,3% de FOS e 0,06% de inulina. O promotor de crescimento foi adicionado na proporção de 0,125 g kg<sup>-1</sup> de dieta basal, à custa do inerte. Os prebióticos foram oferecidos às aves durante todo período experimental na proporção de 10 g kg<sup>-1</sup> de dieta basal.

O período de criação das aves foi dividido em 4 fases nutricionais: pré-inicial (1 a 7 dias), inicial (8 a 21 dias), crescimento (22 a 35 dias) e final (36 a 42 dias). As dietas foram formuladas para atender às exigências nutricionais propostas por Rostagno et al. (2011) (Tabela 1). O fornecimento de água e ração foi *ad libitum*.

As aves foram alojadas em um galpão experimental, com 24 boxes de 2,5 m<sup>2</sup>, com capacidade de 30 aves/boxe, na densidade de 12 aves m<sup>-2</sup>. Para o aquecimento inicial dos pintainhos, cada boxe possuía uma lâmpada infravermelha de 250 watts que foi retirada no sétimo dia de idade. A temperatura e a ventilação foram controladas

manualmente, manejando-se as cortinas laterais do galpão. O programa de luz foi constante com lâmpadas incandescentes de 60 watts até aos 21 dias de idade. Após os 21 dias foi fornecida 18 horas de luz (03:01 a 20:59h) e 6 horas de escuro (21:00 a 03:00h).

**Tabela 1.** Composições centesimais e nutricionais das dietas experimentais

Ingrediente	Pré-inicial	Inicial	Crescimento	Final
	1 a 7 dias	8 a 21 dias	22 a 35 dias	36 a 42 dias
Milho	54,40	56,40	59,06	63,17
Farelo de soja (45%)	35,45	33,23	29,63	26,46
Óleo de soja	2,10	3,16	4,20	4,15
Protenose® (60%)	2,50	2,00	2,00	1,70
Bicarbonato de sódio	0,14	0,14	0,14	0,14
Calcário calcítico	0,90	0,90	0,80	0,80
Sal comum	0,35	0,35	0,35	0,35
Fosfato bicálcico	1,95	1,65	1,65	1,15
Suplemento vitamínico-mineral <sup>1</sup>	0,40	0,40	0,40	0,40
DL-Metionina (99,0%)	0,26	0,26	0,26	0,26
L-Lisina (78,4%)	0,34	0,30	0,30	0,26
L-Treonina (98,5%)	0,15	0,15	0,15	0,10
Cloreto de Colina (60%)	0,06	0,06	0,06	0,06
Inerte <sup>2</sup> ou Prebiótico <sup>3</sup> ou P.C.	1,00	1,00	1,00	1,00
<b>TOTAL</b>	<b>100,00</b>	<b>100,00</b>	<b>100,00</b>	<b>100,00</b>
<b>Composição nutricional calculada</b>				
Energia Metabolizável (kcal/kg)	2960	3051	3151	3200
Proteína Bruta (%)	22,42	21,23	19,81	18,45
Fibra Bruta (%)	2,86	2,77	2,62	2,52
Metionina dig. (%)	0,57	0,55	0,54	0,52
Metionina+Cistina dig. (%)	0,87	0,84	0,81	0,78
Lisina dig. (%)	1,31	1,22	1,13	1,02
Treonina dig. (%)	0,90	0,86	0,81	0,72
Triptofano dig. (%)	0,24	0,23	0,21	0,19
Ác. Linoleico (%)	2,52	3,10	3,68	3,70
Cálcio (%)	0,92	0,84	0,79	0,67
Fósforo disp. (%)	0,47	0,41	0,41	0,31
Potássio (%)	0,81	0,77	0,72	0,67
Sódio (%)	0,19	0,19	0,19	0,19
Cloro (%)	0,26	0,26	0,26	0,26

<sup>1</sup>Suplemento vitamínico e mineral BRNOVA® (por kg de ração): colina, 32,000 g; vit. A, 1.750.000,000 UI; vit. D3, 500.000,000 UI; vit. E, 2.750,000 UI; vit. K3, 400,000 mg; vit. B1, 400,000 mg; vit. B2, 1.125,000 mg; vit. B6, 550,000 mg; vit. B12, 2.500,000 mcg; niacina, 8.000,000 mg; ac. fólico, 200,000 mg; ac. pantotênico, 3.000,000 mg; antioxidante BHT, 25,000 g; Salinamicina 5,000 g; selênio, 50,000 mcg; iodo, 300,000 mcg; ferro, 12,500 mg; cobre, 2.500,000 mg; manganês, 20,000 g; zinco, 15,000 g. <sup>2</sup>Caulim. <sup>3</sup>Fruto-oligossacarídeos; Inulina; Preparado enzimático sólido (farinha de Yacon fermentado com *A. niger* 40018). <sup>4</sup>Promotor de Crescimento (P.C.) Enradin®.

O desempenho foi avaliado nos períodos acumulados de 1 a 21 e 1 a 42 dias de idade. As variáveis analisadas foram: peso corporal (peso das aves de cada boxe no alojamento, aos 21 e 42 dias de idade), ganho de peso (diferença entre o peso ao final de cada período e o peso inicial no alojamento), consumo de ração (diferença entre o total de ração fornecida e as sobras colhidas no final de cada período, baseado no número médio de aves), conversão alimentar (razão entre o total de ração consumida e o ganho de peso, corrigido pelo peso das aves mortas) e mortalidade.

### **Perfil lipídico e pH do ceco**

No final do período experimental foram selecionados, dez aves por tratamento, totalizando 60 aves, com peso médio da unidade experimental. Cada ave foi considerada uma unidade experimental.

Foram coletados 5,0 mL de sangue da veia braquial das aves aos 41 dias de idades, totalizando 60 amostras de sangue. As amostras foram acondicionadas em tubos de ensaio, que foram deixadas em descanso para a formação de coágulo, e posteriormente centrifugadas durante 10 minutos a 1.500 rpm, para separação do soro. O soro foi acondicionado em microtubos de polipropileno (Eppendorf®), identificados, imediatamente congelados e enviados ao Laboratório de Bioquímica da Unidade de Pesquisa Experimental (UNIPLEX) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da UNESP do Câmpus de Botucatu, para avaliação dos seguintes parâmetros: níveis plasmáticos de triglicerídeos (mg/dL), colesterol total (mg/dL), HDL colesterol (mg/dL) e glicose (mg/dL). O VLDL e LDL colesterol foram calculados de acordo com a fórmula de Friedewald et al. (1972):

$$\text{Equação 1} \quad (\text{VLDL colesterol}) = (\text{triglicerídeos}/5)$$

$$\text{Equação 2} \quad (\text{LDL colesterol}) = (\text{colesterol total}) - (\text{HDL colesterol}) - (\text{VLDL colesterol})$$

Aos 42 dias de idades as mesmas 60 aves foram abatidas manualmente por deslocamento cervical, evisceradas e o conteúdo cecal exposto para determinação do pH. O conteúdo cecal foi colocado em frascos plásticos com 50 mL de água destilada, que em seguida foram agitados e deixados em repouso por aproximadamente 5 minutos em temperatura ambiente com posterior leitura com pHmetro digital.

Os dados de desempenho e pH do ceco foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

### **Turnover na mucosa intestinal (Experimento II)**

Foram utilizados 420 pintos de corte machos, da linhagem Cobb, com 1 dia de idade, alojados no Infectório e Laboratório de Ornitopatologia do Departamento de Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP do Campus de Botucatu. O experimento iniciou-se em 09 de março de 2015 e finalizou-se em 13 de abril de 2015.

Os tratamentos foram constituídos por três dietas: basal; suplementada com inulina + FOS (1:1); e suplementada com PES (farinha de yacon com *A. niger* 40018), contendo 33,3% de FOS e 0,06% de inulina. Os tratamentos foram escolhidos de acordo com os resultados que não prejudicaram o desempenho no experimento I.

O período de criação foi dividido nas fases inicial (1 a 21 dias de idade) e crescimento (22 a 35 dias de idade), para se obter menor variação nos sinais isotópicos das dietas. As dietas foram formuladas para atender às exigências nutricionais propostas por Rostagno et al. (2011) (Tabela 2). O fornecimento de água e ração foi *ad libitum*.

Os pintos foram obtidos de matrizes que estavam recebendo dietas compostas predominantemente por plantas do ciclo fotossintético C4. Estes, ao nascerem, possuíam em seus tecidos corporais sinais isotópicos de  $^{13}\text{C}$  semelhantes a esta dieta ( $\delta^{13}\text{C} = -19,31 \text{ ‰}$ ). Após o alojamento, para avaliar o *turnover* na mucosa intestinal, os pintos de um dia de idade receberam dietas compostas predominantemente por plantas do ciclo C3, possuindo sinal isotópico de  $^{13}\text{C}$  diferente das dietas C4 fornecidas às matrizes.

