



Aline Zorzetto Lopes Gonçalves

*Produção de enzimas ligninolíticas por  
fungos basidiomicetos por fermentação em  
estado sólido utilizando resíduos sólidos  
agroindustriais, visando potencial aplicação  
na produção animal*

Rio Claro – SP/2010

**Aline Zorzetto Lopes Gonçalves**

**Produção de enzimas ligninolíticas por fungos  
basidiomicetos por fermentação em estado sólido  
utilizando resíduos sólidos agroindustriais, visando  
potencial aplicação na produção animal.**

Tese apresentada ao Instituto de Biociências do  
Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista  
Júlio de Mesquita Filho, como parte dos requisitos  
para obtenção do título de Doutor em Ciências  
Biológicas (Microbiologia Aplicada).

**Orientador: Profa. Dra. Eleni Gomes**

Rio Claro – SP  
2010

547.758 Gonçalves, Aline Zorzetto Lopes  
G635p Produção de enzimas ligninolíticas por fungos  
basidiomicetos por fermentação em estado sólido utilizando  
resíduos sólidos agroindustriais, visando potencial aplicação  
na produção animal / Aline Zorzetto Lopes Gonçalves. - Rio  
Claro : [s.n.], 2010  
135 f. : il., figs.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista,  
Instituto de Biociências de Rio Claro  
Orientador: Eleni Gomes

1. Enzimas. 2. Enzimologia. 3. Hidrólise da parede celular  
vegetal. 5. Digestibilidade in vitro. I. Título.

Ficha Catalográfica elaborada pela STATI - Biblioteca da UNESP  
Campus de Rio Claro/SP

## **ALINE ZORZETTO LOPES GONÇALVES**

Produção de enzimas ligninolíticas por fungos basidiomicetos por fermentação em estado sólido utilizando resíduos sólidos agroindustriais, visando potencial aplicação na produção animal

Tese apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Microbiologia Aplicada).

### **COMISSÃO EXAMINADORA**

---

Profa. Dra. Eleni Gomes  
Universidade Estadual Paulista - UNESP  
Orientador

---

Prof. Dr. João Claudio Thomeo  
Universidade Estadual Paulista - UNESP

---

Profa. Dra. Regina Teresa Rosim Monteiro  
Universidade de São Paulo – USP

---

Prof. Dr. Ricardo Andrade Reis  
Universidade Estadual Paulista – UNESP

---

Profa. Dra. Daniela Alonso Bocchini Martins  
Universidade Estadual Paulista – UNESP

Rio Claro, 01 de julho de 2010.

*Aos meus pais Rita de Cássia e José Carlos,*

*Com todo meu carinho, dedico este trabalho*

*Amigos, companheiros e confidentes, que hoje sorriem orgulhosos ou choram emocionados, que muitas vezes, na tentativa de acertar, cometeram falhas, mas que inúmeras vezes foram vitoriosos, que se doaram inteiros e renunciaram aos seus sonhos, para que muitas vezes, pudesse realizar os meus. A vocês que compartilharam os meus ideais e os alimentaram incentivando-me a prosseguir na jornada, me mostrando que o meu caminho deveria ser seguido sem medos, fossem quais fossem os obstáculos. Minha eterna gratidão vai além dos meus sentimentos, pois vós cumpristes o dom divino. O dom de ser Pai, o dom de ser Mãe.*

# *Agradecimentos*

Ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Aplicada, UNESP, Campus de Rio Claro, na pessoa da coordenadora Profa. Dra. Sandra Franchetti, da supervisora e da assistente da Seção de Pós-Graduação Rosemary e Ruth e do representante discente César Terrasan, por todo o empenho e incansável trabalho pelo Programa e por todos os seus alunos.

À FAPESP, pela concessão da bolsa e suporte financeiro aos projetos do grupo.

À Profa. Eleni, primeiro por transmitir seu conhecimento em Microbiologia nas aulas da graduação, de forma bastante clara e dinâmica, contribuindo dessa forma com a base do meu aprendizado. Depois, por ter aberto as portas do seu laboratório me inserindo em sua equipe. Foram seis anos de ensinamentos valiosos, muito trabalho, esforço, dedicação, orientação, viagens para congressos, muitos “puxões de orelha”, às vezes desnecessários, mas sem dúvida, esse conjunto de ações, que tiveram início lá atrás (2004) com o meu TCC e hoje “terminam” com minha Tese, foram extremamente importantes para o meu crescimento pessoal e profissional. Por tudo isso, é impossível não lhe dizer MUITO OBRIGADA!!!

*“No olhar curioso do aprendiz, o potencial da semente.*

*Na habilidade do mestre que ensina, a esperança do semeador”*

*Edival Perrini*

Família querida, pai, mãe, Danilo, Felipe, Natália e Renata (meus irmãos), minha vovozinha Ophélia e meus tios!!! Não há recompensa neste mundo que retribua o que vocês fizeram por mim nesses 10 anos longe de casa. Muito obrigada pelo carinho, compreensão e incentivo, por estarem sempre dispostos a me esperar e me levar até a rodoviária (durante os nove anos em que eu não tinha carro) cada vez que eu ia pra Ribeirão. AMO VOCÊS!!!!!!!!!!!!!!!

Vitor meu amor, obrigada por ser meu ponto de apoio, meu porto seguro, por me aguentar nos momentos terríveis de tensão, TPM, TPR e TPT, entender e me ajudar a superar as dificuldades encontradas ao longo desses anos. Por me incentivar constantemente e me ajudar na revisão final desse texto e fazer minhas análises estatísticas. Por todo seu amor, sinceridade, companheirismo, atenção e dedicação que sempre me ofereceu gratuitamente. *Te amo, te amo, te amo...*

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Aplicada, pelo conhecimento transmitido e dedicação nas aulas ministradas ao longo do curso.

A todos os funcionários da UNESP, Campus de São José do Rio Preto que zelam por esse Instituto desempenhando seus trabalhos com esforço e dedicação.

A todos os docentes do curso de Ciências Biológicas da UNESP, Campus de São José do Rio Preto que sem dúvida foram fundamentais para minha formação. Em especial ao Prof. Dr. Carlos Roberto Ceron, ilustríssimo diretor deste Instituto, que foi um professor exemplar, muito paciente e dedicado nas aulas de Bioquímica.

Aos colegas do Programa de Pós Graduação em Microbiologia Aplicada pelos momentos de convívio, que foram poucos devido à distância, mas muito bons. Uma atenção especial para a Lu Fontes, o Alex Almeida e o César Terrasan que sempre me receberam com muito carinho

e muita atenção todas as vezes que estive em Rio Claro, sem contar, claro, com boas conversas e risadas. Nunca esquecerei vocês!!!!

Em especial ao Roberto Fujieda, meu amigo. Minha gratidão será eterna. Em qualquer situação que eu descreva você quase sempre esteve presente!!!!!!!!!!!! Sempre com muita sinceridade em suas colocações, você conquistou minha amizade. Nos momentos de angústia você me ouviu e nunca me deu as costas, foi quase um terapeuta. No meu desespero final, mesmo todo machucado, você leu cada linha que eu escrevi e me ajudou a finalizar a discussão desse trabalho. Além disso, foi extremamente profissional todas as vezes que precisou, sabendo que isso não afetaria absolutamente nada na amizade que compartilhamos. E como não poderia faltar, obrigada pelas bagunça nos churrascos, festas e baladas.

Aos amigos e colegas de laboratório: Nati, Dani (agora Profa.), Carol Dini, Carol Henn, Fabiana, Andréia, Paula, Márcia, Maira, Érika, Ana Flávia, André, Carol Bezerra, Ellen Lago, Marcelo, Rodrigo Simões (Prof. Rodrigo), Josiane, Juliana (minha estagiária sumida), Ricardo, Bárbara Bonine, Barbara (estagiária da Fabi), Ariane, Rodolfo, Gisele, Ruan, Prof. Robertinho e todos os que passaram pelo Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada UNESP, Campus de São José do Rio Preto, pelos momentos de descontração, pelas discussões em equipe, ajuda nas dúvidas que surgiram ao longo do caminho. Nati, Dani e André, em especial, porque vocês cuidaram dos meus experimentos em alguns momentos de ausência e também durante as fases finais. Vocês todos fizeram dos meus dias passados dentro deste laboratório, muito alegres!

À Profa. Dra. Solange Xavier Santos por me enviar todos os fungos após os repiques e reativação.

À toda equipe da Profa. Dra. Célia Franco que me ajudou nas análises cromatográficas, em especial a Thais quem me ajudou na interpretação dos resultados.

Erika, a você também sou muito grata, já que graças ao seu trabalho, o meu pôde ser realizado. Foi a partir de você que as portas se abriram para mim. Obrigada também por me socorrer agora no final, mesmo com o Francisco tão pequenininho!!!

À Bellman Nutrição Animal, na pessoa do diretor de Desenvolvimento de Produtos Dr. Marco Antonio Alvares Balsalobre pela oportunidade oferecida, pela confiança e pela paciência em me explicar várias e várias vezes a nutrição dos ruminantes. Cristiane Sevilla, por ser exemplo de dedicação e esforço, amiga, companheira, sensata, de uma enorme confiança e um enorme coração. Obrigada por todos os momentos em que me socorreu também, por também fazer dos meus dias mais alegres, e hoje por ser parte do pequeno grupo que eu considero meus amigos. Aos demais colegas que pude conhecer nesse ambiente de trabalho, que muitas vezes não entendiam o meu sumiço e até me chamavam de turista, mas que também contribuíram com momentos de aprendizado e diversão.

Às minhas queridas “companheiras de apartamento” Carol e Thais agradeço de coração por terem me acolhido quando eu estava desesperada procurando um lugar pra morar. Foi muito bom compartilhar com vocês o dia-a-dia, cada aprendizado, cada desabafo. Nosso caminho segue, mas eu nunca esquecerei vocês!!!

Amigas eternas de S. J. do Rio Preto: Maira Abrahão, Leandra Isa, Daiane Simiele, Renata Massaro, Luciana Carvalho, Lu Gonçalves, obrigadíssima pelo carinho e pela amizade!!!

## *Dani, Nati e Roberto*

Mais uma etapa foi concluída na minha vida, e esta talvez, pra nos deixar distantes fisicamente. É difícil pôr em palavras as lembranças do tempo que convivemos. Muitas vezes lutamos juntos, e dessas lutas carregamos a marca da experiência e a marca da amizade. Buscamos o conhecimento e temos certeza de que demos um grande passo. Choramos e nos divertimos em muitas situações.....Não somos apenas colegas, somos amigos, e amigos que estão buscando outros ideais, que estão buscando seus próprios ideais, mas que um dia já foram os mesmos. Não importa a distância entre nós, EU considero vocês meus amigos, tomara que pra sempre!!!!!!!!!!!!!!

Dani e Nati, não tenho dúvida que vocês duas são presentes de Deus. Muito obrigada por me compreenderem, por muitas e muitas vezes terem me ajudado sem pedir nada em troca, pela paciência, pelo ombro pra chorar e também pelos momentos de diversão.

### *Bons Amigos*

*Abençoados os que possuem amigos, os que têm sem pedir.*

*Porque amigo não se pede, não se compra, nem se vende. Amigo a gente sente!*

*Benditos os que sofrem por amigos, os que falam com olhar.*

*Porque amigo não se cala, não questiona, nem se rende. Amigo a gente entende!*

*Benditos os que guardam amigos, os que entregam o ombro pra chorar.*

*Porque amigo sofre e chora.*

*Amigo não tem hora pra consolar!*

*Benditos sejam os amigos que acreditam na tua verdade ou te apontam a realidade.*

*Porque amigo é a direção.*

*Amigo é a base quando falta o chão!*

*Benditos sejam todos os amigos de raízes, verdadeiros.*

*Porque amigos são herdeiros da real sagacidade.*

*Ter amigos é a melhor cumplicidade!*

*Há pessoas que choram por saber que as rosas têm espinhos,*

*Há outras que sorriem por saber que os espinhos têm rosas!*

*Machado de Assi*

## Resumo

No presente trabalho vinte de cinco linhagens de basidiomicetos, estocadas na coleção de microrganismos do Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada, foram avaliadas com relação aos seus potenciais de produção de enzimas ligninolíticas. A finalidade dessas enzimas é complementar um preparado enzimático (contendo xilanases e celulases) para ser aplicado em dietas de ruminantes. A produção das enzimas nos resíduos/subprodutos farelo de trigo, farelo de algodão, polpa cítrica e bagaço de cevada foi considerável. Farelo de trigo e bagaço de cevada proporcionaram as melhores quantidades da enzima lacase. O fungo *Corioloopsis byrsina* produziu altos níveis de lacase extracelular, com baixa atividade de celulase. A atividade de feruloil esterase foi detectada no extrato enzimático bruto desse mesmo fungo quando cultivado em bagaço de cevada. A lacase foi estável até 60 °C por 1 hora, apresentando duas temperaturas ótimas, a 40 e 55 °C. Foi estável em ampla faixa de pH (4,0 – 8,0), apresentando pH ótimo 4,5 e mantendo 20% de sua atividade em pH 7,0. Além disso, apresentou 30% da sua atividade após 6 horas de incubação nas condições do ambiente ruminal. O tratamento das fibras vegetais com o extrato enzimático bruto de *C. byrsina* (alta atividade de lacase) misturado com o extrato enzimático bruto *Trichoderma reesei* (celulase + xilanase) melhorou o percentual de hidrólise, disponibilizando os carboidratos fermentáveis para posterior fermentação ruminal. A digestibilidade *in vitro* por produção de gases apresentou aumento significativo em todos os alimentos (forragens) avaliados.

*Palavras-chave:* enzimas ligninolíticas, basidiomicetos, fermentação em estado sólido, hidrólise da parede celular vegetal, digestibilidade *in vitro* da matéria orgânica (DIVMO)

## Abstract

At the present research work twenty five basidiomycete strains kept in the collection of microorganisms in the Processing Biochemistry and Applied Microbiology laboratory at IBILCE were evaluated according to their ligninolytic enzymes production potential. The objective of these enzymes would be to complement an enzymatic mix (containing xylanases and cellulases) to be added to ruminants diets. The enzyme production in the byproducts like wheat bran, cotton bran, citrus pulp and brewer's spent grain were considerably high. The wheat bran and the brewer's spent grain presented the highest quantity of laccase. The fungal *Coriolopsis byrsina* produced high levels of extracellular laccase with low cellulose activity. The feruloyl esterase activity was detected in the crude enzyme of the same fungal when cultivated in brewer's spent grain. Laccase was stable at 60 °C for 1 hour, presenting two optimal temperature at 40 and 55 °C. It was stable at (4.0 – 8.0) pH range, presenting optimal pH at 4.5 and keeping 20% of its activity at pH 7.0. Besides that, it presented 30% of its activity after 6 hours of incubation under ruminal conditions. The vegetable fiber treatment with *C. byrsina* crude enzyme (laccase high activity) mixed to *Trichoderma reesei* crude enzyme (cellulose + xylanase) improved the hydrolysis percentage releasing sugars for further ruminal fermentation. In vitro gas production digestibility showed significant increase in various crops.

Key-words: ligninolytic enzymes, basidiomycetes, solid state fermentation, plant cell wall hydrolysis, *in vitro* digestibility of organic matter (IVDOM).