Com 21 dias de idade, todas as aves foram desafiadas com *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorotipo Enteritidis fagotipo 4, isolada de fígado de matrizes pesadas, sorotipada pelo Instituto Adolfo Lutz em São Paulo-SP, mutante resistente ao ácido nalidíxico (Nal) e rifampicina (Rif). Os inóculos foram constituídos de culturas da amostra de *S. Enteritidis* em caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) incubados a 37°C por 24 horas. Os inóculos foram administrados através de depósito direto no esôfago/inglúvio, com pipeta automática na quantidade de 0,5 mL/ave ( $10^{8,09}$  UFC mL<sup>-1</sup>).

Após o desafio, no 21º dia de idade, as aves receberam as dietas compostas predominantemente por plantas do ciclo C4, que possuem sinal isotópico de 13C diferentes da dieta na fase inicial. A mudança na composição da dieta objetivou provocar nova alteração no sinal isotópico para captar o *turnover* da mucosa intestinal após o desafio.

**Tabela 2.** Composições centesimais e nutricionais das dietas experimentais

Ingrediente	1 a 21 dias de idade	22 a 42 dias de idade
	Predominantemente C <sub>3</sub>	Predominantemente C <sub>4</sub>
Milho	-	62,080
Quirera de Arroz	55,200	-
Farelo de soja (45%)	33,130	26,915
Óleo de soja	3,690	3,805
Protenose® (60%)	2,500	2,400
Bicarbonato de sódio	0,030	0,140
Calcário calcítico	0,820	0,800
Sal comum	0,460	0,350
Fosfato bicálcico	1,920	1,300
Suplemento vitamínico-mineral <sup>1</sup>	0,40	0,40
DL-Metionina (99,0%)	0,290	0,250
L-Lisina (78,4%)	0,360	0,360
L-Treonina (98,5%)	0,140	0,140
Cloreto de Colina (60%)	0,060	0,060
Inerte <sup>2</sup> ou Prebiótico <sup>3</sup>	1,000	1,000
<b>TOTAL</b>	<b>100,00</b>	<b>100,00</b>
<b>Composição nutricional calculada</b>		
Energia Metabolizável (kcal/kg)	3005	3174
Proteína Bruta (%)	21,80	19,10
Fibra Bruta (%)	2,06	2,54
Metionina dig. (%)	0,60	0,52
Metionina+Cistina dig. (%)	0,86	0,79
Lisina dig. (%)	1,29	1,12
Treonina dig. (%)	0,82	0,77
Triptofano dig. (%)	0,25	0,19
Ác. Linoleico (%)	3,50	3,50
Cálcio (%)	0,70	0,70
Fósforo disp. (%)	0,34	0,34
Potássio (%)	0,68	0,68
Sódio (%)	0,19	0,19
Cloro (%)	0,26	0,26

<sup>1</sup>Suplemento vitamínico e mineral BRNOVA® (por kg de ração): colina, 32,000 g; vit. A, 1.750.000,000 UI; vit. D3, 500.000,000 UI; vit. E, 2.750,000 UI; vit. K3, 400,000 mg; vit. B1, 400,000 mg; vit. B2, 1.125,000 mg; vit. B6, 550,000 mg; vit. B12, 2.500,000 mcg; niacina, 8.000,000 mg; ac. fólico, 200,000 mg; ac. pantotênico, 3.000,000 mg; antioxidante BHT, 25,000 g; Salinamicina 5,000 g; selênio, 50,000 mcg; iodo, 300,000 mcg; ferro, 12,500 mg; cobre, 2.500,000 mg; manganês, 20,000 g; zinco, 15,000 g.  
<sup>2</sup>Caulim. <sup>3</sup>Fruto-oligossacarídeos; Inulina; Preparado enzimático sólido (farinha de Yacon fermentado com *A. niger* 40018).

Para as análises isotópicas foram realizados abates aos 0; 0,5; 1; 1,5; 2; 3; 4; 6; 8; 10; 14; 21; 21,5; 22; 22,5; 23; 23,5; 24; 25; 27; 28; 30; 32 e 35 dias de idade, sendo que foram tomadas aleatoriamente oito aves por tratamento aos 0; 0,5; 1; 1,5; 21; 21,5; 22; 23; 25 e 28 dias de idade; nas demais datas foram utilizadas quatro aves por tratamento. As aves foram sacrificadas por deslocamento da articulação crânio - cervical, das quais foram colhidas amostras de mucosa do intestino delgado (na altura do duodeno) por meio de raspagem com lâminas histológicas de vidro. As amostras foram acondicionadas em frascos graduados de 1,0 mL, identificadas e imediatamente congeladas a  $-18^{\circ}\text{C}$  até a sua preparação para as análises isotópicas. As coletas foram concentradas nos primeiros dias de vida devido à maior velocidade na diluição isotópica do  $^{13}\text{C}$  nos tecidos durante essa fase (HOBSON e CLARK, 1992). Cada ave foi considerada uma repetição.

As análises isotópicas foram realizadas no Centro de Isótopos Estáveis Ambientais do Instituto de Biociências (CIEA/IBB) da UNESP, Campus de Botucatu. As amostras foram descongeladas, liofilizadas, homogeneizadas e pesadas alíquotas de 50 a 70  $\mu\text{g}$  em cápsulas de estanho, introduzidas no espectrômetro de massa e queimadas quantitativamente para obtenção de  $\text{CO}_2$  e determinação das razões isotópicas de carbono.

A determinação da composição isotópica foi realizada com um espectrômetro de massa DELTA-S (Finnigan Mat) acoplado ao Analisador Elementar (EA1108 CHN), conforme método descrito por Ducatti et al. (1979).

Os resultados foram expressos em notação  $\delta^{13}\text{C}$ , em relação ao padrão *Peedee Belemnite* (PDB), com erro de análise da ordem de 0,2‰, pela equação abaixo:

$$\delta^{13}\text{C}_{(\text{amostra, padrão})} = [(R_{\text{amostra}}/R_{\text{padrão}}) - 1]$$

Onde:  $\delta^{13}\text{C}$  = enriquecimento relativo da razão  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  da amostra em relação ao padrão PDB. Adimensional; R = razão isotópica ( $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ) da amostra e do padrão. Adimensional.

Para mensurar a velocidade de substituição do carbono da mucosa intestinal, foi empregada a função exponencial do tempo expressa pela equação abaixo (Ducatti et al., 2002):

$$\delta^{13}\text{C}(t) = \delta^{13}\text{C}(f) + [\delta^{13}\text{C}(i) - \delta^{13}\text{C}(f)]e^{-(k+m)t}$$

Onde:  $\delta^{13}\text{C}(t)$  = enriquecimento isotópico do tecido em qualquer tempo (t). Adimensional;  $\delta^{13}\text{C}(f)$  = enriquecimento isotópico do tecido no patamar de equilíbrio, ou condição final. Adimensional;  $\delta^{13}\text{C}(i)$  = enriquecimento isotópico do tecido, na condição inicial. Adimensional; k = constante de crescimento em unidades de tempo<sup>-1</sup>; m = constante de *turnover* metabólico em unidades de tempo<sup>-1</sup>; t = tempo (em dias) desde a substituição da ração.

O tempo (T) para ocorrer a substituição dos átomos iniciais pelos átomos finais foi determinada com a equação abaixo, na qual o valor de f (átomos trocados) varia de 0 a 0,9999. Para o cálculo de meia vida, f assume o valor de 0,5:

$$T = -1/(k+m) \ln(1-f)$$

Onde: T = meia vida em unidade de tempo (dias); ln = logaritmo natural; k = constante de crescimento em unidades de tempo<sup>-1</sup>; m = constante de turnover metabólico em unidades de tempo<sup>-1</sup>;

A taxa de crescimento (constante k) requerida na equação acima foi calculada com a derivação de equação de crescimento exponencial:

$$M = M_0 \times e^{kt}$$

Onde: k: constante de crescimento em unidades de tempo<sup>-1</sup>; M<sub>0</sub>: peso médio inicial dos frangos; M: peso da ave no dia da coleta; t: tempo (em dias) desde a substituição da ração.

Como k+m foi obtido pela análise isotópica e k pela curva exponencial de crescimento, m foi calculado por subtração simples.

### **Parâmetros Microbiológicos**

Para avaliar os parâmetros microbiológicos foram utilizadas 144 aves dentre as utilizadas na avaliação do *turnover* da mucosa intestinal, com 21 dias de idade, alojadas no Infectório e Laboratório de Ornitopatologia do Departamento de Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP, Campus de Botucatu.