## Lista de Figuras

- Figura 1. Mercado global para os produtos de fermentação ID: FOD020C, publicado em junho de 2009 (ULRICH MARZ, <http://www.bccresearch.com/report/FOD020C.html>) ..... 3
- Figura 2. Ilustração da estrutura da lignocelulose. Adaptado. E.M. RUBIN (2008) Nature 454, 841-845 doi:10.1038/nature07190..... 4
- Figura 3. Representação da fibra vegetal e de seus componentes celulose, hemicelulose e lignina (adaptado de GRAMINHA et al, 2008) ..... 5
- Figura 4. Representação das fibras de celulose (a) e do arranjo nas regiões amorfas e cristalinas (b) (FESTUCCI-BUSELLI et al., 2007; KRAUSE et al., 2003) ..... 7
- Figura 5. Representação esquemática do sistema celulolítico (ARO et al., 2005)..... 8
- Figura 6. (a) Esquema representativo da estrutura de 0-acetil-4-0-metilglucuronoxilana presente em madeiras duras. Os números indicam os átomos de carbono aos quais ligam-se os grupos substituintes. Ac: grupo acetil;  $\alpha$ -4-0-Me-GlcA: ácido  $\alpha$ -4-0-metilglucurônico e (b) estrutura de arabino 4-0-metilglucuronoxilana presente em madeiras macias. Os números indicam os átomos de carbono aos quais ligam-se os grupos substituintes.  $\alpha$ -araf: arabinofuranose;  $\alpha$ -4-0-Me-GlcA: ácido  $\alpha$ -4-0-metilglucurônico (SUNNA, ANTRANIKIAN, 1997) ..... 10
- Figura 7. Representação esquemática de uma molécula de xilana e das enzimas do sistema xilanolítico. 1 – endoxilanasas; 2 -  $\alpha$ -L-arabionofuranosidasas; 3 – glucuronidasas; 4 – feruloil e cumaril esterases; 5 – acetil xilana esterases (CHÁVEZ; BULL; EYZAGUIRRE, 2006) ..... 12
- Figura 8. Estrutura da lignina encontrada em gimnospermas. Nas angiospermas, as unidades fenolpropanóides apresentam dois grupos metoxil em posição orto em relação ao oxigênio. (PÉREZ et al., 2002)..... 13
- Figura 9. Os fenilpropanóides constituintes da lignina (Adaptado de TUOR et al., 1995)..... 13
- Figura 10: a) Representação esquemática da parede secundária da planta mostrando as cadeias lineares da celulose e as ramificadas da hemicelulose imersas em uma matriz de lignina formada por unidades de fenilpropanóides dimetoxilados (siringil), monometoxilados (guaiaecil) e não-metoxilados (p-hidroxifenil) em uma variedade de subestruturas contendo éster e ligações interunidades de C-C. Os (ácidos cinâmicos (CA = ácido p-coumarico; FA = ácido ferrúlico e SA = ácido sinápico) também são mostrados (alguns deles formando ligações carboidrato-lignina) (BIDLACK et al, 1992); b) Representação do complexo lignina/fenólicos – carboidratos (adaptado de BURANOV, MAZZA, 2008) ..... 16
- Figura 11. Ciclo catalítico da lignina peroxidase (LiP). RH representa o substrato na forma reduzida e R• representa o substrato no seu estado oxidado (CAMERON; TIMOFEEVSKI; AUST, 2000) ..... 20
- Figura 12. Ciclo catalítico das peroxidases dependentes de manganês (HOFRICHTER, 2002) ..... 22
- Figura 13. Representação de uma das possíveis vias de abertura do anel fenólico na lignina por ação de manganês peroxidases (HOFRICHTER, 2002). ..... 23
- Figura 14. Ciclo catalítico das lacases evidenciando sua atuação direta sobre substratos fenólicos. His-Cys-His correspondem à disposição dos principais aminoácidos no sítio ativo (BALDRIAN, 2006) . 25

Figura 15. Mecanismo de reação lacase-mediador (Med); estruturas não fenólicas podem ser oxidadas por ação do mediador. (BRANCHI et al., 2005).....	26
Figura 16. Aspecto macroscópico do basidioma de algumas espécies isoladas na região noroeste do Estado de São Paulo (retirado de ABRAHÃO, 2009). 130 <i>Coriolopsis caperata</i> ; 144a <i>Polyporus tenuiculus</i> ; 145a <i>Pycnoporus sanguineus</i> . .....	26
Figura 17. Diagrama esquemático do rúmen e sistema gastrointestinal de um bovino (MADIGAN et al., 2004) .....	34
Figura 18. Coleta do fluido ruminal .....	51
Figura 19. Procedimento realizado para determinação da digestibilidade in vitro pela técnica semi automática de produção de gases .....	52
Figura 20. Perfil de produção da CMcase (a), Xilanase (b), Lacase (c) e quantificação das proteínas (d) e açúcares redutores (e) ao longo do tempo de cultivo pelo <i>Coriolopsis byrsina</i> SXS 16, em meio composto por farelo de trigo (FT), farelo de algodão (FA), polpa cítrica (PC) e bagaço de cevada (BC) .....	63
Figura 21. Perfil de produção da CMcase (a), Xilanase (b), Lacase (c) e quantificação das proteínas (d) e açúcares redutores (e) ao longo do tempo de cultivo pelo <i>Schizophyllum comune</i> SXS 125, em meio composto por farelo de trigo (FT), farelo de algodão (FA), polpa cítrica (PC) e bagaço de cevada (BC) .....	65
Figura 22. Perfil de produção da CMcase (a), Xilanase (b), Lacase (c) e quantificação das proteínas (d) e açúcares redutores (e) ao longo do tempo de cultivo pelo <i>Pycnoporus sanguineus</i> MCA 16, em meio composto por farelo de trigo (FT), farelo de algodão (FA), polpa cítrica (PC) e bagaço de cevada (BC) .....	67
Figura 23. Efeito do pH na atividade (a) e estabilidade (b) das enzimas produzidas em resíduo de cervejaria pelo <i>C. byrsina</i> SXS 16 .....	75
Figura 24. Efeito da temperatura na atividade (a) e estabilidade (b) das enzimas produzidas em resíduo de cervejaria pelo <i>C. byrsina</i> SXS 16 .....	78
Figura 25. Efeito do tempo de incubação da lacase (+), xilanase (○) e CMcase (■), produzidas pelo <i>C. byrsina</i> em resíduo de cervejaria, na presença de fluido ruminal .....	81
Figura 26. Hidrólise enzimática das fibras vegetais por 24 h. C = grupo controle (tratado com água); T1 = tratado com 2 mL e T2 = tratado com 6 mL. (A) Capim Brachiaria em estágio avançado de maturidade (Macega) (B) Tanzânia (C) Brachiaria decumbens (D) Bagaço de cana <i>in natura</i> .....	85
Figura 27. Perfil dos açúcares identificados nas análises feitas por HPAEC-PAD; Ara (arabinose), Gal (galactose), Gli (glicose), Xil (xilose), Xil-2 (xilobiose) e Cel (celobiose). (A) macega (B) Tanzânia (C) braquiária (D) bagaço de cana <i>in natura</i> .....	89
Figura 28. Digestibilidade in vitro com produção de gás do capim macega de <i>B. brizantha</i> .....	94
Figura 29. Digestibilidade in vitro com produção de gás do capim tanzânia.....	95
Figura 30. Digestibilidade in vitro com produção de gás do capim <i>B. decumbens</i> .....	95
Figura 31. Digestibilidade in vitro com produção de gás do bagaço de cana <i>in natura</i> .....	96

## Lista de Tabelas

Tabela 1. Composição de celulose, hemicelulose e lignina, em porcentagem, nos materiais lignocelulósicos. Fonte. Tabelas brasileiras de composição de alimentos para bovinos 2ª Ed. ....	6
Tabela 2. Basidiomicetos isolados da Estação Ecológica do Noroeste Paulista, S. J. Rio Preto que foram utilizados no projeto (XAVIER-SANTOS, 2003; ABRAHÃO, 2007). ....	41
Tabela 3. Tratamentos empregados na digestibilidade in vitro pela produção de gases. ....	48
Tabela 4 . Composição do meio tamponado para a produção de gases in vitro. ....	50
Tabela 5. Composição das soluções do meio tamponado. ....	51
Tabela 6. Atividade das enzimas ligninolíticas em FT. O cultivo foi realizado por 5 semanas e os resultados apresentados correspondem aos valores máximos encontrados. ....	54
Tabela 7. Atividade das enzimas ligninolíticas em FA. O cultivo foi realizado por 5 semanas e os resultados apresentados correspondem aos valores máximos encontrados. ....	55
Tabela 8. Atividade das enzimas hidrolíticas em FT. O cultivo foi realizado por 5 semanas e os resultados apresentados correspondem aos valores máximos encontrados. ....	57
Tabela 9. Atividade das enzimas hidrolíticas em FA. O cultivo foi realizado por 5 semanas e os resultados apresentados correspondem aos valores máximos encontrados. ....	58
Tabela 10. Atividade enzimática das enzimas pelos fungos <i>Corioloopsis byrsina</i> , <i>Schizophyllum comune</i> e <i>Pycnoporus sanguineus</i> cultivados por 5 semanas em 5g de farelo de trigo (FT), farelo de algodão (FA), farelo de algodão + polpa cítrica (1:1 p/p), polpa cítrica e resíduo de cervejaria, a 28 °C. ....	61
Tabela 11. Resumo da caracterização físico-química das enzimas. ....	79
Tabela 12. Composição enzimática do extrato bruto utilizado no experimento de hidrólise. ....	83
Tabela 13. Análise dos carboidratos liberados após 24 h de hidrólise enzimática, por HPAEC-PAD. (T) tratamento com as enzimas obtidas do cultivo de <i>C byrsina</i> em resíduo de cervejaria e <i>T reesei</i> QM9414 em bagaço de cana + farelo de trigo (1:1p/p) (C) controle (sem enzimas). ....	91
Tabela 14. Composição química dos diferentes volumosos utilizados na digestibilidade in vitro por gases. Os valores relatados são a média de duas medidas. ....	93
Tabela 15. Composição enzimática do extrato bruto utilizado no experimento de digestibilidade in vitro do bagaço de cana, macega de <i>B. Brizantha</i> , Tanzânia e <i>B. Decumbens</i> . ....	94
Tabela 16. Digestibilidade in vitro da matéria orgânica (%) de diferentes alimentos usando solução enzimática bruta obtida pelo cultivo de <i>C byrsina</i> . ....	96
Tabela 17. Estimativa dos nutrientes digestíveis totais (%) nos diferentes alimentos analisados usando solução enzimática bruta obtida pelo cultivo de <i>C. byrsina</i> . ....	97
Tabela 18. Avaliação da composição química do resíduo de cervejaria submetido ao tratamento biológico (processo fermentativo) com o fungo <i>C byrsina</i> por 14 dias. Os resultados foram expressos em % da matéria original (55 °C). ....	101

## Índice Geral

1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO DA LITERATURA .....	2
2.1. O mercado mundial de enzimas .....	2
2.2 A biomassa lignocelulósica .....	3
2.2.1. Celulose .....	7
2.2.2. O sistema enzimático celulolítico.....	8
2.2.3. Hemicelulose.....	9
2.2.4. O sistema enzimático hemicelulolítico.....	11
2.2.5. Lignina.....	12
2.2.6. O sistema enzimático ligninolítico .....	17
2.2.6.1. Lignina Peroxidase (LiP) .....	18
2.2.6.2. Peroxidase dependente de Manganês (MnP) .....	21
2.2.6.3. Lacase.....	23
2.3. Filo Basidiomycota - Produção e aplicações industriais das ligninases.....	26
2.3.1. Processo de Fermentação em Estado Sólido.....	28
2.3.2. Resíduos e Subprodutos agroindustriais.....	31
2.4. A Bovinocultura brasileira.....	33
2.4.1. Efeito da adição de enzimas no processo de digestão em ruminantes .....	36
3. OBJETIVOS .....	40
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	41
4.1. Microrganismos .....	41
4.2. Substratos para a fermentação em estado sólido.....	41
4.3. Obtenção das enzimas por fermentação em estado sólido (FES) .....	42
4.4. Determinação das atividades enzimáticas .....	42
4.4. 1. Atividades de ligninases .....	42
4.4.2. Atividade de xilanase, pectinase, CMCCase, avicelase.....	43
4.4.3. Atividade da feruloil esterase.....	44
4.5. Outros métodos analíticos .....	44
4.6. Caracterização da Lacase produzidas por FES .....	44
4.6.1. Determinação do pH e temperatura ótimos para a atividade enzimática.....	44
4.6.2. Estabilidade das enzimas frente às variações de pH e temperatura .....	45
4.7. Avaliação das enzimas quanto à estabilidade em fluido ruminal .....	45

4.8. Avaliação Bromatológica das fibras vegetais e do Material Fermentado .....	46
4.9. Hidrólise enzimática das fibras lignocelulósicas .....	46
4.9.1. Análise dos produtos de hidrólise por HPLC.....	47
4.10. Avaliação da dose enzimática na digestibilidade in vitro das fibras vegetais pela técnica semi automática de produção de gases.....	47
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>53</b>
5.1. Triagem das linhagens e a produção enzimática nos diferentes resíduos agroindustriais .....	53
5.2. Quantificação da enzima feruloil esterase .....	72
5.3. Caracterização das enzimas produzidas pelo <i>Coriolopsis byrsina</i> .....	74
5.4. Avaliação do comportamento das enzimas do <i>Coriolopsis byrsina</i> quando submetidas às condições do fluido ruminal .....	80
5.5. Hidrólise enzimática das fibras vegetais .....	82
5.6. Análise Quantitativa e qualitativa dos açúcares liberados na hidrólise vegetal por HPAEC-PAD.....	87
5.7. Avaliação da digestibilidade in vitro pela técnica de produção de gases.....	92
5.8. Avaliação químico bromatológica do material fermentado como potencial para ser usado como ingrediente em dietas de ruminantes .....	100
<b>6. CONCLUSÕES .....</b>	<b>102</b>
<b>7. CONSIDERAÇÃO FINAL .....</b>	<b>102</b>
<b>8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>103</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O avanço que o mercado de enzimas alcançou, deve-se ao desenvolvimento da tecnologia enzimática, e graças a essa tecnologia uma série de processos industriais, ambientais e em química fina vem sendo aprimorados. A preferência pelo uso de enzimas em processos industriais decorre de sua natureza protéica, sua especificidade, o uso em baixas concentrações e sua inocuidade (BON et al., 2008). Muitas preparações enzimáticas estão disponíveis no mercado em diferentes graus de pureza. Essas enzimas apresentam as mais variadas aplicações, nos mais diversos setores da indústria como, por exemplo, detergentes, têxteis, alimentos e farmacêutica.

Como uma tecnologia voltada para aplicação na indústria de ração, as enzimas podem ser empregadas na alimentação de aves e suínos, visando melhorias na qualidade e na digestibilidade dos nutrientes contidos nos alimentos, reduzindo os efeitos de fatores antinutricionais (taninos, alcalóides, alguns inibidores de amilase) e minimizando a geração de subprodutos e resíduos. Na nutrição de ruminantes o papel das enzimas seria potencializar a utilização dos alimentos fibrosos fornecendo energia e aumentando a eficiência do processo de fermentação ruminal.

Os microrganismos surgem como a melhor alternativa na produção de enzimas, em função da variedade de espécies e linhagens, permitindo a obtenção de enzimas com características diversificadas, as quais podem ser aplicadas nas mais variadas condições físico-químicas, permitindo que cada processo possa ter um tipo de enzima que melhor se adapte a ele (STOLP, 1988; MADIGAN et al., 2004).

Dentre a biodiversidade microbiana existente no planeta, os fungos filamentosos apresentam ampla capacidade de adaptação nos mais variados substratos sólidos. Devido a essa característica, a produção industrial de enzimas pode ser realizada a partir de processos de fermentação em estado sólido utilizando-se resíduos e subprodutos da agroindústria como substrato para o crescimento destes fungos, os quais destacam-se como produtores de enzimas de degradação de lignocelulose.