### **Coleta de *Lactobacillus spp.* e *Bifidobacterium spp.***

Aos 21 dias coletou-se o conteúdo cecal de 24 aves saudáveis, anteriormente ao desafio com *Salmonella* Enteritidis (SE). Para esta avaliação foi utilizado o delineamento de blocos casualizados, com oito repetições de uma ave. A identificação

dos gêneros foi baseada nas características morfológicas e fisiológicas para o gênero *Lactobacillus* spp. e *Bifidobacterium* spp. Para isso realizou-se o plaqueamento bacteriano em ágar de *Man Rugosa Sharpe* (MRS), cultivados em jarra de anaerobiose contendo o sistema Anaerobac, com incubação a 37°C por 48 horas. Posteriormente, as colônias de cada gênero foram submetidas às provas de coloração de Gram (PELCZAR et al., 1981), teste de catalase (SHARPE, 1981), produção de gás em glicose (COLLINS e HARTLEIN, 1982) e produção de sulfeto de hidrogênio (H<sub>2</sub>S) em açúcar *triple sugar iron* (TSI), conforme Sneath et al. (1986).

As bactérias caracterizadas como bacilos gram-positivos foram submetidas à confirmação do gênero *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* através da Técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), utilizando-se o kit de extração mini spin DNA (KASVI®) na extração do DNA e os seguintes *primers* LbLMA1-rev 5'-CTC AAAACTAAACAA AGTTTC-3' e R16-1 5'-CCTGTACACACCAGCCCGTCA-3' para *Lactobacillus* (DUBERNET et al., 2002), e 5'-GGGTGGTAATGCCGGATG-3' e 5'-CCACCGTTACACCGGGAA-3' para *Bifidobacterium* (KOK et al., 1996).

Para a reação de *Lactobacillus* foram utilizados 25 pmol de cada *primer*, 12,5 µl de *GoTaq Green Master Mix* (Promega®), 2,5 µl de água ultrapura e 5 µl de amostra de DNA, totalizando 25 µl. A amplificação foi realizada em um Termociclador (*Eppendorf*®) tendo início com 94°C por 3 minutos para desnaturação, seguindo com temperatura de anelamento a 53°C por 1 minuto, 72°C por 15 minutos para extensão, seguido por 30 ciclos a 94°C por 45 segundos, 53°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto e 30 segundos (DUBERNET et al., 2002).

Para a reação de *Bifidobacterium* foram utilizados 10 pmol de cada *primer*, 12,5 µl de *GoTaq Green Master Mix* (Promega®), 5,5 µl de água ultrapura e 5 µl de amostra de DNA, totalizando 25 µl. A amplificação foi realizada em um Termociclador (*Eppendorf*®) tendo início com 1 ciclo de 94°C por 3 minutos para desnaturação, seguindo com 44 ciclos na temperatura de anelamento a 55°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto e 72°C por 10 minutos para extensão final (ALLEGRETTI, 2009). Alíquotas de 10 µl dos produtos amplificados foram submetidas à eletroforese com posterior visualização sob luz ultravioleta.

### **Avaliação *in vitro* da atividade antimicrobiana**

As amostras de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* foram processadas através do método *spot on the lawn* frente ao micro-organismo indicador *Salmonella enterica*, subespécie *enterica* sorotipo Enteritidis fagotipo 4 (SE).

As amostras de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* foram semeadas em caldo MRS, incubadas a 37°C por 48 horas em jarras de anaerobiose com gerador de anaerobiose. Posteriormente, 10 µl dessas culturas foram adicionadas (forma de pontos) em placas de Petri contendo ágar MRS para *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*. Após sua completa secagem, as placas foram novamente alocadas nas jarras de anaerobiose para incubação a 38°C por 24 horas. O micro-organismo indicador (SE) foi semeado em tubos contendo 5 mL de caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) e incubado a 38°C por 12 horas. Posteriormente, foram transferidos 200 µL dessa cultura para novos tubos contendo 20 mL de caldo BHI acrescido de 0,75% de ágar-ágar, previamente preparado e mantido em banho-maria a 45°C (SANTOS, 1993). Esse preparado foi vertido cuidadosamente nas placas incubadas anteriormente com as amostras de *Lactobacillus* ou *Bifidobacterium*, após a completa solidificação da camada superior, as placas foram novamente incubadas.

A inibição do crescimento de SE por *Lactobacillus* ou *Bifidobacterium* foi avaliada pelo diâmetro final da área de inibição (em mm), quando presente, correspondendo à diferença entre o halo de inibição total e o diâmetro da colônia (CHATEAU et al., 1993).

Os dados de diâmetro de inibição foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

### **Contagem de *Salmonella* Enteritidis (SE)**

Para esta avaliação foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado em parcelas subdivididas, sendo as parcelas constituídas por cinco coletas e as subparcelas pelas três dietas experimentais, com oito repetições de uma ave cada. Para contagem de SE foram sacrificadas oito aves por tratamento aos 21,5; 22; 23; 25 e 28 dias de idade, totalizando 120 aves sacrificadas. Para obtenção do conteúdo cecal desses animais, o ceco foi aberto, o conteúdo foi pesado e diluído em solução salina fosfatada tamponada (PBS) 0,1%, na proporção de 1:10, obtendo-se a diluição 10<sup>-1</sup>. As demais diluições

foram obtidas com diluições decimais seriadas, com posterior plaqueamento de 0,1mL do conteúdo em duplicata de Ágar Verde Brilhante (AVB) Nal/Rif, cultivadas durante 24 horas à temperatura de 37°C. O número de UFC/grama de conteúdo cecal obtido foi convertido em  $\log_{10}$  para a interpretação dos resultados.

Os dados de contagem de SE foram submetidos à análise de variância, sendo as médias das coletas para cada dieta submetidas à análise de regressão, a 5% de probabilidade.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **Desempenho**

Na fase inicial (1-21 dias de idade) não houve efeito significativo para as variáveis de desempenho (Tabela 3), corroborando Biggs et al. (2007) que avaliaram o desempenho e observaram que não houve diferença estatística para nenhuma das variáveis quando suplementaram 8 g  $\text{kg}^{-1}$  de FOS, oligofrutose e inulina em dietas de frango de corte até aos 21 dias de idade. Possivelmente a inclusão de altos níveis de prebióticos está prejudicando a digestibilidade de alguns nutrientes. Embora os carboidratos solúveis devam passar intactos pelo trato gastrointestinal nada impede que eles, além de serem fermentados pelas bactérias, possam ser carreadores de alguns nutrientes impedindo a absorção dos mesmos. Portanto, níveis de inclusão inferiores poderiam ser mais interessantes em relação ao desempenho, como relataram Ammerman et al. (1988) que usando 3,75 g  $\text{kg}^{-1}$  de FOS observaram melhora no ganho de peso de frangos de corte.

No entanto, em todo o período experimental, de 1-42 dias de idade, o uso de FOS aumentou significativamente o consumo comparado com a dieta basal. Yusrizal e Chen (2003) também observaram o aumento do consumo e das demais variáveis de desempenho como o uso de 10 g  $\text{kg}^{-1}$  de FOS, mas ao compararem machos e fêmeas, apenas as fêmeas apresentaram melhora no desempenho.

Não houve diferença entre as dietas para o ganho de peso (Tabela 3). Mesmo havendo maior consumo de ração, para as aves que receberam 10 g  $\text{kg}^{-1}$  de FOS, não ocorreu maior ganho de peso, pois possivelmente o FOS inibiu a absorção de gordura e mesmo as rações sendo isoenergéticas a ingestão de ração foi aumentada devido à regulação energética.

A inclusão de 6% de parte aérea de chicória apresentou maior ganho de peso e menor conversão alimentar de frangos de corte em relação à dieta basal e menor conversão alimentar em relação à inclusão de 6% de inulina comercial proveniente de raízes de chicória (LIU et al., 2011). A inclusão de 12% de parte aérea de chicória não alterou o ganho de peso, mas aumentou a conversão alimentar. Os autores discutem que apesar das dietas com inclusões de chicória apresentarem maior teor de fibras, tanto solúveis quanto insolúveis, não houve grandes alterações na viscosidade da digesta, pelo fato de não ter alterado o consumo e o desempenho das aves.

**Tabela 3.** Valores médios de peso inicial, consumo de ração, ganho de peso médio, peso final e conversão alimentar (CA) de frangos de corte, segundo os tratamentos nos períodos de 0 a 21 e 0 a 42 dias de idade.

Tratamento	Peso inicial	Consumo	Peso final	Ganho peso	CA
	(g/ave)	(g/ave)	(g/ave)	(g/ave)	
----- 0 a 21 dias -----					
Basal	46,1	905	728	682	1,33
Antibiótico	46,0	905	732	686	1,33
PES	46,3	925	739	693	1,34
Inulina	46,2	938	746	700	1,34
Inulina+FOS	45,7	986	776	730	1,35
FOS	46,4	987	809	763	1,30
CV (%)	0,97	6,77	6,47	6,88	4,55
P-valor	0,373	0,271	0,191	0,192	0,875
----- 0 a 42 dias -----					
Basal		3790 b	2843	2797	1,35 b
Antibiótico		3859 ab	2854	2808	1,38 ab
PES		3881 ab	2875	2828	1,37 ab
Inulina		3989 ab	2903	2857	1,40 ab
Inulina+FOS		4030 ab	2905	2860	1,41 ab
FOS		4238 a	2960	2914	1,46 a
CV (%)		4,81	3,68	3,73	2,76
P-valor		0,047	0,669	0,670	0,018

Médias seguidas de letras distintas na coluna diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. CV: coeficiente de variação. P: probabilidade de F.

### pH do ceco

O pH da digesta cecal dos frangos alimentados com a dieta basal foi superior aos suplementados com inulina, não se diferenciando dos demais (Tabela 4).

Os efeitos do uso de inulina e frutooligossacarídeos pode estar relacionado tanto com a mudança do perfil de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), quanto ao aumento dos mesmos, por isso, a diminuição do pH. Este efeito também está relacionado com a hiperplasia da mucosa intestinal e aumento da espessura da parede tanto no intestino delgado quanto no ceco (REMESY et al., 1992).

**Tabela 4.** Valores médios de pH do conteúdo do ceco de frangos de corte aos 42 dias de idade.

Tratamento	pH Ceco
Basal	6,49 a
Antibiótico	6,11 ab
PES	6,33 ab
Inulina	5,88 b
Inulina+FOS	6,26 ab
FOS	6,24 ab
CV (%)	6,78
P-valor	0,071

Médias seguidas de letras distintas diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. CV: coeficiente de variação.

Os micro-organismos benéficos, como os *Lactobacillus* spp. e *Bifidobacterium* spp., metabolizam os carboidratos tipo frutanos e essa fermentação seletiva proporciona redução do pH. Pesquisas sugerem que dietas contendo inulina e frutooligossacarídeos modificam a fermentação no intestino grosso podendo reduzir o pH da digesta cecal de animais monogástricos (BLOTTIERES et al., 1999; JOZEFIK et al., 2004; LEVRAT et al., 1991; MEEHYE, 2002). Corroborando os autores supracitados, observou-se efeito significativo na redução do pH com o uso de inulina comparada à dieta basal. Nos tratamentos FOS e Inulina + FOS não houve efeito significativo quanto à redução do pH. Rehman et al. (2008) suplementou 1% de inulina em frangos de corte, porém não observou efeito significativo na concentração total dos AGCC na digesta do ceco responsáveis pela redução do pH. Sendo assim, a redução do pH só é possível se os micro-organismo utilizarem as fontes prebióticas, caso contrario não haverá mudanças no pH do intestino grosso.

Rebolé et al. (2010) observaram aumento da produção de ácido butírico e lático do conteúdo cecal de frangos alimentados com 1% e 2% de inulina, enquanto que o ácido lático, ácido propiônico e o pH cecal ficaram inalterados. Esse resultado

demonstra que mesmo que não ocorram grandes variações no pH do ceco, pode haver alterações na produção de AGCC.

### Perfil lipídico

Não houve diferença significativa para nenhum dos parâmetros do perfil lipídico do soro sanguíneo (Tabela 5). Yusrizal e Chen (2003) avaliaram a suplementação de 1% de inulina em dietas de frango de corte observaram redução significativa dos níveis de colesterol sérico, tanto para machos quanto para fêmeas, sugerindo que a redução nos níveis de colesterol pode ter sido devido aos *Lactobacillus* spp. estarem assimilando os lipídios ou a redução do colesterol plasmático se daria por uma menor absorção, à medida que há uma co-precipitação do colesterol juntamente com os ácidos biliares desconjugados. Chen et al. (2005) também observaram redução do colesterol sérico em galinhas poedeiras alimentadas com 1% de inulina (GP 3-65) e 1% FOS (GP 2-8).

**Tabela 5.** Perfil lipídico do soro sanguíneo de frangos de corte aos 42 dias de idade.

Tratamento	Colesterol (mg/dL)	Triglicerídeos (mg/dL)	HDL (mg/dL)	Glicose (mg/dL)	VLDL (mg/dL)	LDL (mg/dL)
Basal	133	112	91	259	22	20
Antibiótico	136	110	92	263	22	22
PES	130	99	91	266	20	19
Inulina	133	104	92	261	21	20
Inulina+FOS	138	109	95	261	22	20
FOS	140	92	97	258	18	25
CV (%)	10,77	27,92	11,91	4,95	27,94	37,15
P-valor	0,700	0,667	0,802	0,739	0,664	0,587

CV: coeficiente de variação.

Velasco et al. (2010) avaliaram a adição de inulina (5-10 g kg<sup>-1</sup> de dieta basal) em dietas com duas fontes de óleo (óleo de palma e girassol) para frangos de corte e observaram redução do teor hepático de lipídios totais e colesterol total (apenas na última fase das aves alimentadas com dietas contendo óleo de girassol) e diminuição da concentração de triglicerídeos do soro sanguíneo e colesterol VLDL.

Shang et al. (2010) avaliaram níveis de 0 a 2% de inclusão de inulina em dietas de galinhas poedeiras e não observaram redução de colesterol LDL e HDL em nenhum dos níveis de inclusão, corroborando os resultados do presente estudo.

Como exposto, a literatura é bastante contraditória quanto à modulação lipídica com o uso de prebióticos. No entanto, observamos que o efeito de redução lipídica está relacionado aos níveis de inclusão dos frutanos, níveis energéticos das rações, fontes energéticas, sexo e idade dos animais, entre outras variáveis. Ortuño et al. (2009) ao avaliarem dietas com teor elevado de gordura contendo frutanos com diferentes graus de polimerização (GP) em ratos, não observaram mudanças no perfil lipídico, à exceção do HDL, que apresentou crescente aumento com o uso de frutanos até aos 75 dias de idade.

### **Parâmetros Microbiológicos**

Ambos os tratamentos prebióticos apresentaram redução na contagem de SE no ceco dos frangos (Tabela 6 e Figura 1). Na dieta basal, a contagem de SE apresentou comportamento quadrático em função do tempo após a inoculação, com máxima contagem estimada em 1,83 dias após a inoculação. Para as dietas com PES e com Inulina+FOS, houve redução linear da contagem de SE, contudo com a inclusão do PES este efeito foi mais pronunciado, com coeficiente angular da reta de -0,59, contra -0,35 da inulina+FOS. Nas comparações pontuais dentro de cada coleta, observa-se que no início e no final as contagens não se diferenciam. Contudo, aos 2 e 3 dias após a inoculação a dieta com PES apresentou menor contagem de SE.

Fukata et al. (1999) também observaram efeito do prebiótico FOS na contagem de SE em cecos de frangos desafiados aos 21 dias de idade. Entretanto, os autores avaliaram em períodos diferentes, sendo que o efeito prebiótico foi efetivo desde o primeiro dia após o desafio até a última avaliação, aos 14 dias.

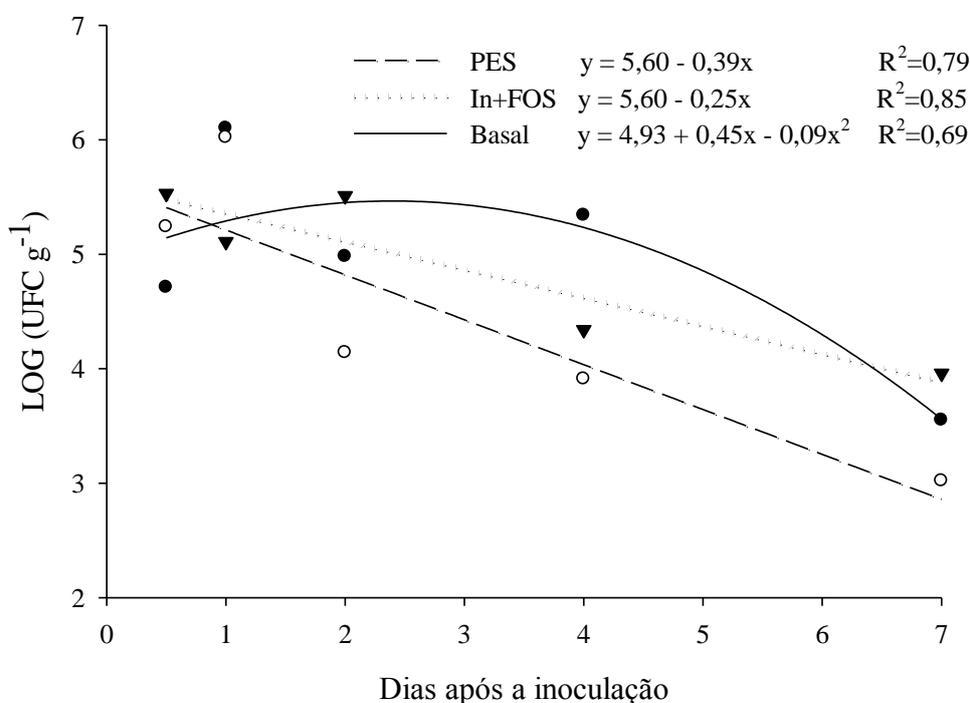
Bailey et al. (1991) observaram que o FOS reduziu o crescimento de *Salmonella typhimurium in vitro*. Ao avaliarem o FOS *in vivo*, os autores não observaram efeito significativo do FOS isoladamente, todavia, quando suplementado com uma cultura de exclusão competitiva (preparado do conteúdo cecal de aves livres de *Salmonella*), o FOS foi efetivo.