Grande parte dos processos biotecnológicos utilizando fungos basidiomicetos está relacionada com os seus produtos metabólicos, principalmente enzimas e polissacarídeos. A importância do aparato enzimático dos basidiomicetos está diretamente relacionada com a bioconversão de resíduos lignocelulósicos tanto para a produção de alimentos e polissacarídeos, quanto para os processos de biodegradação de compostos xenobióticos.

Em função do exposto, o presente trabalho teve o objetivo de selecionar fungos basidiomicetos produtores de enzimas do complexo ligninolítico para complementar os extratos enzimáticos com alta atividade de celulasas e xilanases, produzidos por outros fungos filamentosos celulolíticos, e verificar a atuação das enzimas na digestibilidade das fibras vegetais em dietas de ruminantes.

## **2. REVISÃO DA LITERATURA**

### **2.1. O MERCADO MUNDIAL DE ENZIMAS**

As enzimas são fundamentais para qualquer processo bioquímico. Agindo em sequências organizadas elas catalisam as centenas de reações sucessivas pelas quais moléculas nutrientes são degradadas. A energia química é conservada e transformada e as macromoléculas biológicas são sintetizadas a partir de moléculas precursoras simples. Com exceção de um pequeno grupo de moléculas de RNA que apresentam propriedades catalíticas (ribozimas), todas as enzimas são proteínas, e sua atividade catalítica depende da integridade da sua conformação protéica nativa (NELSON; COX, 2006).

Com a contínua investigação na compreensão da natureza das enzimas e do seu potencial catalítico, elas vêm sendo cada vez mais utilizadas industrialmente na produção de alimentos e de rações animais, em cervejarias, na indústria têxtil, farmacêutica, de detergentes, de papel e celulose, entre outras. Os principais produtores de enzimas estão investindo fortemente no desenvolvimento de coquetéis enzimáticos capazes de quebrar as hemiceluloses de materiais lenhosos para utilização em biorefinarias. Entre as empresas que dominam esse mercado no mundo estão a Novozyme e a Danisco.

O mercado global para diversos produtos de fermentação em 2008 foi de U\$ 15,9 bilhões e espera-se um aumento para U\$ 22,4 bilhões até o final de 2013, segundo o relatório publicado em junho de 2009 pela *BBC news*. O mercado das enzimas de aplicações industriais

respondeu em 2008 por U\$ 3,2 bilhões e estima-se que haja um aumento para U\$ 4,9 bilhões em 2013 (Fig. 1).

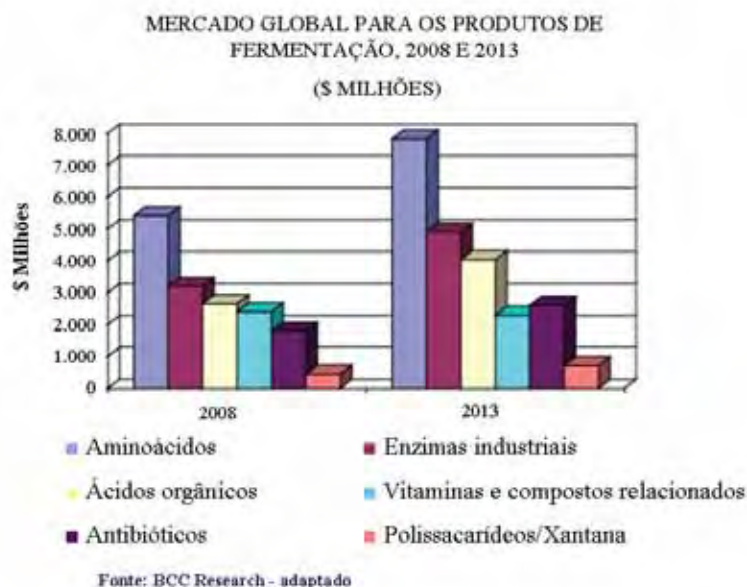


Figura 1. Mercado global para os produtos de fermentação ID: FOD020C, publicado em junho de 2009 (ULRICH MARZ, <http://www.bccresearch.com/report/FOD020C.html>)

De acordo com outros relatórios, é esperado um aumento na velocidade de crescimento principalmente para o setor de rações, ajudado em grande parte pelo aumento no uso da enzima fitase, que propicia o aproveitamento do fitato presente na ração e reduz o fósforo fítico liberado como resíduo nas fezes (Relatório BIO030E, publicado em janeiro de 2008 pela analista Yatin Thakore, <http://bccresearch.com/report/BIO030E.html>).

## 2.2 A BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA

A lignocelulose é o principal componente da biomassa vegetal e representa aproximadamente metade da matéria produzida durante a fotossíntese. É constituída pelos polímeros celulose e hemicelulose e pela macromolécula lignina, presentes na parede celular

de tecidos vasculares das plantas superiores, que se encontram fortemente interligados e quimicamente unidos por forças não covalentes e por ligações covalentes cruzadas (SÁNCHEZ, 2009) (Fig. 2 e 3).

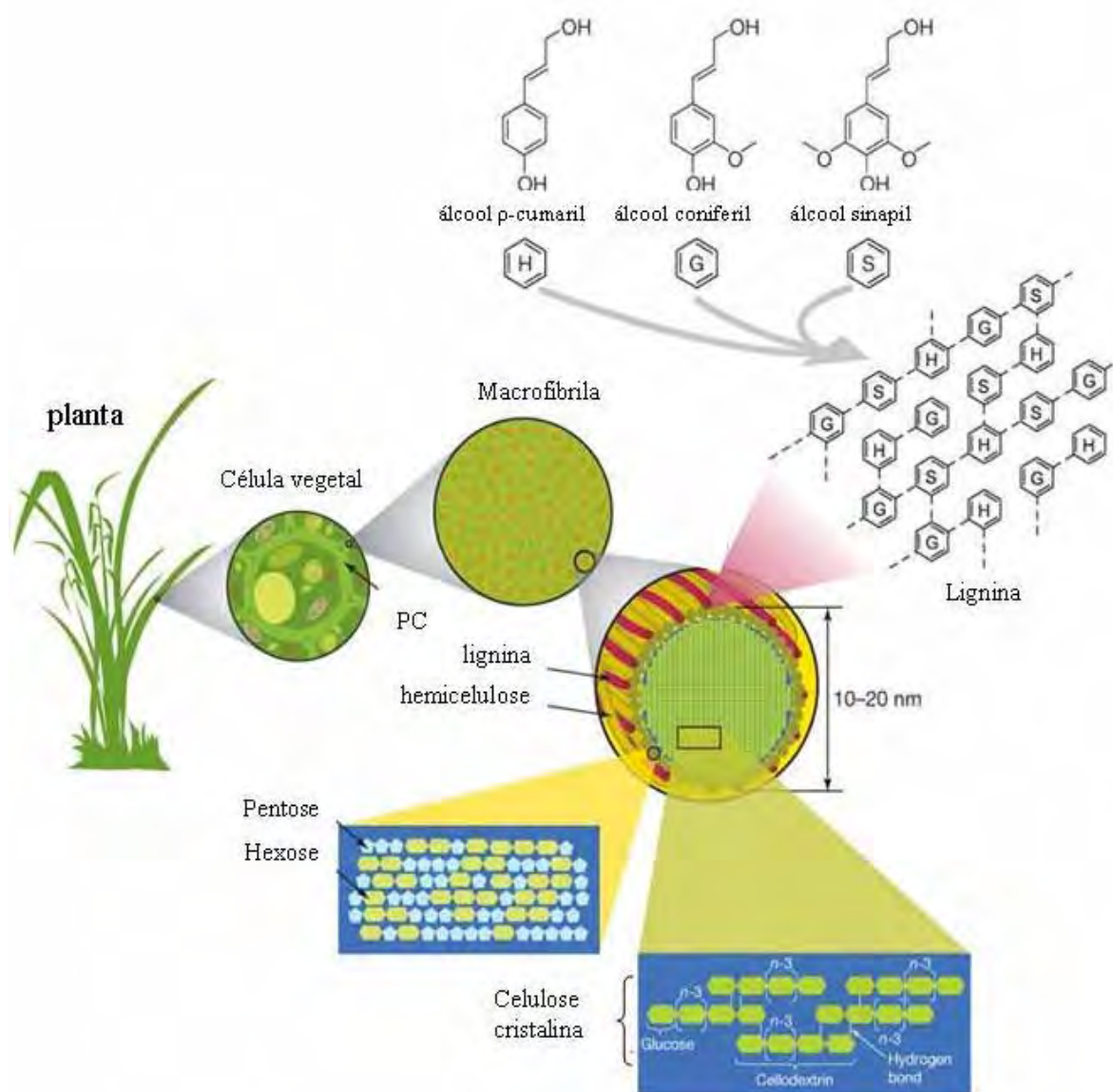


Figura 2. Ilustração da estrutura da lignocelulose. Adaptado. E.M. RUBIN (2008) Nature 454, 841-845 doi:10.1038/nature07190

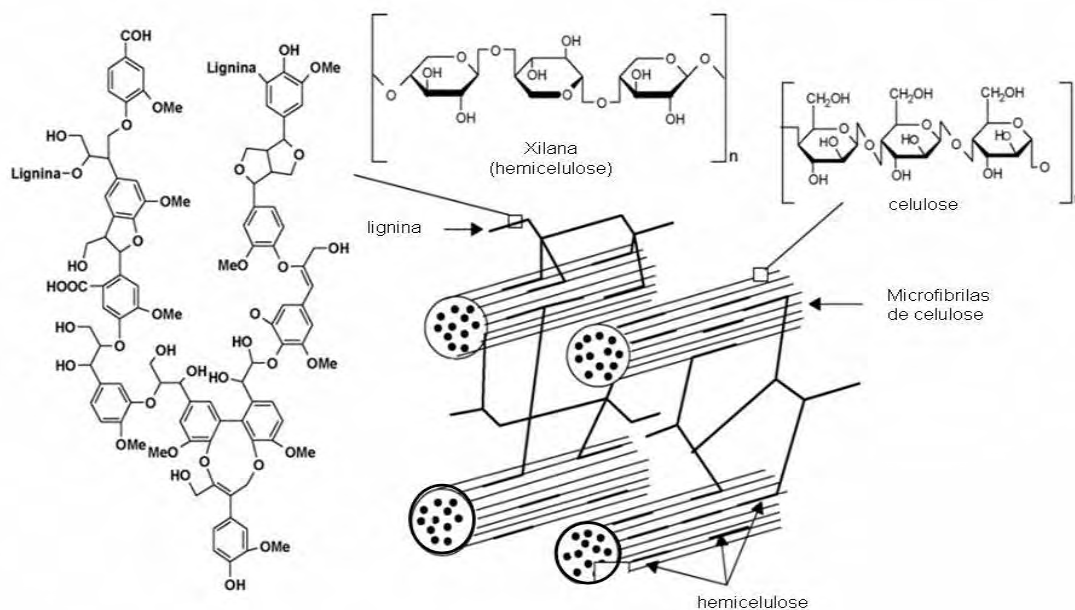


Figura 3. Representação da fibra vegetal e de seus componentes celulose, hemicelulose e lignina (adaptado de GRAMINHA et al, 2008)

A quantidade de cada polímero varia de acordo com a espécie vegetal, entre as diferentes partes da planta e a época de colheita. A Tabela 1 apresenta a composição dos três principais constituintes da parede celular vegetal em alguns volumosos secos, forragens verdes, silagens, concentrados e subprodutos utilizados na alimentação animal.

A energia requerida para a produção animal é obtida a partir da fermentação dos açúcares presentes na parede celular vegetal pelos microrganismos do rúmen. Sendo assim, a parede celular de muitas forrageiras e subprodutos agrícolas são fontes nutricionais significativas para todos os ruminantes e outros herbívoros.

Para que haja um aumento no ganho de peso vivo ou produção de leite pelos ruminantes, é necessário alto consumo de forragem e uma alta digestibilidade desta parede celular. Dessa forma, a organização anatômica ou estrutural dos órgãos vegetais e seus tecidos constituintes influenciam o consumo por controlar a facilidade de quebra das partículas das forragens (JUNG; MERTENS; PAYNE, 1993).

Tabela 1. Composição de celulose, hemicelulose e lignina, em porcentagem, nos materiais lignocelulósicos. Fonte. Tabelas brasileiras de composição de alimentos para bovinos 2ª Ed.

Material	Celulose	Hemicelulose	Lignina	FDN	% lignina expressa na FDN
Alfafa ( <i>Medicago sativa</i> L.)	27,34	9,18	7,61	44,13	17,2
Alfafa - feno	30,86	11,39	10,87	53,12	20
Alfafa - silagem	26,68	5,92	10,02	42,62	23,5
Algodão ( <i>Gossypium hirsutum</i> ) - farelo	22,09	21,59	13,86	57,54	24
Algodão - resíduo de lixadeira	89,59	3,26	1,77	94,92	1
Arroz ( <i>Oryza sativa</i> ) - palha	37,22	23,72	7,14	68,08	10
Arroz integral - farelo	10,11	11,34	5,22	26,67	19,6
Aveia em grão ( <i>Avena sativa</i> )	5,30	18,67	4,38	28,35	15,4
Aveia - feno	34,03	24,23	6,77	65,03	10,4
Aveia - palha	50,13	22,34	6,52	79	8
Cana de açúcar ( <i>Saccharum</i> sp) - bagaço	44,06	32,76	13,42	90,24	14,9
Cana de açúcar - silagem	39,84	26,88	7,40	74,12	10
Capim <i>Brachiaria brizantha</i> - silagem	30,05	29,20	5,55	64,8	8,6
Capim <i>Brachiaria brizantha</i> (0 a 30 dias)	28,30	32,37	3,65	64,3	5,6
Capim <i>Brachiaria brizantha</i> (31 a 45 dias)	27,13	30,46	3,51	61,1	5,7
Capim <i>Brachiaria brizantha</i> (61 a 90 dias)	28,91	29,79	4,30	63	6,8
Capim Braquiária - feno ( <i>Brachiaria</i> sp)	39,48	30,15	7,49	77,12	9,7
Capim <i>Braquiaria decumbens</i> Stapf.	31,29	33,52	6,53	71,34	9,2
Capim <i>Braquiaria decumbens</i> - feno	48,95	35,90	7,49	92,34	8,1
Capim Colonião ( <i>Panicum maximum</i> Jacq)	34,40	32,70	9,24	76,34	12,1
Capim Elefante ( <i>Pennisetum purpureum</i> Schum.)	38,42	26,89	7,80	73,11	10,7
Capim Elefante - feno	42,02	29,56	8,32	79,9	10,4
Capim Elefante - silagem	39,41	23,26	7,70	70,37	10,9
Capim Jaraguá ( <i>Hyparrhenia rufa</i> Nees. Stapf.)	27,07	49,84	4,76	81,67	5,8
Capim Jaraguá - feno	39,00	30,57	4,16	73,73	5,6
Capim Jaraguá (61 a 90 dias)	42,70	42,70	7,31	92,7	7,8
Capim Tanzânia ( <i>Panicum maximum</i> )	34,36	31,46	5,59	71,41	7,8
Capim Tifton 85 ( <i>Cynodon</i> spp)	32,60	34,43	6,79	73,8	9,2
Girassol ( <i>Helianthus annuum</i> ) - silagem	29,06	10,40	6,77	46,23	14,6
Milho ( <i>Zea mays</i> L.) - silagem	24,94	23,71	4,97	53,62	9,3
Polpa de citrus	19,95	4,34	1,89	26,18	7,2
Soja ( <i>Glycinemax</i> (L.) Merr.) - casca	51,42	19,54	3,43	74,39	4,6
Soja - farelo	8,35	6,13	1,33	15,81	8,4
Soja - palha	43,25	15,16	15,08	73,49	20,5
Sorgo ( <i>Sorghum vulgare</i> Pers.) - silagem	27,26	24,01	6,30	57,57	10,9
Trigo ( <i>Triticum aestivum</i> ) - farelo	9,69	33,18	4,00	46,87	8,5
Trigo - palha	46,17	29,90	9,01	85,08	10,6

Outro aspecto importante a ser levado em consideração, é a porcentagem de lignina presente na FDN (fibra em detergente neutro). A redução na digestibilidade da parede celular potencialmente digestível pode estar relacionada em parte com o aumento na quantidade de lignina, entretanto, variações na estrutura tridimensional e composição dessa macromolécula e sua hidrofobicidade, incrustação e ligações cruzadas aos carboidratos da parede devem ser considerados (GRABBER, 2005). Assim, os alimentos que apresentam menores quantidades de lignina tendem a ser mais digestíveis.