Das 24 amostras coletadas do conteúdo cecal antes do desafio com SE, foram isoladas 221 colônias bacterianas, dentre essas, 138 colônias não identificadas como *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* reprovaram nos testes morfológicos (teste de Gram) e bioquímicos (catalase, KOH, glicose e TSI). As 83 colônias isoladas foram submetidas ao teste de identificação de gênero pela técnica de PCR, nas quais 53 colônias foram

identificadas como *Lactobacillus* e 19 como *Bifidobacterium*, sendo posteriormente utilizadas no ensaio de inibição de SE.

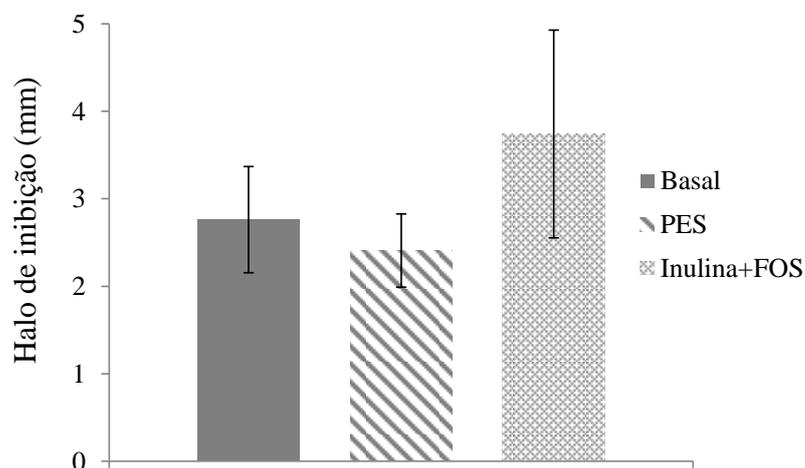
**Tabela 6.** P-valor da ANAVA da contagem de *Salmonella* Enteritidis no ceco de frangos de corte em função das coletas e dietas, basal e suplementadas com preparado enzimático sólido (PES) e inulina+FOS (In+FOS).

FV	P-valor
Coletas	<0,001
Dietas	0,1379
Coletas x Dietas	0,0651
Desdobramento de Coletas dentro de Dietas	
<b>Basal</b>	
Linear	**
Quadrática	*
<b>PES</b>	
Linear	**
Quadrática	ns
<b>In+FOS</b>	
Linear	**
Quadrática	ns



**Figura 1.** Contagem de *Salmonella* Enteritidis no ceco de frangos de corte em função das dietas basal e suplementadas com preparado enzimático sólido (PES) e inulina+FOS (In+FOS).

Não houve diferença significativa ( $P = 0,390$ ) entre os tratamentos para o halo de inibição de SE pelos *Lactobacillus* sp. isolados do ceco (Figura 2), possivelmente pela alta variabilidade dos dados, demonstrada pelos altos valores de erro padrão da média. Contudo, as dietas contendo Inulina+FOS tenderam a apresentar maior halo de inibição, o que poderia ser estatisticamente superior caso a variabilidade dos dados fosse menor. Esse resultado demonstra que os *Lactobacillus* sp. isolados do ceco dos frangos com as diferentes dietas possuem similar capacidade de inibir a SE, ou seja, o efeito redutor da contagem de SE no ceco pelas dietas com PES e Inulina+FOS (Figura 1), deve estar mais relacionado com a quantidade de *Lactobacillus* sp. produzidos.



**Figura 2.** Halo de inibição de *Salmonella* Enteritidis por *Lactobacillus* sp. isolados do ceco de frangos de corte em função das dietas basal ( $n=7$ ) e suplementadas com preparado enzimático sólido (PES) ( $n=18$ ) e inulina+FOS ( $n=9$ ). As barras verticais representam o erro padrão da média.

Barros et al. (2009) observaram halos de inibição de *Lactobacillus reuteri* em estirpes de *Salmonella* de 6,3 até 10,8 mm, enquanto que para *Lactobacillus salivarius* os halos foram de 5,5 até 10,4 mm, ambos isolados do ceco de frangos. Lima et al. (2007) observaram halos de inibição de *Salmonella* similares aos do presente experimento, com valores de 2,38 a 2,71 mm, dependendo da espécie de *Lactobacillus*, todos isolados do ceco de frangos.

Van Coillie et al. (2007) identificaram 186 cepas de *Lactobacillus* da cloaca e vagina de galinhas de postura, sendo que destas 53 foram testadas quanto à sua inibição de 20 cepas de *Salmonella*, e foram observados halos de inibição de 0,0 a 7,3 mm. Para

a mesma cepa de *Lactobacillus*, os autores não observaram grandes variações entre as 20 cepas de *Salmonella*.

Apesar de não haver diferença entre os tratamentos (Figura 2), foram isoladas mais amostras com *Lactobacillus* dos frangos suplementados com PES na dieta (n=18), o que pode reforçar o seu potencial prebiótico.

As colônias de *Bifidobacterium* selecionadas não apresentaram efeito inibitório da SE, sendo que nenhuma explicação para tal foi proposta. Apesar do menor número de trabalhos na literatura avaliando a *Bifidobacterium*, seu efeito inibidor já foi demonstrado (OYARZABAL e CONNER, 1995; BAYOUMI e GRIFFITHS, 2012).

### **Turnover da mucosa intestinal**

Os resultados da avaliação do *turnover* da mucosa intestinal dos frangos na fase de 1 a 21 dias de idade encontram-se na Tabela 7 e Figuras 3 e 4. A taxa de crescimento (k) apresentou menores diferenças entre os tratamentos que a taxa metabólica (m), sendo assim, as diferenças nos tempos de meia vida e de 99% de troca da mucosa intestinal se devem principalmente à processos de degradação e ressíntese de tecido.

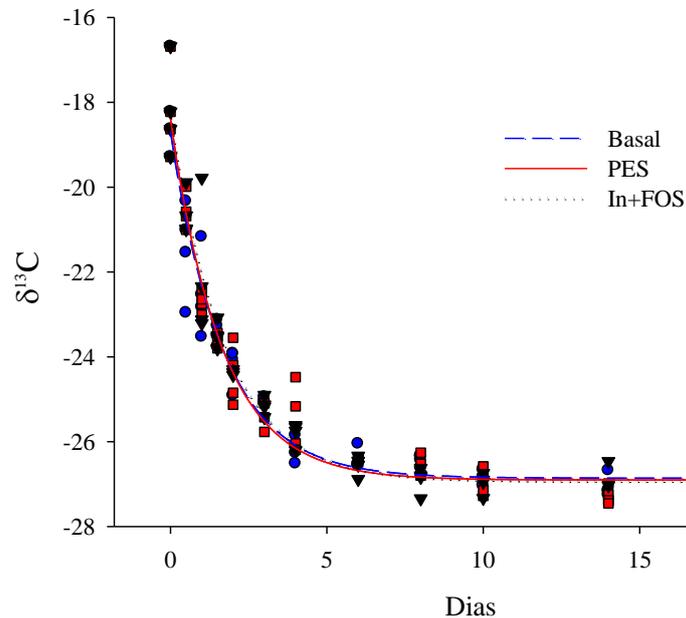
É importante notar que o tratamento Inulina+FOS apresentou a maior a taxa de crescimento (0,1442) e a menor taxa metabólica (0,4283), dessa forma, aparentemente a inulina e o FOS promoveram maior efeito trófico. Isso pode estar relacionado com a redução do pH cecal pela inulina (Tabela 4), devido à maior produção de ácidos graxos voláteis, sendo que estes são importantes para o trofismo dos colonócitos, especialmente o ácido butírico (KLURFELD, 1999). Seguindo esta linha de raciocínio, o efeito do PES foi contrário ao esperado, já que este promoveu efeito prebiótico assim como a dieta com Inulina+FOS (Figura 1), mas apresentou menor valor da taxa de crescimento (0,1341), muito similar à dieta basal, e maior valor da taxa metabólica (0,4731). Dessa forma, pode-se conjecturar que o PES tenha causado alguma irritabilidade sobre a mucosa. Devido à maior constante de *turnover* (k+m) do PES, o tempo de troca dos tecidos, tanto considerando a meia vida (1,14) quanto 99% de troca (7,58), foi menor neste tratamento.