### 2.2.1. CELULOSE

A celulose, uma substância fibrosa, resistente à tração e insolúvel em água, é encontrada na parede celular dos vegetais. É um homopolissacarídeo linear e não ramificado formado por subunidades de D-glicose, que variam de 10 a 15 mil, unidas por ligações glicosídicas do tipo  $\beta$ -1,4. A cadeia de celulose é estabilizada por ponte de hidrogênio internas (intra e intermolecular). As pontes de hidrogênio que unem cadeias adjacentes fazem com que elas interajam fortemente entre si, em fileiras paralelas, formando as microfibrilas, que são agregados muito extensos e cristalinos. Essas moléculas de celulose formam os feixes de fibrilas de celulose ou de feixes de celulose, os quais são organizados em lamelas para formar as várias camadas que compõe a estrutura da parede celular vegetal. Elas são caracterizadas por uma estrutura altamente organizada, chamada região cristalina, e por uma estrutura não muito organizada e mais susceptível à hidrólise, denominada região amorfa (Fig. 4) (SILVA et al, 2009).

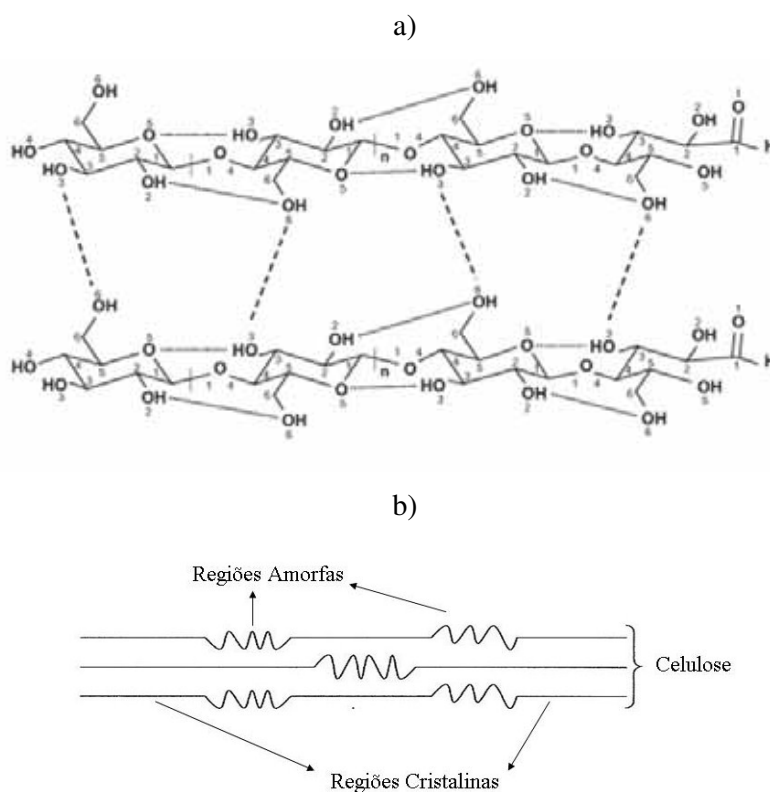


Figura 4. Representação das fibras de celulose (a) e do arranjo nas regiões amorfas e cristalinas (b) (FESTUCCI-BUSELLI et al., 2007; KRAUSE et al., 2003)

## 2.2.2. O SISTEMA ENZIMÁTICO CELULOLÍTICO

A hidrólise enzimática da celulose envolve a ação conjunta e coordenada de várias enzimas do complexo celulolítico denominadas de forma geral como Celulases (Fig. 5).

Existem três grupos principais de celulases:

as endo- $\beta$ -1,4-D-glucanohidrolase ou endoglucanases (EG I, II, III e IV, EC 3.2.1.4), que atacam ao acaso regiões de baixa cristalinidade na fibra de celulose no interior da molécula reduzindo o grau de polimerização; elas clivam celulose nativa ao acaso, possibilitando a formação de cadeias menores de celotriose, celobiose e glicose;

as exo- $\beta$ -1,4-D-glucanase ou celobiohidrolases ou exoglucanases (CBH I e II, EC 3.2.1.91), que degradam a molécula resultante da ação da endoglucanase pela remoção de unidades de celobiose a partir das extremidades não redutoras das cadeias;

as  $\beta$ -1,4-glucosidases (BG I e II, EC 3.2.1.21), que hidrolisam a celobiose liberando glicose. As ações combinadas das endo e exoglucanases modificam a superfície (topografia) da fibra de celulose acelerando a velocidade de hidrólise por facilitar o acesso das enzimas aos seus substratos (CASTRO, 2010; ZHANG; LO; JU, 2007).

As atividades das endo e exoglucanases são frequentemente referidas como carboximetil celulase (CMCase), que representam as celulases que atuam na região amorfa da estrutura da fibra, e como avicelase, respectivamente. Esta última representa um sistema de celulases formado por avicelase I, que se caracteriza por ser uma enzima celulolítica rara que combina as atividades de exoglucanase e endoglucanase, e por uma avicelase II que representa um tipo de exoglucanase (RIDIEL; RITTER; BRONNENMEIER, 1997).

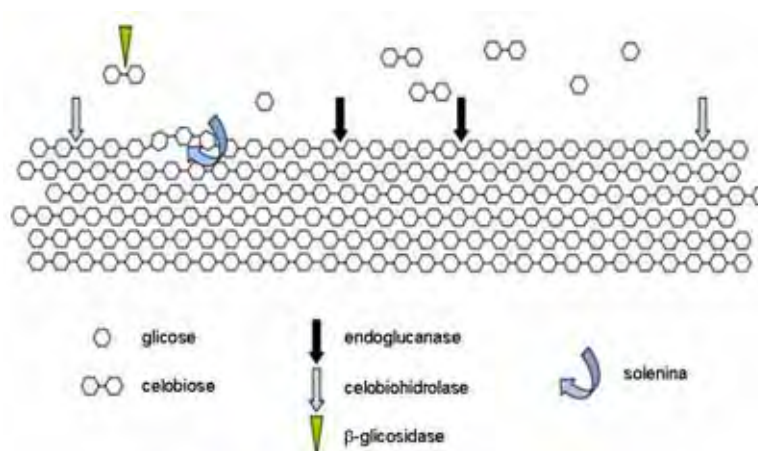


Figura 5. Representação esquemática do sistema celulolítico (ARO et al., 2005)

### 2.2.3. HEMICELULOSE

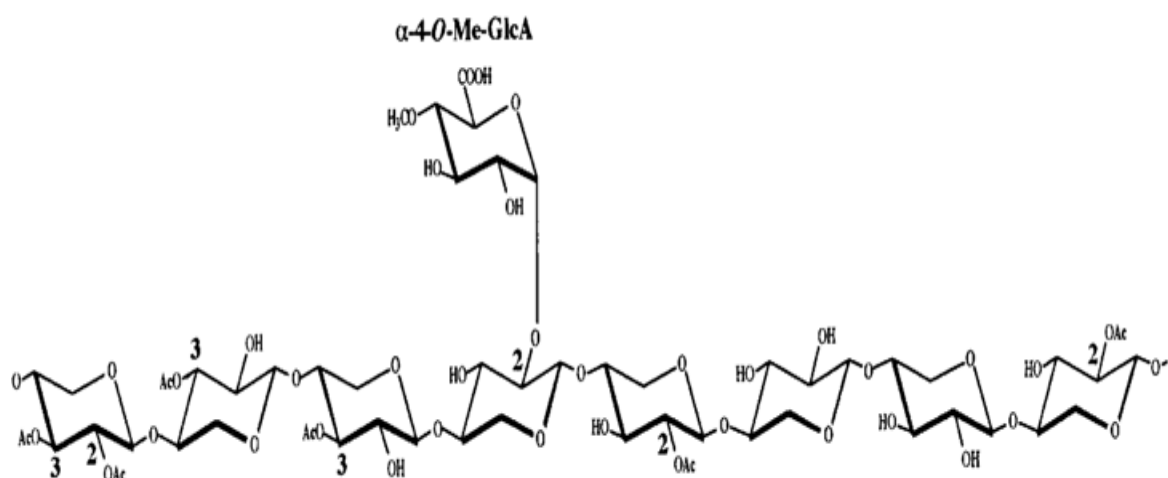
As hemiceluloses (Fig. 6) são heteropolissacarídeos, altamente ramificados, e são classificadas de acordo com o açúcar presente em sua molécula. Os resíduos de açúcar encontrados nas hemiceluloses incluem pentoses (D-xilose, L-arabinose), hexoses (D-galactose, L-galactose, D-manose, L-raminose, L-fucose) e ácidos urônicos (ácido D-galacturônico). A maioria das hemiceluloses são moléculas relativamente pequenas, contendo entre 70 e 200 resíduos de monossacarídeos (HENDRIKS; ZEEMAN, 2009).

As hemiceluloses estão entre os principais constituintes dos materiais lignocelulósicos. São componentes estruturais importantes que se associam intimamente com a lignina e a celulose, e interagem covalentemente com a pectina. Ligam-se fortemente, mas não covalentemente, à superfície das microfibrilas de celulose, cobrindo-as e mantendo ligações cruzadas via pontes de hidrogênio, em uma rede complexa. A forma e estrutura das hemiceluloses dependem da fonte vegetal onde estão presentes (SINGH; MADLALA; PRIOR, 2002; HENDRIKS; ZEEMAN, 2009).

A xilana, principal polissacarídeo presente na hemicelulose, é um homopolímero linear formado por monômeros de  $\beta$ -D-xilopiranosil unidos por ligações glicosídicas  $\beta$ -1,4 (LI et al., 2007; WU et al., 2008). As xilanas são encontradas principalmente na parede celular secundária dos vegetais em íntima associação com a celulose por meio de fortes interações estabelecidas por pontes de hidrogênio e forças de van der Waal. A xilana ligada covalentemente com a lignina tem importante papel na manutenção da integridade da celulose, protegendo as fibras contra a ação de celulases. Nos cereais, ela representa de 20 a 40% da biomassa total (BAE; KIM; KIM, 2008; ZHOU et al., 2008). As madeiras de angiospermas, chamadas de madeiras duras, contêm entre 20 a 25% de xilanas enquanto que nas madeiras macias, de gimnospermas, são encontradas de 7 a 12% (SENTHILKUMAR et al., 2008).

Devido a sua heterogeneidade estrutural, a degradação da xilana requer a ação de várias enzimas, ou seja, de um sistema enzimático que se encontra presente em fungos e bactérias.

a)



b)

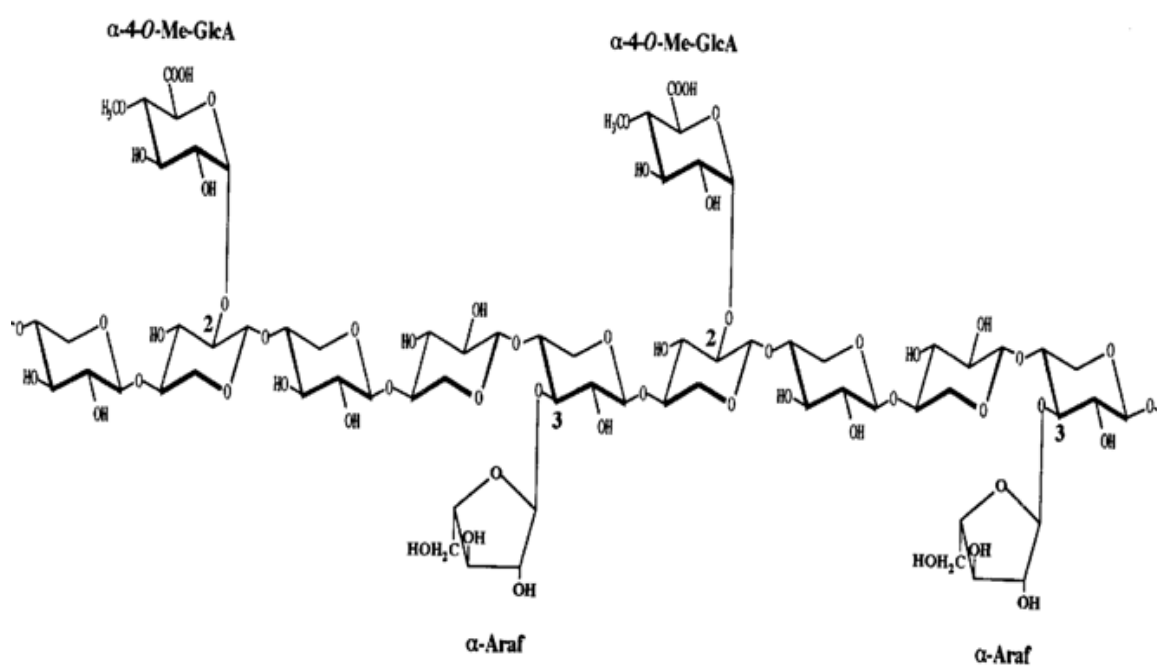


Figura 6. (a) Esquema representativo da estrutura de 0-acetil-4-0-metilglucuronoxilana presente em madeiras duras. Os números indicam os átomos de carbono aos quais ligam-se os grupos substituintes. Ac: grupo acetil;  $\alpha$ -4-0-Me-GlcA: ácido  $\alpha$ -4-0-metilglucurônico e (b) estrutura de arabino 4-0-metilglucuronoxilana presente em madeiras macias. Os números indicam os átomos de carbono aos quais ligam-se os grupos substituintes.  $\alpha$ -araf: arabinofuranose;  $\alpha$ -4-0-Me-GlcA: ácido  $\alpha$ -4-0-metilglucurônico (SUNNA, ANTRANIKIAN, 1997)

#### 2.2.4. O SISTEMA ENZIMÁTICO HEMICELULOLÍTICO

Representado na Figura 7 estão as principais enzimas que atuam na despolimerização da hemicelulose, com algumas de suas características descritas a seguir:

Endo-1,4- $\beta$ -D-xilanases (1,4- $\beta$ -D-xilana xilohidrolase; EC 3.2.1.8) clivam ligações glicosídicas internas da cadeia principal da xilana, acarretando na diminuição do grau de polimerização do substrato. Essa clivagem não ocorre ao acaso, uma vez que as ligações a serem hidrolisadas dependem da natureza do substrato, isto é, do comprimento, do grau de ramificação e da presença de substituintes (POLIZELI et al., 2005; PEIXOTO-NOGUEIRA et al., 2008). Inicialmente, os principais produtos formados são os xilooligossacarídeos (CHÁVEZ; BULL; EYZAGUIRRE, 2006).

$\beta$ -D-xilosidases: ( $\beta$ -D-xilosídeo xilohidrolase; EC 3.2.1.37) hidrolisam xilooligossacarídeos pequenos e xilobiose a partir da extremidade não redutora, liberando xilose. As  $\beta$ -xilosidases purificadas geralmente não hidrolisam xilana, sendo a xilobiose seu melhor substrato. Já a afinidade por xilooligossacarídeos é inversamente proporcional ao seu grau de polimerização. Essas enzimas são capazes de clivar substratos artificiais, como p-nitrofenil- $\beta$ -D-xilopiranosídeo e o-nitrofenil- $\beta$ -D-xilopiranosídeo (CHÁVEZ; BULL; EYZAGUIRRE, 2006).

Acetil-xilanaesterase (EC 3.1.1.6) remove os substituintes O-acetil a partir da posição C2 e/ou C3 dos resíduos de xilose na acetilxilana (CHÁVEZ; BULL; EYZAGUIRRE, 2006). Tem função importante na sacarificação da xilana, uma vez que a retirada de grupos acetil presentes na cadeia principal da xilana facilita a ação de endoxilanases, a qual pode estar inibida parcialmente devido a impedimentos estéricos.

$\alpha$ -L-arabinofuranosidases ou Arabinases: hidrolisam os grupos  $\alpha$ -L-arabinofuranosil terminais, podendo ser dividida em exo- $\alpha$ -L-arabinofuranosidase (EC 3.2.1.55) que degrada p-nitrofenil- $\alpha$ -L-arabinofuranosídeos e arabinanas ramificadas, e endo-1,5- $\alpha$ -L-arabinase (EC 3.2.1.99), que hidrolisa somente arabinanas lineares (VRIES; VISSER, 2001).

$\alpha$ -Glucuronidases (EC 3.2.1.1) hidrolisam as ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,2 entre os resíduos de xilose e o ácido glicurônico ou sua ligação 4-O-metil-éster (CHÁVEZ; BULL; EYZAGUIRRE, 2006).

Feruloil esterases (EC 3.1.1.73) (ácido ferrulico esterases, cinnamoil esterases, ácido cinnamico hidrolases, p-coumaroil esterases, hidroxicinnamoil esterases), apresentam um

papel chave proporcionando um aumento na acessibilidade das enzimas hidrolíticas sobre as fibras de hemicelulose devido à remoção do ácido ferulico das cadeias laterais e ligações cruzadas (PAPINUTTI; FORCHIASSI, 2007; WONG; TAN; SADDLER, 1988; WONG, 2006). A feruloil esterase quebra as ligações éster entre os ácidos hidroxicinnamicos esterificados em arabinoxilana e certas pectinas presentes na parede celular da planta.

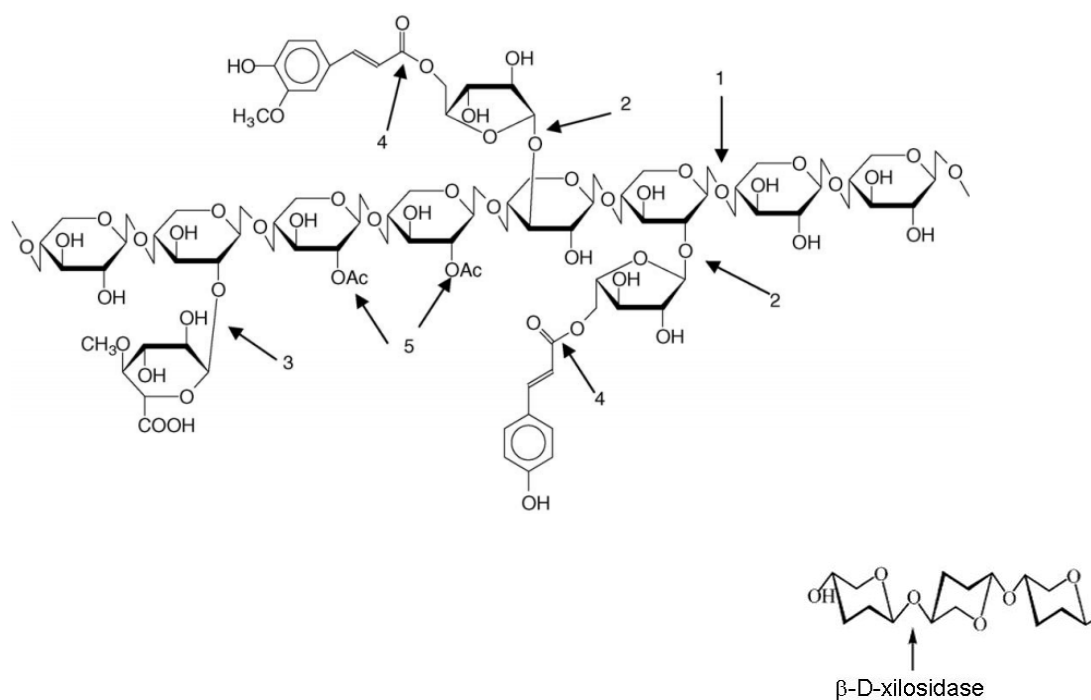


Figura 7. Representação esquemática de uma molécula de xilana e das enzimas do sistema xilanolítico. 1 – endoxilanasas; 2 –  $\alpha$ -L-arabionofuranosídeo; 3 – glucuronídeo; 4 – feruloil e cumaril esterases; 5 – acetil xilana esterases (CHÁVEZ; BULL; EYZAGUIRRE, 2006)

### 2.2.5. LIGNINA

A lignina (Fig. 8) é o terceiro composto mais abundante na natureza, depois da celulose e hemicelulose, sendo considerada uma macromolécula amorfa, resultante da condensação de unidades fenilpropanóides (álcool coniferílico, álcool sinapílico e álcool p-cumarílico) derivadas de fenilalanina (Fig. 9), conectadas por diferentes ligações éter (C-O-C)

e carbono-carbono (C-C) (HIGUCHI, 2004; PAPINUTTI; FORCHIASSIN, 2007; HENDRIKS; ZEEMAN, 2009).

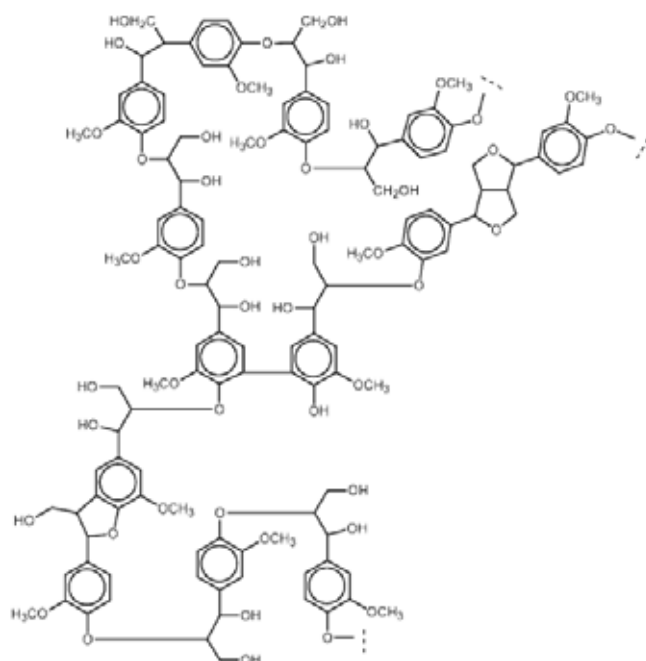


Figura 8. Estrutura da lignina encontrada em gimnospermas. Nas angiospermas, as unidades fenilpropanóides apresentam dois grupos metoxil em posição orto em relação ao oxigênio. (PÉREZ et al., 2002)

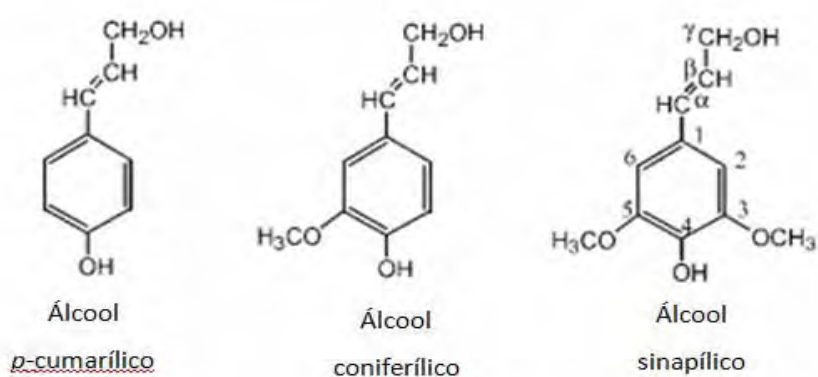


Figura 9. Os fenilpropanóides constituintes da lignina (Adaptado de TUOR et al., 1995)

O principal propósito da lignina é dar resistência às plantas contra ataques de enzimas produzidas por fitopatógenos, ao estresse oxidativo além de conferir rigidez aos tecidos

vegetais (SANDGREN; STAHLBERG; MITCHINSON, 2005; HENDRIKS; ZEEMAN, 2009). Ela é depositada na rede de carboidratos da parede celular secundária das plantas, durante o seu crescimento (SANDGREN; STAHLBERG; MITCHINSON, 2005). Mesmo após a morte da planta, a lignina continua dificultando o acesso dos microrganismos decompositores da madeira às suas fontes primárias de carbono e energia, a celulose e as hemiceluloses (LEONOWICZ et al., 1999).

A estrutura predominante durante as ligações da molécula de lignina são as  $\beta$ -O-4 éter, as quais não são hidrolisáveis sob condições biológicas. Já foi claramente demonstrado que a lignina é racêmica e, conseqüentemente, mesmo um simples dímero com ligação  $\beta$ -O-4, com dois carbonos assimétricos, possui quatro estereoisômeros. Como o número de isômeros aumenta geometricamente com o número de sub-unidades, a lignina forma uma estrutura bem complexa e sem unidades repetitivas definidas (HAMMEL; CULLEN, 2008).

Durante o processo de lignificação, os monolignóis produzem um polímero de lignina complexo, tridimensional e amorfo via ligações  $\beta$ -O-4,  $\alpha$ -O-4,  $\beta$ -5,  $\beta$ -1, 5-5,  $\beta$ - $\beta$ , não possuindo unidades regulares e repetição ordenada como encontrado em outros polímeros (celulose, amido e proteínas). Durante a biossíntese, os principais radicais se unem e formam uma única molécula de lignina em cada espécie vegetal. A lignina presente nas madeiras contém principalmente unidades guaiacil e siringil, enquanto a lignina de plantas herbáceas contém as três unidades (guaiacil, siringil e  $p$ -hidroxifenil) em diferentes proporções e quantidades (BURANOV; MAZZA, 2008). Em função da sua estrutura, essa macromolécula é de difícil degradação, comparado aos polímeros de polissacarídeos, permanecendo nos solos como componentes recalcitrantes do húmus.

A lignina não existe nos tecidos vegetais como uma molécula independente. Ela sempre está associada com outros polímeros, em especial, hemiceluloses (principalmente as xilanas), via ligações covalentes, formando uma matriz complexa que circunda as microfibrilas de celulose (Fig. 10).

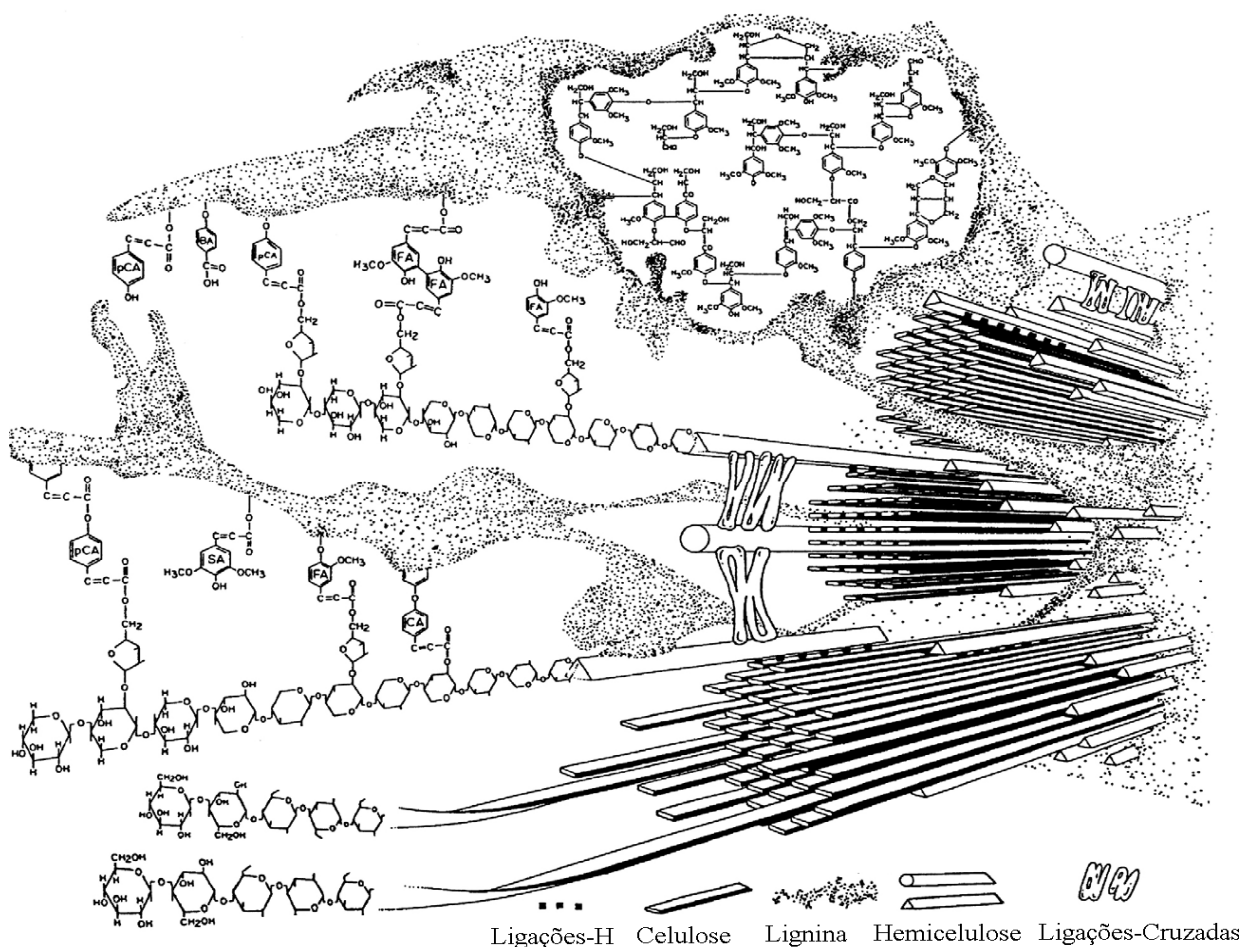
Na parede celular das forrageiras, a lignina tem sido considerada como um dos fatores que limita o processo de digestão dos polissacarídeos dentro do rúmen, principalmente quando se trata de forragens de clima tropical. Estas apresentam maior proporção de parede celular espessa com grande quantidade de lignina e menores teores de proteínas, o que leva a uma menor digestibilidade. Apesar de essa correlação sugerir que há redução na digestibilidade, ela não é necessariamente prova que a lignina seja realmente a principal responsável pela menor digestibilidade da matéria seca (JUNG; DEETZ, 1993).