**Tabela 7.** Equações de diluição isotópica do carbono-13 da mucosa intestinal e de crescimento de frangos de corte com suas respectivas constantes de *turnover* tecidual ( $k + m$ ), taxa de crescimento ( $k$ ), taxa metabólica ( $m$ ) do carbono-13, tempo de meia vida e de 99% de troca de tecido no período de 0 a 21 dias de idade em função das dietas basal e suplementadas com preparado enzimático sólido (PES) e inulina+FOS.

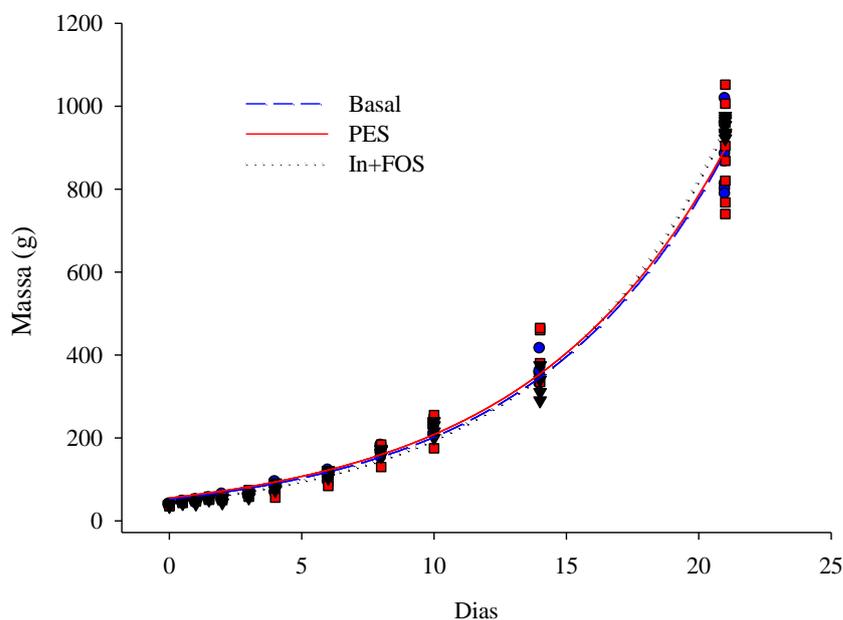
Tratamento	Diluição isotópica	R <sup>2</sup>	Crescimento	R <sup>2</sup>
Basal	$\delta^{13}\text{C} = -26,86 + 8,18e^{-0,5888t}$	0,95	$M = 51,43e^{0,1357t}$	0,99
PES	$\delta^{13}\text{C} = -26,91 + 8,51e^{-0,6071t}$	0,96	$M = 53,76e^{0,1341t}$	0,97
Inulina+FOS	$\delta^{13}\text{C} = -26,94 + 8,58e^{-0,5725t}$	0,96	$M = 45,86e^{0,1442t}$	0,99

Tratamento	$k + m$ (d <sup>-1</sup> )	$k$ (d <sup>-1</sup> )	$m$ (d <sup>-1</sup> )	Meia-Vida (T, dias)	99% de troca (T, dias)
Basal	0,5888	0,1357	0,4531	1,18	7,82
PES	0,6071	0,1341	0,4731	1,14	7,58
Inulina+FOS	0,5725	0,1442	0,4283	1,21	8,04



**Figura 3.** Curvas de diluição isotópica do carbono da mucosa intestinal de frangos de corte de 0 a 21 dias de idade, em função das dietas basal e suplementadas com preparado enzimático sólido (PES) e inulina+FOS (In+FOS).



**Figura 4.** Curvas de crescimento de frangos de corte de 0 a 21 dias de idade, em função das dietas basal e suplementadas com preparado enzimático sólido (PES) e inulina+FOS (In+FOS).

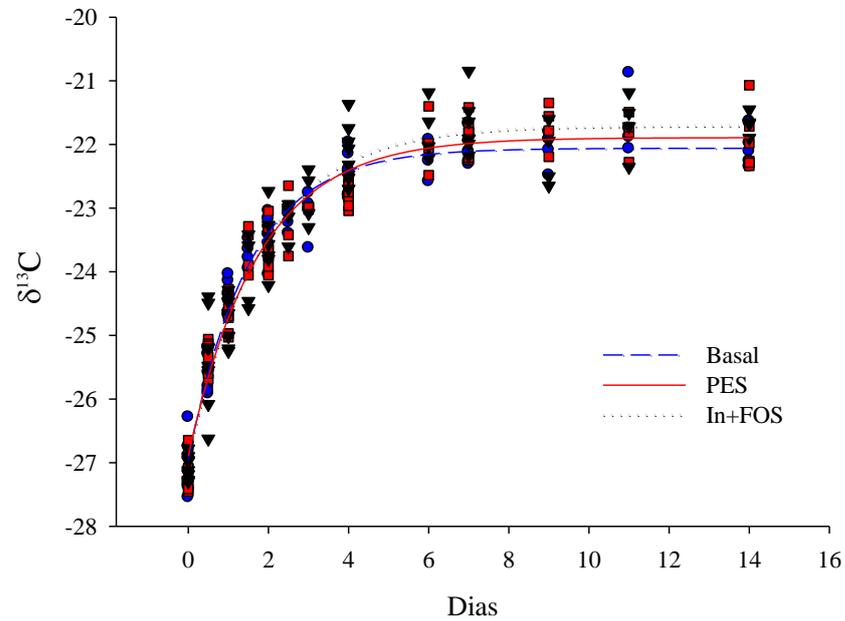
Os resultados da avaliação do *turnover* da mucosa intestinal dos frangos após o desafio com *Salmonella* Enteritidis na fase de 21 a 35 dias de idade encontram-se na Tabela 8 e Figuras 5 e 6.

**Tabela 8.** Equações de diluição isotópica do carbono-13 da mucosa intestinal e de crescimento de frangos de corte com suas respectivas constantes de *turnover* tecidual ( $k + m$ ), taxa de crescimento ( $k$ ), taxa metabólica ( $m$ ) do carbono-13, tempo de meia vida e de 99% de troca de tecido no período de 21 a 35 dias de idade em função das dietas basal e suplementadas com preparado enzimático sólido (PES) e inulina+FOS.

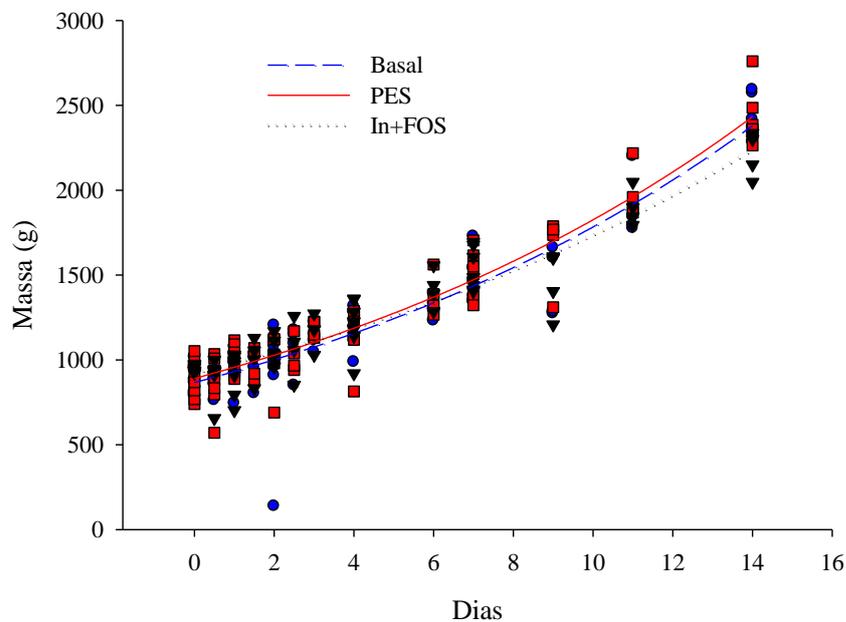
Tratamento	Diluição isotópica	$R^2$	Crescimento	$R^2$
Basal	$\delta^{13}\text{C} = -22,01 - 4,91e^{-0,6391t}$	0,96	$M = 867e^{0,0722t}$	0,88
PES	$\delta^{13}\text{C} = -21,86 - 5,00e^{-0,5661t}$	0,95	$M = 890e^{0,0718t}$	0,93
Inulina+FOS	$\delta^{13}\text{C} = -21,71 - 5,22e^{-0,5519t}$	0,94	$M = 920e^{0,0634t}$	0,90

Tratamento	$k + m$ ( $d^{-1}$ )	$k$ ( $d^{-1}$ )	$m$ ( $d^{-1}$ )	Meia-Vida (T, dias)	99% de troca (T, dias)
Basal	0,6391	0,0722	0,56693	1,08	7,21
PES	0,5661	0,0718	0,49430	1,22	8,13
Inulina+FOS	0,5519	0,0634	0,48853	1,26	8,34



**Figura 5.** Curvas de diluição isotópica do carbono da mucosa intestinal de frangos de corte de 21 a 35 dias de idade, em função das dietas basal e suplementadas com preparado enzimático sólido (PES) e inulina+FOS (In+FOS). O dia 0 no eixo das abscissas representa 21 dias de idade das aves.