Há que se considerar as interações entre os polímeros, os tipos de ligações entre eles e a quantidade de ácidos fenólicos presentes na fração lignina. De acordo com Hatfield (1989), as interações da matriz que poderiam restringir a extensão e a taxa de degradação da celulose seriam as pontes de hidrogênio da hemicelulose com a celulose. O aumento das ligações dos polissacarídeos de cadeia linear com as microfibrilas de celulose limitaria o acesso à degradação da celulose.

Além disso, nas plantas herbáceas, os ácidos ferúlico e p-cumarico são anexados à lignina e hemiceluloses (arabinoxilanas) por meio de ligações éster e éter, como ponte entre elas, formando complexos lignina/ácidos fenólicos – carboidratos (BURANOV, MAZZA, 2008), estruturalmente diferente daqueles em madeiras (Fig. 10b). O ácido ferulico se associa à lignina por meio de ligações éter e aos carboidratos por ligações éster. A lignina presente nas palhas contém até 5% de ácido ferúlico e uma grande proporção dos resíduos de ácido ferúlico ligados aos carboidratos por ligações éster podem formar ligações do tipo éter com as unidades fenilpropano criando pontes entre os polissacarídeos da parede e a lignina, reduzindo a disponibilidade destes (SUN apud BURANOV, MAZZA, 2008).

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

a)



b)

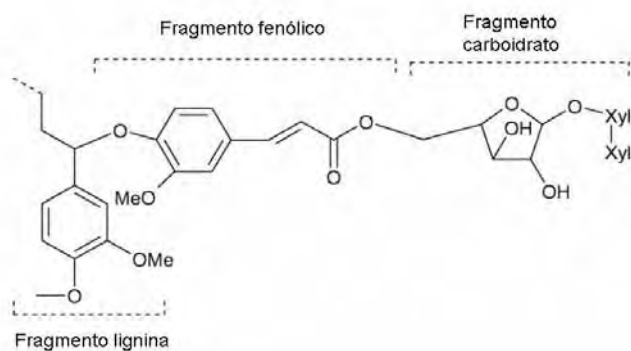


Figura 10: a) Representação esquemática da parede secundária da planta mostrando as cadeias lineares da celulose e as ramificadas da hemicelulose imersas em uma matriz de lignina formada por unidades de fenilpropanóides dimetoxilados (siringil), monometoxilados (guaiaçil) e não-metoxilados (p-hidroxifenil) em uma variedade de subestruturas contendo éster e ligações interunidades de C-C. Os (ácidos cinâmicos (CA = ácido p-coumarico; FA = ácido ferrúlico e SA = ácido sinápico) também são mostrados (alguns deles formando ligações carboidrato-lignina) (BIDLACK et al, 1992); b) Representação do complexo lignina/fenólicos – carboidratos (adaptado de BURANOV, MAZZA, 2008)

### 2.2.6. O SISTEMA ENZIMÁTICO LIGNINOLÍTICO

As diferenças estruturais encontradas no arranjo e composição da parede celular vegetal e, entre as enzimas indicam que as diferentes espécies de fungos podem empregar diferentes maneiras de degradar a lignina.

A biodegradação da lignina é uma etapa importante na reciclagem do carbono nos ecossistemas terrestres. A composição complexa e heterogênea da lignina exigiu o desenvolvimento de um sistema catalítico peculiar pelo grande número de enzimas e formas de atuação (EVANS et al., 1994).

Os fungos responsáveis pela degradação da madeira estão divididos em 3 classes segundo Szklarz e colaboradores (1989):

- fungos de decomposição branda: ascomicetos e fungos mitosporicos, que decompõem eficientemente a celulose, mas degradam a lignina lenta e incompletamente;
- fungos de decomposição parda: são basidiomicetos, que causam apenas uma desmetilação da lignina, desorganizando a parede celular e permitindo a entrada de enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas;
- fungos de decomposição branca: basidiomicetos que degradam completamente a lignina e a celulose.

As enzimas ligninolíticas se destacam entre as oxidorreduções, atuando sobre seus substratos de forma difusa, não-específica, por vezes indireta e orientada basicamente pelas diferenças entre os potenciais de oxidorredução dos substratos e enzimas e agem via mediadores não proteicos (ESPOSITO; AZEVEDO, 2004; POINTING, 2001).

O sistema ligninolítico básico é formado pelas enzimas denominadas fenoloxidasas, onde estão a lacase e a tirosinase, e as peroxidases. As peroxidases, por sua vez, são constituídas pela peroxidase dependente de manganês (MnP) e pela lignina peroxidase (LiP) (HATAKKA, 1994; HOFRICHTER, 2002).

De Jong e colaboradores (1992) sugerem que a enzima MnP em combinação com a lacase ou lignina peroxidase seja o sistema enzimático mínimo necessário para a degradação da lignina.

### 2.2.6.1. LIGNINA PEROXIDASE (LiP)

Os fungos da degradação branca possuem um sistema de degradação da lignina e peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) em resposta à limitação dos nutrientes nitrogênio, carbono ou enxofre (PEASE; TIEN, 1992).

A lignina peroxidase (LiP, EC 1.11.1.14) é considerada um dos componentes chave do sistema ligninolítico, devido ao seu alto potencial redox capaz de oxidar os compostos aromáticos não fenólicos, que corresponde até 85% da molécula de lignina. É uma glicoproteína que contém ferro protoporfirina IX (heme) como grupo prostético e requer  $H_2O_2$  para sua atividade catalítica (RODRIGUEZ; DURÁN, 1988). O  $H_2O_2$  necessário à atividade da LiP origina-se de diferentes vias bioquímicas, expressas diferencialmente de acordo com fatores nutricionais e condições de crescimento do microrganismo (CONESSA; PUNT; van den HONDEL, 2002). Com massa molar variando entre 38 e 45 kDa, são muito semelhantes às peroxidase dependentes de manganês (MnP) em estrutura e função. A especificidade catalítica inerente a cada uma delas seria resultante de diferenças sutis nos sítios de ligação aos substratos (ESPOSITO; AZEVEDO, 2004; CAMERON; TIMOFEEVSKI; AUST, 2000).

A estrutura protéica da lignina peroxidase conta com 8 pontes dissulfeto, 2 sítios de ligação de  $Ca^{2+}$  e o grupo heme pentacoordenado com um resíduo de histidina como ligante proximal axial. O sítio de ligação ao peróxido de hidrogênio é constituído por resíduos de arginina e histidina. A diversidade de substratos, variando desde pequenas moléculas aromáticas não fenólicas até grandes porções de lignina sugere que ao menos um dos sítios de ligação ao substrato estaria situado na superfície da enzima e compreenderia resíduos de aminoácidos aromáticos ou não-polares (CAMERON; TIMOFEEVSKI; AUST, 2000).

A LiP catalisa a oxidação de vários compostos aromáticos como o álcool benzílico, por meio da remoção de um elétron, com subsequente formação de radicais catiônicos tipo aril, os quais são decompostos espontaneamente dando origem a uma variedade de produtos finais (HATAKKA, 1994). Além disso, ela cliva as cadeias laterais desses compostos, catalisa reações de abertura de anéis aromáticos, desmetoxilação e desclorinação oxidativa (CONESSA; PUNT; van den HONDEL, 2002).

No ciclo catalítico (Fig. 11) o processo é iniciado pela oxidação do sítio ativo da enzima e do ferro contido nele de  $Fe^{3+}$  para  $Fe^{4+}$ , pelo  $H_2O_2$ , gerando água e um intermediário com dois elétrons oxidados, denominado Composto I (enzima no seu estado

oxidado). Este composto oxida o álcool veratrílico ou outro substrato, gerando um substrato-radical livre e o Composto II, no qual o ferro ainda está presente como  $Fe^{4+}$ . O Composto II oxida um segundo substrato (que pode ser outra molécula de álcool veratrílico), originando outro substrato-radical livre, e a enzima retorna à sua conformação original (HAMMEL; CULLEN, 2008). O excesso de  $H_2O_2$ , associado à ausência de um substrato redutor ocasionam a oxidação do composto II a composto III, forma inativada da enzima (ESPOSITO; AZEVEDO, 2004; SILVA; GOMES, 2004; POINTING, 2001).

Geralmente, as glioxial oxidases (EC 1.2.3.5) são responsáveis pela maior parte do  $H_2O_2$  produzido; outras enzimas, como glicose oxidases (EC 1.1.3.4), aril-álcool oxidase (EC 1.1.3.7) e superóxido dismutases (1.15.1.1.) podem também responder por frações significativas da produção de peróxido (EVANS et al., 1994; POINTING, 2001).

A ação dessa enzima resulta em: oxidação de álcoois benzílicos, quebra de cadeias aromáticas, desmetilação, rearranjos intramoleculares e quebra de anéis em compostos não fenólicos relacionados à lignina. O álcool veratrílico é o redutor preferido pela LiP, sendo produzido pelo fungo de degradação branca após lignólise e, aparentemente, protege a enzima contra inativação pelo excesso de peróxido de hidrogênio. Na presença de peróxido de hidrogênio, a LiP oxida o álcool a veratraldeído, reação esta comum em ensaios de atividade da LiP (DURÁN; ESPOSITO, 1997).

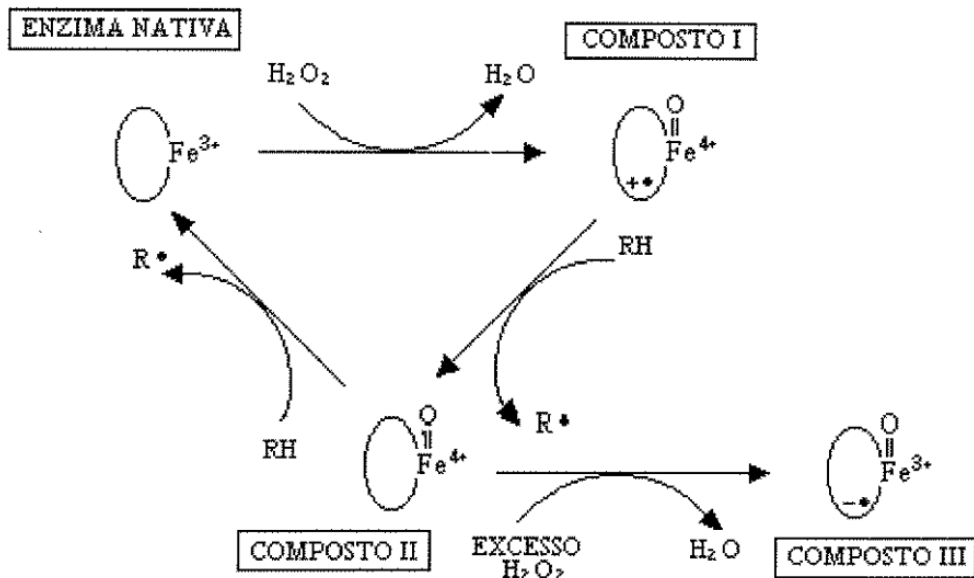
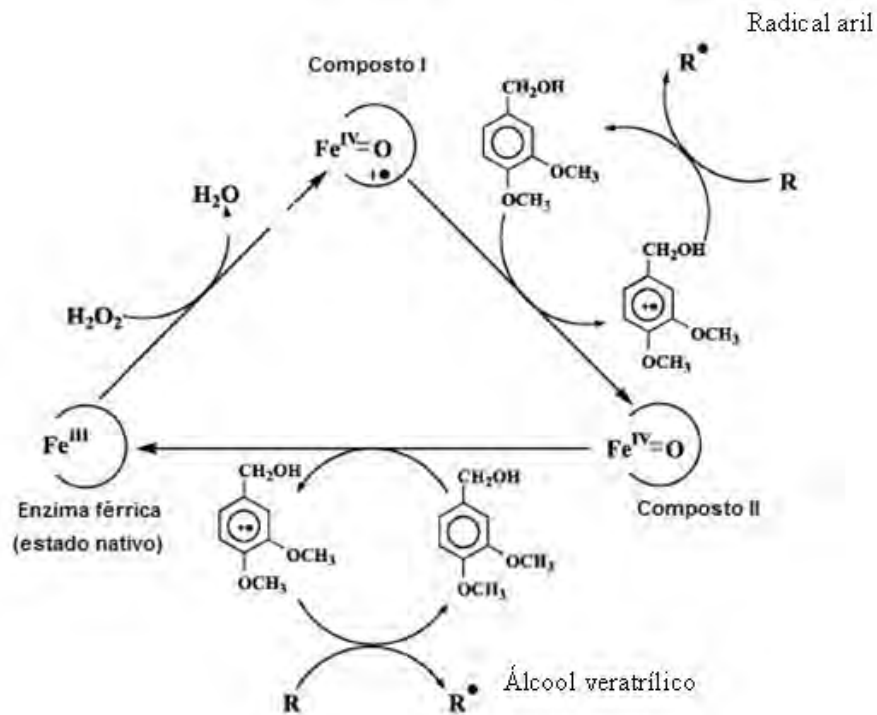


Figura 11. Ciclo catalítico da lignina peroxidase (LiP). RH representa o substrato na forma reduzida e R• representa o substrato no seu estado oxidado (CAMERON; TIMOFEEVSKI; AUST, 2000)

Uma das peculiaridades das lignina peroxidases em relação a outras peroxidases é a sua capacidade de oxidar substratos aromáticos não fenólicos metabolizados com alto potencial de oxiredução, produzindo radicais catiônicos arílicos que convergem para oxidações de alcoóis benzílicos, clivagem de ligações carbono-carbono, hidroxilações, desmetilações, abertura de anéis aromáticos e dimerizações ou polimerizações entre fenóis (ESPOSITO, AZEVEDO, 2004; PONTING, 2001). O álcool 3,4-dimetoxibenzílico ou álcool veratrílico (VA), produzido e secretado por muitos fungos ligninolíticos, pode atuar como co-substrato; oxidado pela LiP, conduz oxidações monoelétrônicas em núcleos aromáticos não fenólicos, originando radicais catiônicos, capazes de atuar em oxidações não enzimáticas posteriores. O álcool veratrílico desempenha ainda funções como indutor da enzima, além de estabilizá-la contra a inativação por níveis elevados de  $H_2O_2$  no meio reacional (MESTER; JONG; FIELD, 1995; POINTING, 2001).

#### 2.2.6.2. PEROXIDASE DEPENDENTE DE MANGANÊS (MNP)

As MnP (EC 1.11.1.13) são hemeoproteínas extracelulares, pequenas (38 – 62,5 kDa), glicosiladas e bastante semelhantes, em estrutura e função, às lignina peroxidases, sendo encontradas apenas entre fungos basidiomicetos. No entanto, com poucas exceções, não desencadeiam transformações diretas em seus substratos, em oposição à LiP. Esta função é desempenhada por complexos  $Mn^{3+}$  - ácidos orgânicos, resultantes da oxidação do  $Mn^{2+}$  pela enzima (ESPOSITO; AZEVEDO, 2004; GILL; ARORA, 2003).

Durante o ciclo catalítico, as reações envolvendo quebras de ligações carbono – carbono e aril-alquílicas em compostos fenólicos e não fenólicos, resultantes da atividade da MnP, iniciam-se pela transferência de dois elétrons do sítio ativo da enzima para o  $H_2O_2$ , resultando no composto I oxidado, denominado complexo  $Fe^{4+}$  - oxoporfirina, com liberação de água. Em seguida, o  $Mn^{2+}$  reduz o composto I a composto II e é liberado na forma de  $Mn^{3+}$ . Uma segunda redução do composto II por outro átomo de  $Mn^{2+}$  restitui a enzima à sua configuração nativa (Fig. 12). As transferências de elétrons envolvendo o manganês ocorrem na presença de radicais dicarboxílicos, como oxalato, malato, fumarato e malonato (LEONOWICZ et al., 1999).

O  $Mn^{3+}$  gerado durante o ciclo catalítico é estabilizado por quelação com ácidos orgânicos (oxalato, malonato, malato, lactato, tartarato), produzidos e secretados pelo próprio fungo. Estes íons quelados atuam como mediador redox, de baixo peso molecular, difusíveis para catalisar a oxidação, via um elétron, de compostos fenólicos da lignina, gerando radicais fenoxila (HIGUCHI, 2004; CONESSA; PUNT; van den HONDEL, 2002; LEONOWICZ, et al., 1999), amino e aril-cátions, em presença de oxigênio molecular. A atuação de ácidos orgânicos e oxigênio na liberação de íons superóxido é uma das etapas que viabilizam a abertura de anéis aromáticos; os ânions superóxido reagem com radicais aril resultantes da ação de complexos  $Mn^{3+}$ / ácido orgânico. A formação de um éter-peróxido instável desencadeia fissão da estrutura aromática (Fig 13). Alguns compostos orgânicos sulfurados e ácidos graxos insaturados também podem desempenhar papel importante, atuando como co-substratos, agindo sobre a lignina após conversão enzimática em radicais reativos (GIANFREDA; RAO, 2004; HOFRICHTER, 2002; SILVA; GOMES, 2004).

A catalise da MnP é similar ao de outras peroxidases, como a LiP mas, nesse caso, os compostos I e II da MnP oxidam  $Mn^{2+}$  (CONESSA; PUNT; van den HONDEL, 2002). A presença de um excesso de peróxido promove a conversão da enzima ao composto III, forma cataliticamente inativa (HOFRICHTER, 2002; SILVA; GOMES, 2004).

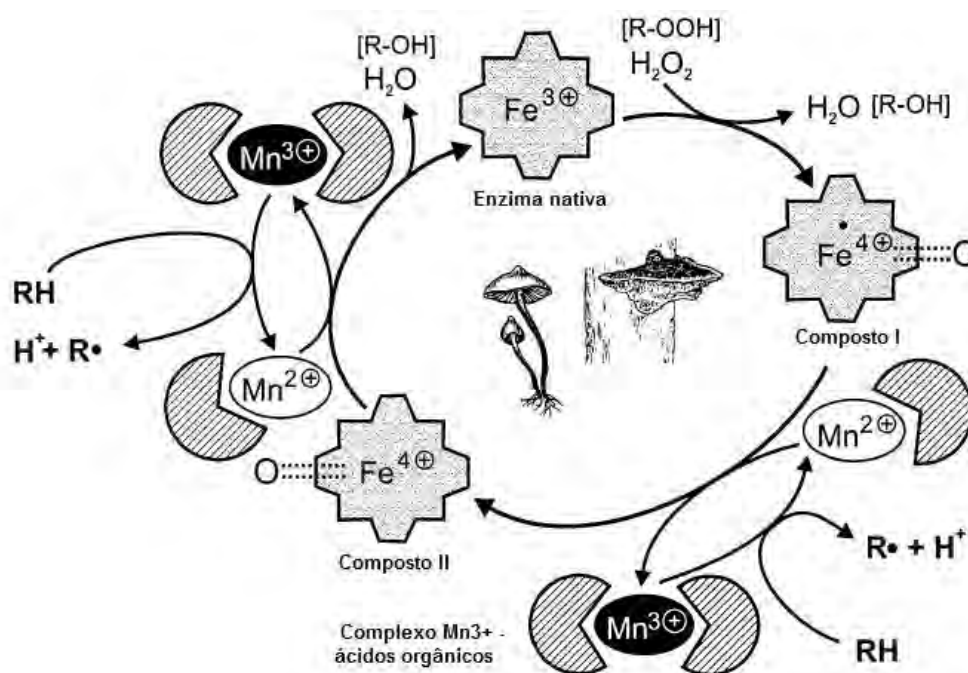


Figura 12. Ciclo catalítico das peroxidases dependentes de manganês (HOFRICHTER, 2002)

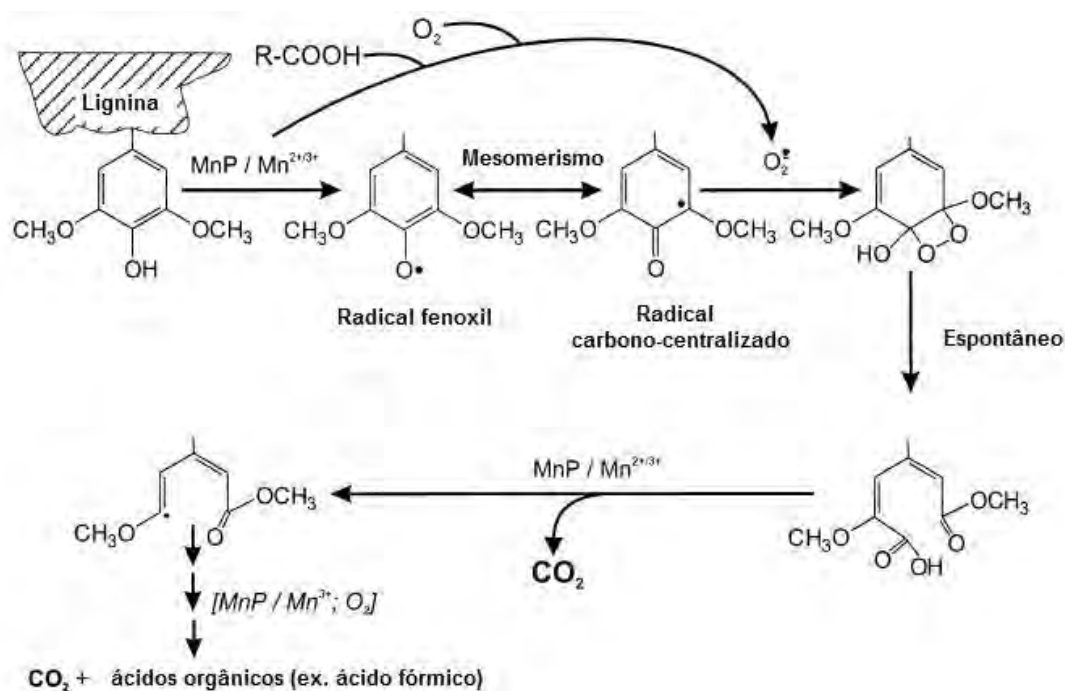


Figura 13. Representação de uma das possíveis vias de abertura do anel fenólico na lignina por ação de manganês peroxidases (HOFRICHTER, 2002).

### 2.2.6.3. LACASE

As lacases (p-difenol:oxigênio oxidorreduzases, EC 1.10.3.2) são polifenol oxidases glicosiladas formadas por 520 a 550 resíduos de aminoácidos, exibindo peso molecular médio de 60 a 80 kDa e encontradas sob a forma monomérica ou homodimérica. Elas pertencem à família das multicobre oxidases azuis por possuírem 4 átomos de cobre distribuídos em 3 domínios de seu sítio ativo (T1, T2 e T3). O cobre localizado no sítio T1 é o responsável pela forte absorção da enzima na faixa dos 600 nm; no entanto já foram descritas lacases deficientes de cobre em T1, chamadas de lacases brancas, devido à ausência da absorbância característica na faixa do azul (BALDRIAN, 2006; DURÁN; ESPOSITO, 2000; MOUGIN et al., 2003). Elas catalisam a oxidação de uma variedade de substâncias orgânicas e inorgânicas até redução do oxigênio molecular em água, por meio de sucessivas oxidações monoelétrônicas do substrato (variedade de substâncias orgânicas e inorgânicas). O ciclo catalítico das lacases (Fig. 14) inicia-se com a ligação de um substrato redutor em T1, no sítio ativo da enzima. O cobre ligado à T1 remove elétrons do substrato e os transfere para o

domínio trinuclear T2/T3, que reduz o O<sub>2</sub> a H<sub>2</sub>O, ao mesmo tempo em que libera o substrato oxidado. Os radicais formados deflagram reações não enzimáticas que envolvem quebras alquil-arílicas, polimerização de compostos fenólicos e anilinas, oxidações nos C $\alpha$  e desmetilações (BALDRIAN, 2006). O mecanismo de catálise está fundamentado na redução tetraeletrônica do oxigênio molecular formando água, às custas de sucessivas oxidações monoelétrônicas do substrato (BALDRIAN, 2006; MOUGIN et al., 2003).

Estas enzimas são amplamente distribuídas entre vegetais, nos quais estão envolvidas nos processos de biossíntese da lignina e em fungos, desempenhando funções relacionadas à morfogênese, pigmentação, interação com a planta hospedeira, no caso de fitopatógenos, e degradação da lignina por microrganismos saprofitos, especialmente basidiomicetos (BALDRIAN, 2006; YOUN; HAH; KANG, 1995). As lacases são encontradas em vegetais e microrganismos, com destaque para os fungos filamentosos, que sintetizam uma ou mais formas induzíveis ou constitutivas das enzimas, envolvidas na morfogênese, síntese de pigmentos, interações parasito-hospedeiro e degradação da lignina (CLAUS, 2003).

Entre os chamados grupos fisiológicos de fungos, as lacases são mais difundidas entre basidiomicetos causadores da degradação branca, nas formas intra e extracelular. As formas citoplasmáticas geralmente representam uma pequena fração da atividade total, e estariam envolvidas com modificações de componentes fenólicos celulares, enquanto as extracelulares atuam sobre a lignina e outros substratos de alto peso molecular (BALDRIAN, 2006).

As lacases apresentam expressão muitas vezes constitutiva, que aliada à indução em presença de compostos xenobióticos no meio de crescimento dos microrganismos, atestam as potencialidades singulares destas enzimas como ferramentas da engenharia bioquímica voltadas para a biorremediação (GORBATOVA et al., 2006).

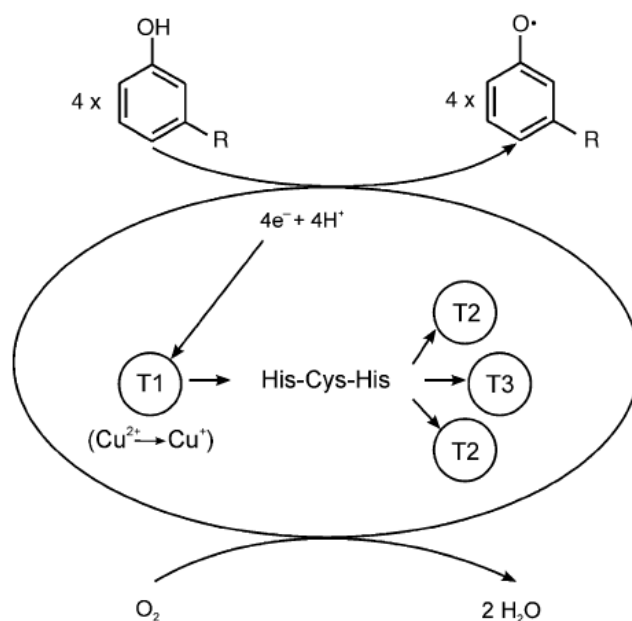


Figura 14. Ciclo catalítico das lacases evidenciando sua atuação direta sobre substratos fenólicos. His-Cys-His correspondem à disposição dos principais aminoácidos no sítio ativo (BALDRIAN, 2006)

As oxidações resultantes da atividade das lacases podem ocorrer diretamente, por interação enzima-substrato, quando se trata de compostos fenólicos. Em razão do baixo potencial de oxidorredução (450-800mV), estas enzimas são incapazes de atuar diretamente sobre moléculas aromáticas não-fenólicas, havendo a necessidade de uma molécula mediadora para a degradação dos mesmos. Nesse mecanismo lacase-mediador, os mediadores oxidam substratos de alta massa molecular (BALDRIAN, 2006). Os mediadores são, de modo geral, substâncias de baixo peso molecular, secretadas pelo próprio fungo, que quando oxidados pelas lacases, são capazes de oxidar compostos que não seriam alvos diretos da enzima.

Em trabalho realizado com lacases purificadas de *Coriolus versicolor*, Bourbonnais e Paice (1988) evidenciaram a atuação das lacases sobre substratos não fenólicos, quando em presença de uma molécula mediadora. O fenômeno da mediação (Fig 15) amplia significativamente a gama de substratos das lacases (ESPOSITO; AZEVEDO, 2004; LEONOWICZ et al., 1999; SILVA R; GOMES, 2004).

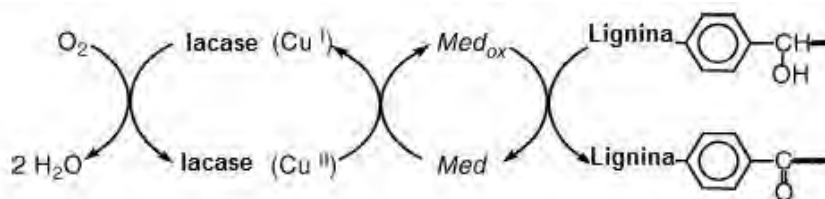


Figura 15. Mecanismo de reação lacase-mediador (Med); estruturas não fenólicas podem ser oxidadas por ação do mediador. (BRANCHI et al., 2005)

### 2.3. FILO BASIDIOMYCOTA - PRODUÇÃO E APLICAÇÕES INDUSTRIAIS DAS LIGNINASES

Muitos microrganismos decompositores de materiais lignocelulósicos vêm sendo selecionados para serem utilizados como produtores de enzimas, em condições de crescimento específicas, utilizando os resíduos e subprodutos agrícolas (SCHIMIDT et al., 2001; XAVIER-SANTOS et al., 2004; ABRAHÃO, 2007).

O filo Basidiomycota é caracterizado por espécies capazes de formar estruturas denominadas basídios, nas quais ocorre cariogamia e meiose espórica, originando basidiósporos (Fig 16). Acredita-se que exista mais de 200.000 espécies de basidiomicetos ligninolíticos, a maioria dos quais estariam nas regiões tropicais e subtropicais do mundo (BONONI, 1997).



Figura 16. Aspecto macroscópico do basidioma de algumas espécies isoladas na região noroeste do Estado de São Paulo (retirado de ABRAHÃO, 2009). 130 *Coriopsis caperata*; 144a *Polyporus tenuiculus*; 145a *Pycnoporus sanguineus*.

Dependendo do aparato enzimático que possuem, os fungos lignícolas podem ser classificados dentro dos causadores de podridão parda, quando secretam enzimas que degradam, principalmente, a celulose e a hemicelulose; e causadores de podridão branca, quando degradam lignina, celulose e hemicelulose da madeira. O tipo de podridão também é considerado um caráter de grande importância taxonômica. Estas denominações referem-se ao aspecto final do substrato após a decomposição. Na decomposição parda, o substrato decomposto adquire aspecto castanho, quebradiço, fendido e rachado no sentido das fibras, devido à presença da lignina residual. A decomposição branca caracteriza-se pela perda gradual das propriedades de resistência da madeira, que torna-se esbranquiçada e de aparência macia, fibrosa e esponjosa (GILBERTSON, RYVARDEN, 1986; RYVARDEN, 1991; BLANCHETTE, 1995; XAVIER-SANTOS, 2003).

A natureza filamentosa e a capacidade de colonização e desenvolvimento dos fungos basidiomicetos, associados à produção das enzimas ligninolíticas de forma constitutiva ou induzida (geralmente pela escassez de matéria orgânica), fazem deste grupo de microrganismos uma ferramenta entre as novas tecnologias de baixo impacto para recuperação ambiental e outros processos biotecnológicos. No entanto, como a atuação das oxidoredutases sobre os substratos aromáticos é de natureza inespecífica, a compreensão das rotas de degradação e o monitoramento dos produtos da ação enzimática são necessários para cada caso, a fim de atestar a segurança e a afetividade do processo.