**Figura 6.** Curvas de crescimento de frangos de corte de 21 a 35 dias de idade, em função das dietas basal e suplementadas com preparado enzimático sólido (PES) e inulina+FOS (In+FOS). O dia 0 no eixo das abscissas representa 21 dias de idade das aves.

Da mesma forma que na fase anterior, a taxa de crescimento (k) apresentou menores diferenças entre os tratamentos que a taxa metabólica (m). Apesar da menor diferença, a taxa de crescimento foi menor na dieta com Inulina+FOS, possivelmente por esta dieta ter promovido maior taxa de crescimento na fase anterior e ter estabilizado seu crescimento mais precocemente. A taxa metabólica apresentou resultados interessantes, pois a dieta basal promoveu valor superior às demais dietas (15% maior), o que confirma a hipótese do trabalho, pois devido às dietas com PES e Inulina+FOS eliminarem mais rapidamente a *Salmonella* Enteritidis inoculada (Figura 1), a mucosa do ceco foi menos agredida, não sendo necessária intensa multiplicação celular para se recuperar, o que ocorreu na dieta basal.

Liu et al. (2013) observaram redução da espessura da mucosa do intestino grosso de frangos com a inclusão de 6 e 12% de parte aérea de chicória desidratada na ração. Apesar disso, os autores observaram correlação positiva da espessura da mucosa com a digestibilidade total aparente dos polissacarídeos não-amídicos, fazendo com que sugerissem que as fibras afetam a morfologia intestinal mais devido ao quanto são digeridas do que pelo seu nível de inclusão. Outro aspecto interessante é que os autores avaliaram a inclusão de um material bruto às dietas, assim como o PES, sendo que a maioria dos trabalhos utilizam frutanos purificados, o que torna difícil a comparação com o PES.

## CONCLUSÕES

O preparado enzimático sólido de farinha de yacon com *A. niger* 40018 apresenta efeito prebiótico, fundamentado pela redução da contagem cecal de *Salmonella* Enteritidis e manutenção da integridade da mucosa intestinal de frangos de corte.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMMERMAN, E.; QUARLES, C.; TWINING, P.V. Broiler response to the addition of dietary fructooligosaccharides. **Poultry Science**, v.67 (Suplemento), p.46, 1988.
- BAILEY, J.S.; BLANKENSHIP, L.C.; COX, N.A. Effect of fructooligosaccharide on *Salmonella* colonization of the chicken intestine. **Poultry Science**, v.70, n.12, p.2433-2438, 1991.

BARROS, M.R.; ANDREATTI FILHO, R.L.; LIMA, E.T.; CROCCI, J.A. Avaliação in vitro da atividade inibitória de *Lactobacillus* spp., isolados do ingluvío e cecos de aves sobre *Salmonella*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.61, n.4, p.863-868, 2009.

BAYOUMI, M.A.; GRIFFITHS, M.W. In vitro inhibition of expression of virulence genes responsible for colonization and systemic spread of enteric pathogens using *Bifidobacterium bifidum* secreted molecules. **International Journal of Food Microbiology**, v.156, p.255-263, 2012.

BIGGS, P.; PARSONS C.M.; FAHEY G.C. The Effects of Several Oligosaccharides on Growth Performance, Nutrient Digestibilities, and Cecal Microbial Populations in Young Chicks. **Poultry Science**, v.86, p.2327-2336, 2007.

BLOTTIERES, H.M.; CHAMP, M.; HOEBLER, C.; MICHEL, C.; CHERBUT, C. Production and digestive effects of short chain fatty acids. **Science des Aliments**, v.19, p.269-290, 1999.

CHATEAU, N.; CASTELLANOS, I.; DESCHAMIS, A.M. Distribution of pathogen inhibition in the *Lactobacillus* isolation of a commercial probiotic consortium. **Journal of Applied Microbiology**, v.74, p.36-40, 1993.

CHEN, Y.C.; NAKTHONG, C.; CHEN, T.C. Effects of Chicory Fructans on Egg Cholesterol in Commercial Laying Hen. **International Journal of Poultry Science** v.4, n.2, p.109-114, 2005.

COLLINS, E.B.; HARTLEIN, K. Influences of Temperature on Lactobacilli of Nonfermented Acidophilus Milks. **Journal of Dairy Science**, v.65, p.883-886, 1982.

DUBERNET, S., DESMASURES, N., GUÉGUEN, M.A. Pcr-Based Method for Identification of Lactobacilli at the Genus Level. **FEMS Microbiology Letters**, v.214, p.271-275, 2002.

DUCATTI, C.; CARRIJO, A.S.; PEZZATO, A.C.; MANCERA, P.F.A. Modelo teórico e experimental da reciclagem do carbono –  $^{13}\text{C}$  em tecidos de mamíferos e aves. **Scientia Agricola**, v.59, p.29-33, 2002.

DUCATTI, C.; SALATI, E.; MATSUI, E. Método de análise da razão  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  e  $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$  em carbonatos. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.51, p.275-286, 1979.

FUKATA, T.; SASAI, K.; MIYAMOTO, T.; BABA, E. Inhibitory effects of competitive exclusion and fructooligosaccharide, singly and in combination, on *Salmonella* colonization of chicks. **Journal of Food Protection**, v.62, p.299-233, 1999.

GAO, L.; CHI, Z.; SHENG, J.; WANG, L.; LI, J.; GONG, F. Inulinase-producing marine yeasts: evaluation of their diversity and inulin hydrolysis by their crude enzymes. **Microbial Ecology**, v.54, p.722-729, 2007.

GHAZI, I.; FERNÁNDEZ-ARROYO, L.; GARCIA-ARELLANO, H.; FERRER, M.; BALLESTEROS, A.; PLOU, F.J.; Purification and kinetic characterization of a

fructosyltransferase from *Aspergillus aculeatus*. **Journal of Biotechnology**, v.128, n.1, p.204-211, 2007.

GOTO, K.; FUKAI, K.; HIKIDA, J.; NANJO, F.; HARA, Y. Isolation and structural analysis of oligosaccharides from yacon (*Polymnia sonchifolia*). **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v.59, p.2346-2347, 1995.

GRAMINHA, E.B.N.; GONCALVES, A.Z.L.; PIROTA, R.D.P.B.; BALSALOBRE, M.A.A.; SILVA, R.; GOMES, E. Enzyme production by solid-state fermentation: application to animal nutrition. **Animal Feed Science and Technology**, v.144, p.1-22, 2009.

HOBSON, K.A.; CLARK, R.G. Assessing avian diets using stable isotopes I: Turnover of  $^{13}\text{C}$  in tissues. **The Condor**, v.94, p.181-188, 1992.

JÓZEFIAK, D.; RUTKOWSKI, A.; MARTIN, S. A. Carbohydrate fermentation in the avian ceca: a review. **Animal Feed Science and Technology**, v.113, p. 1-15, 2004.

KLURFELD, D.M. Nutritional regulation of gastrointestinal growth. **Frontiers in Bioscience**, v.4, p.299-302, 1999.

KOK, R.G.; DE WAAL, A.; SCHUT, F.; WELLING, G.W.; WEENK, G.; HELLINGWERF, K.J. Specific detection and analysis of a probiotic *Bifidobacterium* strain in infant feces. **Applied and Environmental Microbiology**, v.62, p.3668–3672, 1996.

LEVRAT, M-A., REMESY, C., REMIGNE, C. High propionic acid fermentations and mineral accumulation in the cecum of rats adapted to different levels of inulin. **The Journal of nutrition**, v.121, p.1730–1737, 1991.

LIMA, E.T.; ANDREATTI FILHO, R.L.; OKAMOTO, A.S.; NOUJAIM, J.C.; BARROS, M.R.; CROCCI, A.J. Evaluation in vitro of the antagonistic substances produced by *Lactobacillus* spp. isolated from chickens. **The Canadian Journal of Veterinary Research**, v.71, p.103-107, 2007.

LIU, H.; IVARSSON, E.; LUNDH, T.; LINDBERG, J.E. Chicory (*Cichorium intybus* L.) and cereals differently affect gut development in broiler chickens and young pigs. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v.4, p.50-55, 2013.

LIU, H.Y.; IVARSSON, E.; JÖNSSON, L.; HOLM, L.; LUNDH, T.; LINDBERG, J.E. Growth performance, digestibility, and gut development of broiler chickens on diets with inclusion of chicory (*Cichorium intybus* L.). **Poultry Science**, v.90, p.815–823, 2011.

MEEHYE, K. The water-soluble extract of chicory affects rat intestinal morphology similarly to other non-starch polysaccharides. **Nutrition Research**, v.22, p.1299-1307, 2002.

NEAGU, C.; BAHRIM, G. Inulinases - a versatile tool for biotechnology. **Innovative Romanian Food Biotechnology**, v.9, p.1-11, 2011.

OJANSIVU, I.; FERREIRA, C. L.; SALMINEN, S. Yacon, a new source of prebiotic oligosaccharides with a history of safe use. **Trends in Food Science and Technology**, v.22, n.1, p.40-46, 2011.

ORTUÑO, M.A.; URBÁN, C.; CERÓN, J.J.; TECLES, F.; ALLENDE, A.; BARBERÁN, F.A.T.; ESPÍN, J.C. Effect of low inulin doses with different polymerisation degree on lipid metabolism, mineral absorption, and intestinal microbiota in rats with fat-supplemented diet. **Food Chemistry**, v.113, p.1058–1065, 2009.

OYARZABAL, O.A.; CONNER, D.E. In vitro fructooligosaccharide utilization and inhibition of *Salmonella* spp. by selected bacteria. **Poultry Science**, v.74, p.1418-1425, 1995.

PEDRESCHI, R.; CAMPOS, D.; NORATTO, G.; CHIRINOS, R.; CISNEROS-ZEVALLOS, L. Andean yacon root (*Smallanthus sonchifolius* Poepp. Endl) fructooligosaccharides as a potential novel source of prebiotics. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.51, p.5278-5284, 2003.

PELCZAR, M.J.; REID, R.; CHAN, E.C.S. **Microbiologia**. São Paulo: Mcgraw Hill, 1981. 1072 p.

PELCZAR, M.J.; REID, R.; CHAN, E.C.S. **Microbiologia**. São Paulo: McGraw Hill, 1981. p.1072.

PENG, X.W.; CHEN, H.Z. Single cell oil production in solid-state fermentation by *Microsphaeropsis* sp. from steam-exploded wheat straw mixed with wheat bran. **Bioresource Technology**, v.99, p.3885-3889, 2008.

REBOLÉ, A.; ORTIZ, L.T.; RODRÍGUEZ, M.L.; ALZUETA, C.; TREVIÑO, J.; VELASCO, S. Effects of inulin and enzyme complex, individually or in combination, on growth performance, intestinal microflora, cecal fermentation characteristics, and jejunal histomorphology in broiler chickens fed a wheat- and barley-based diet. **Poultry Science**, v.89, p.276-286, 2010.

REHMAN, H., HELLWEG, P., TARAS, D. AND ZENTEK, J., 2008. Effects of dietary inulin on the intestinal short chain fatty acids and microbial ecology in broiler chickens as revealed by denaturing gradient gel electrophoresis. **Poultry Science** 87: 783–789.

REMESY, C.; BEHR, S.R., LEVRAT, M.; DEMIGNE, C. Fiber fermentability in the rat cecum and its physiological consequences. **Nutrition Research**, v.12, p.1235-1244, 1992.

ROBERFROID, M. B. Inulin-type fructans: functional food ingredients. **Journal of Nutrition**, v.137, p.2493-2502, 2007.

ROSTAGNO, H.S.; ALBINO, L.F.T.; DONZELE, J.L.; GOMES, P.C.; OLIVEIRA, R.F.; LOPES, D.C.; FERREIRA, A.S.; BARRETO, S.L.T.; EUCLIDES, R.F. **Tabelas brasileiras para aves e suínos: composição de alimentos e exigências nutricionais**. 3.ed. Viçosa: UFV, 2011, 252p.

SANTOS, W.L.M. **Aislamiento y caracterización parcial de una bacteriocina producida por *Pediococcus* sp. 347, de origen carnico.** 1993. 294p. Tese (Doutorado) – Universidade Complutense de Madrid, Madrid, 1993.

SHANG, H.M.; HU, T.M.; LU, Y.J.; WU, H.X. Effects of inulin on performance, egg quality, gut microflora and serum and yolk cholesterol in laying hens, **British Poultry Science**, v.51, n.6, p.791-796, 2010.

SHARPE, M.E. The genus *Lactobacillus*. In: STARR, M.P.; STOLP, H.; TRUPER, H.G.; BALOWS, A.; SCHLEGEL, H.G. (Eds) **The Prokaryotes**. New York: Springer Verlag, 1981. p.1653-1679.

SINGHANIA, R.R.; PATEL, A.K.; SOCCOL, C.R.; PANDEY, A. Recent advances in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v.44, p.13-18, 2009.

SNEATH, P.H.A.; MAIR, N.S.; SHARPE, M.E. et al. (Eds) **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1986. p.1239.

VAN COILLIE, E.; GORIS, J.; CLEENWERCK, I.; GRIJSPEERDT, K.; BOTTELDOORN, N.; VAN IMMERSEEL, F.; DE BUCK, J.; VANCANNEYT, M.; SWINGS, J.; HERMAN, L.; HEYNDRICKX, M. Identification of lactobacilli isolated from the cloaca and vagina of laying hens and characterization for potential use as probiotics to control *Salmonella* Enteritidis. **Journal of Applied Microbiology**, v.102, p.1095–1106, 2007.

VELASCO, S.; ORTIZ, L.T.; ALZUETA, C.; REBOLÉ, A.; TREVIÑO, J.; RODRÍGUEZ, M.L. Effect of inulin supplementation and dietary fat source on performance, blood serum metabolites, liver lipids, abdominal fat deposition, and tissue fatty acid composition in broiler chickens. **Poultry Science**, v.89, p.1651-1662, 2010.

WANG, J.; GULERIA, S.; KOFFAS, M.A.G.; YAN, Y. Microbial production of value-added nutraceuticals. **Current Opinion in Biotechnology**, v.37, p.97-104, 2016.

WILDMAN, R.E.C.; KELLEY, M. **Nutraceuticals and Functional Foods**. In: WILDMAN, R.E.C.; WILDMAN, R.; WALLACE, T.C. (Eds.) **Handbook of Nutraceuticals and Functional Foods**, 2ed. Boca Raton: CRC Press. 2006, p.1-21.

YUSRIZAL, Y.; CHEN, T.C. Effect of adding chicory fructans in feed on broiler growth performance, serum cholesterol and intestinal length. **International Journal of Poultry Science**, v.2, p.214-219, 2003.

## **CAPÍTULO IV**

## IMPLICAÇÕES

Com estes experimentos comprovou-se que processo de FES é eficaz na produção de inulinases sendo que as inulinases produzidas na fermentação da farinha de yacon apresenta maior atividade e estabilidade em uma ampla gama de pH e temperatura, o que é desejável do ponto de vista industrial. Já o preparado enzimático sólido de farinha de yacon com *A. niger* 40018 possui alta quantidade de fruto-oligossacarídeos e atividade antioxidante, o que o constitui como promissor para sua utilização em rações. Também apresenta efeito prebiótico, fundamentado pela redução da contagem cecal de *Salmonella* Enteritidis e manutenção da integridade da mucosa intestinal, sem prejudicar o desempenho de frangos de corte. No entanto, vale ressaltar que o processo de secagem do PES para sua adição nas rações não foi eficaz. A amostra foi seca a 45°C em estufa de circulação forçada de ar até peso constante. Obteve-se um produto com característica tenaz e altamente viscoso, impossibilitando sua mistura nas rações. Nova tentativa foi realizada por meio de liofilização, porém, o processo resultou em extremo endurecimento da amostra, impossibilitando novamente sua adição. Sendo assim o PES foi adicionado nas rações na forma úmida, com mistura prévia em óleo de soja. O processo de fermentação em estado sólido modifica as características físicas da farinha de yacon, pois os fungos possivelmente produzem, além de enzimas, outros compostos que maximizam esse efeito de aderência das partículas dificultando a secagem do produto. Além disso, a própria farinha de yacon, por possuir alta quantidade de carboidratos apresenta alta higroscopicidade. Novas pesquisas são levantadas através desses resultados como: avaliação de diferentes métodos de secagem do PES para obtenção de um aditivo seco que não influencie o teor de umidade da ração; e avaliação de outras moléculas no PES, com valor biológico para a nutrição de aves.

## ANEXOS

**Anexo 1.** Fotos do halo de inibição de *Salmonella* Enteritidis por *Lactobacillus* sp. isolados do ceco de frangos de corte.



**Anexo 2.** Fotos da análise de PCR para identificação de *Lactobacillus* sp. isolados do conteúdo cecal de frangos de corte.