Alguns autores ressaltam a importância dos basidiomicetos lignocelulolíticos na natureza, afirmando que sem sua atuação na degradação da lignina, não seria possível a vida no planeta, o qual não passaria de um imenso depósito de troncos e resíduos, que permaneceriam por séculos (BONONI, 1997).

Basidiomicetos apresentam ampla distribuição nos biomas terrestres possuindo papel fundamental na degradação da celulose e lignina de materiais vegetais lenhosos e, portanto, na ciclagem de nutrientes e na manutenção dos ecossistemas (RAYNER, 1995).

A maioria das espécies é saprotrófica, mas algumas são parasitas. Enquanto algumas são extremamente agressivas, estabelecendo-se na árvore ainda viva ou recém morta, outras são colonizadoras secundárias e se estabelecem apenas após a colonização do substrato por outras espécies (RYVARDEN, 1991).

Compreendendo organismos extremamente diversificados, o grupo pode ser caracterizado como organismos eucarióticos, heterotróficos, que desenvolvem filamentos ramificados (ou mais raramente unicelulares) e a reprodução por esporos bastante variada, com ciclos de vida bem distintos (KIRK et al., 2008).

O número de fungos de podridão parda é significativamente menor que o número de fungos causadores de podridão branca, em torno de 6% do total de basidiomicetos lignícolas e está associado, principalmente, à decomposição de coníferas no Hemisfério Norte, enquanto que em regiões tropicais este índice é ainda menor, em torno de 2% (RYVARDEN, 1991).

Um dos fungos mais estudados na degradação preferencial de lignina é o basidiomiceto *Phanerochaete chrysosporium*, embora outros fungos como *Pleurotus* spp., *Dichomitus squalens*, *Trametes versicolor*, *Lentinula edodes* e *Ganoderma applanatum* sejam também amplamente mencionados para a fermentação de substratos lignocelulolíticos em estado sólido (SILVA; MELO; VIEIRA, 2003; RODRÍGUEZ-COUTO; SANROMÁN, 2005; SILVA; MACHUCA; MILAGRES, 2005; LECHNER; PAPINUTTI, 2006; PAPINUTTI; FORCHIASSIN, 2007; ELISASHVILI et al., 2008a).

Um dos processos tecnológicos mais importantes do ponto de vista econômico é o cultivo para produção de basidiomas comestíveis, capaz de converter resíduos lignocelulósicos de difícil degradação (BOOMINATHAN; REDDY, 1992; KIRK, 1993; MATHEUS; OKINO, 1998).

Espécies causadoras de podridão branca, por possuírem sistema enzimático capaz de degradar substâncias de estruturas tão complexas quanto à lignina, vêm sendo utilizadas em processos de tratamento de efluentes têxteis e na biorremediação de solos contaminados. Estas espécies também possuem potencial de aplicação na indústria papeleira no tratamento de efluentes e no processo de fabricação de papel, atuando na liberação das fibras da madeira após a delignificação e na fase de branqueamento, substituindo com enorme vantagem o uso de substâncias químicas, principais causadoras de poluição da água (ESPOSITO; CANHOS; DURÁN, 1991; BOOMINATHAN; REDDY, 1992; KANTELINEN, 1992; KIRK, 1993; HAMMEL, 1995; DURAN; ESPOSITO, 1997; BALAN, 1998; MATHEUS, 1998; 2003; BAKSHI; GUPTA; SHARMA, 1999; MATHEUS; BONONI; MACHADO, 2000; GUGLIOTTA, 2001).

### 2.3.1. PROCESSO DE FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO

Diante da possibilidade de se utilizar enzimas como aditivos em suplementos e rações, uma variável importante é o custo das mesmas. Considerando-se que os processos de

produção ainda são bastante onerosos, e que o meio de fermentação é um dos componentes importantes para preço final do produto, faz-se necessária a busca de substratos de baixo custo e alto rendimento para o processo fermentativo.

Nesse aspecto, dentre os processos usados para a produção de enzimas, a fermentação em estado sólido (FES), definida como aquela que envolve o crescimento de um microrganismo sobre um substrato sólido, que pode ser usado como fonte de carbono e energia ou mesmo como suporte inerte, com mínima quantidade de água livre entre as partículas (GUTIERREZ-ROJAS; FAVELA-TORRES, 1992; CANNEL; MOO-YONG, 1980; LONSANE et al, 1992; MITCHELL et al, 2002; PANDEY, 2002), é atrativa devido a muitas vantagens, principalmente, o uso de meio a base de resíduos sólidos agrícolas e agro-industriais para crescimento microbiano.

A utilização destes materiais como substratos alternativos para o cultivo de microrganismos, é economicamente importante para minimizar problemas ambientais gerados pela deposição desses resíduos nos ecossistemas (RODRIGUEZ-COUTO; SANROMÁN, 2005; PANAGIOTOU et al., 2003; PANDEY, 2002; PANDEY; SOCCOL; MITCHELL, 2000; HESSELTINE, 1972), além de viabilizar a produção de biomassa microbiana e variados produtos como, álcoois, polissacarídeos, enzimas e outros metabólitos secundários (REDDY et al, 2003).

Com o advento das inovações biotecnológicas, principalmente na área de enzimas e tecnologia de fermentação, muitos caminhos novos têm sido abertos para a aplicação da FES. Ela ocupa um enorme potencial para a produção de várias enzimas, e pode ser de especial interesse, principalmente nos processos onde o produto fermentado bruto possa ser usado diretamente como fonte de enzimas. Além do mais, ela faz uso de substratos facilmente disponíveis e de baixo custo, podendo se tornar economicamente vantajosa para aplicação na produção pecuária bovina.

Os materiais lignocelulósicos possuem a lignina como barreira para os microrganismos, e esta molécula complexa é incapaz de servir a eles como única fonte de carbono e energia. Os fungos da decomposição branca são capazes de degradar a lignina para alcançar outras fontes de carbono presentes na madeira, que são fontes de carbono mais facilmente assimiláveis, assim a presença de um sistema de ligninases é necessária para o processo de degradação (LECHNER; PAPINUTTI, 2006).

Dentre as características da FES, a alta atividade de água do meio sólido influencia determinados aspectos fisiológicos dos microrganismos, tais como, crescimento vegetativo, esporulação (esporos mais estáveis e resistentes à desidratação) e germinação de esporos

(superiores taxas de germinação) (HÖLKER; LENZ, 2005). Outro fator importante a ser considerado na FES é a aeração. A oxigenação, a remoção de CO<sub>2</sub>, a dissipação de calor (regulação da temperatura do meio), a distribuição do vapor d'água (regulação da umidade) e a distribuição de compostos voláteis produzidos durante o metabolismo estão amplamente relacionados à aeração. A taxa de aeração depende da porosidade do substrato, e esta deve ser regulada para cada tipo de substrato, microrganismo e processo (CHAHAL, 1987).

Apesar de atrativa e vantajosa, a FES apresenta desvantagens na ampliação de escala, no controle dos parâmetros do processo fermentativo (pH, temperatura, umidade e crescimento celular), apresenta baixa homogeneidade e necessita de volumes relativamente grandes de inoculo. O principal problema associado à ampliação de escala na FES é a remoção do calor gerado pelas atividades metabólicas dos microrganismos. As altas temperaturas nos processos fermentativos podem comprometer o metabolismo microbiano e desnaturar enzimas, de modo que o controle desta variável é chave para ter um processo estável e de produtividade elevada (RANI et al., 2009).

Os fungos filamentos são considerados melhor adaptados ao processo de FES porque têm facilidade de acesso ao substrato, uma vez que as hifas do micélio penetram nos tecidos vegetais melhor do que bactérias e actinomicetos e dessa forma, têm acesso ao conteúdo celular indisponível para outros microrganismos do mesmo ambiente. A colonização se dá pelo crescimento das hifas na superfície externa e interna das partículas (SANTOS et al, 2004). Cabe ainda considerar que, o crescimento das hifas e sua retenção no substrato sólido elevam o nível proteico do material sólido fermentado o qual pode vir a constituir em um interessante ingrediente nutricional para dieta dos ruminantes.

Uma vez que o interesse pela produção de enzimas por fermentação sólida tem crescido significativamente no mundo, acompanhada pela crescente importância industrial das enzimas, o uso deste tipo de fermentação, associado ao aproveitamento de substratos facilmente disponíveis e de baixo custo, como os resíduos agro-industriais, pode tornar essa técnica economicamente vantajosa para aplicação na produção pecuária bovina. Para os países subdesenvolvidos, ou em fase de crescimento, onde a crise atual e a globalização da economia mundial não permitem que todo o setor agropecuário acompanhe evolução biotecnológica, estes processos apresentam uma oportunidade a ser considerada.

Atualmente, inúmeras enzimas extraídas de microrganismos têm sido usadas com sucesso na indústria, em decorrência do desenvolvimento dos processos biotecnológicos. A obtenção de enzimas despolimerizantes de material vegetal como celulases, xilanases, pectinases e ligninases, pelo crescimento de microrganismos em materiais lignocelulósicos,

tem tido grande importância considerando as inúmeras aplicações industriais das mesmas, além de agregar valor aos resíduos agrícolas.

Ao contrário das hidrolases, a produção de enzimas ligninolíticas é muito alta na maioria dos basidiomicetos, mesmo quando seus genes são expressos em organismos heterólogos (WONG, 2009).

O rendimento das enzimas é dependente da espécie e da linhagem, e a seleção de novos microorganismos com uma síntese aumentada dessas enzimas é possível. Por exemplo, em um programa de triagem a atividade de lacase de basidiomicetos estudados variou de 340 a 62.000 U/l. Os substratos lignocelulósicos, alguns dos quais contêm concentrações significativas de carboidratos solúveis e indutores, têm papel crucial na produção das enzimas. Dessa forma, a substituição de um resíduo por outro pode levar a uma produção com altos rendimentos. Microelementos e compostos aromáticos melhoram a síntese de enzimas ligninolíticas, embora seus efeitos sejam muito específicos dependendo das peculiaridades fisiológicas de cada fungo. O calor e o estresse químico do fungo podem ser uma poderosa ferramenta de regulação da secreção de lacase e manganês peroxidase. Os estudos ressaltam que a expressão do potencial biossintético dos basidiomicetos depende do método de cultivo do fungo (ELISASHVILI et al, 2008a).

A produção de enzimas por processos fermentativos é um vasto campo da biotecnologia que resta muito ainda para se conhecer e explorar, principalmente quando se trata da utilização de resíduos agroindustriais (RODRIGUES-COUTO; SANROMÁN, 2005). Dessa forma, a pesquisa da produção de enzimas despolimerizantes de material vegetal, a partir de basidiomicetos, em FES de resíduos agro-industriais, para utilização em dietas de ruminantes pode ser um processo vantajoso. Primeiro, porque pode vir melhorar a digestibilidade da forragem consumida ou transformar o substrato lignocelulósico em alimento de alta qualidade para ruminantes e segundo, converter resíduos em produtos de maior valor agregado (EL-NASSER; HELMY; EL-GAMMAL, 1997).

### 2.3.2. RESÍDUOS E SUBPRODUTOS AGROINDUSTRIAIS

A economia brasileira é intensamente baseada na produção agrícola, sendo as principais colheitas as de algodão, milho, soja, cana, café, trigo e citrus. Segundo o sétimo

levantamento da safra 2009/2010 realizado pela CONAB no mês de abril, a produção de grãos foi estimada em 146,31 milhões de toneladas. O processamento industrial desses alimentos destinados para a nutrição humana e o consumo animal resulta em altas quantidades de resíduos agroindustriais.

Os resíduos da agroindústria, como palhas, bagaços, têm aproveitamento limitado principalmente pelo alto teor de lignina. Este material é pouco aproveitado sendo que uma parte é usada para geração de energia elétrica em algumas indústrias como as sucroalcooleiras, enquanto outra grande parte é queimada ou simplesmente fica disponível no campo tornando-se, muitas vezes, um poluente ambiental.

Considerando o total da produção, uma pequena quantidade desses resíduos, é utilizada na alimentação de animais de produção (GRAMINHA et al., 2008). Muitos desses resíduos têm um potencial nutricional, principalmente na formulação de dietas para gado, e estão recebendo melhor atenção em termos de controle de qualidade e têm sido classificados como subprodutos ou co-produtos agroindustriais (EUN et al. apud GRAMINHA et al., 2008). Entretanto, sua utilização na alimentação animal irá depender de uma série de fatores dentre eles, suas características nutricionais (alta e baixa qualidade) e o custo de transporte e preparo desses resíduos.

Independente dos problemas conceituais existentes em relação aos termos resíduo e subproduto significarem materiais desejáveis ou não do ponto de vista econômico e ecológico, estes tendem a ser considerados cada vez mais, componentes importantes do processo produtivo, em decorrência dos volumes gerados, da crise energética mundial, da crescente preocupação com a redução da capacidade de suporte dos ecossistemas e dos efeitos planetários do mau uso dos recursos naturais. O Brasil, como país tropical, apresenta excelentes condições para a exploração de ruminantes em pastagens, porém no período da seca, a dificuldade de adquirir alimentos volumosos em regiões áridas e semi-áridas, torna-se uma árdua e difícil tarefa para muitos produtores rurais (SOUZA, 2008). Neste contexto, os resíduos e os subprodutos agroindustriais, como as palhas, o bagaço de cana-de-açúcar, cascas e outros, podem oferecer excelente opção como alimentação alternativa para os ruminantes, desde que tratados adequadamente.

Esses “alimentos”, de um modo geral, são extremamente pobres em nitrogênio, podem apresentar grande diferença em seu valor nutricional, possuem baixa digestibilidade e pouca aceitabilidade, razão pela qual sua ingestão voluntária é limitada. Isto dificulta o atendimento das necessidades dos animais que as consomem, quando administradas como fonte única de nutrientes. O consumo é influenciado por fatores que afetam o processo de digestão

(maturidade da forragem, valor nutritivo e digestibilidade), fatores que afetam o processo de ingestão (facilidade de apreensão e colheita da forragem durante o pastejo) e fatores que afetam os requerimentos nutricionais (estágio fisiológico e o nível de desempenho dos animais). Materiais lignocelulósicos, quando são administrados na alimentação animal, sem um balanceamento dos nutrientes proporcionam insuficientes quantidades de minerais, energia e proteínas para manter o peso corporal dos animais (SOUZA, 2008).

#### 2.4. A BOVINOCULTURA BRASILEIRA

O Brasil possui um dos maiores rebanhos bovino comercial do mundo, com aproximadamente 200 milhões de cabeças (IBGE, 2007). Desse total, 85% são representados por rebanhos de corte e 15% por rebanhos leiteiros (CABRAL et al, 2008). Na economia, a pecuária brasileira representa próximo a 8% do PIB (Produto Interno Bruto), sendo o país um forte exportador de carne bovina.

O maior rebanho bovino está localizado na Região Centro-Oeste do País, que concentra 34,7% do efetivo nacional em três estados (Mato Grosso, Mato Grosso do Sul e Goiás). Grande parte dos sistemas de produção de carne bovina no país caracteriza-se pela dependência quase que exclusiva de pastagens, que ocupa cerca de 70% das áreas destinadas à produção agropecuária (IBGE, 2007).

Os ruminantes se adaptaram em função do tipo de alimento disponível e não são capazes de produzir as enzimas necessárias para o processo de digestão da fibra no rumen, mas permitiram o desenvolvimento de importantes populações de microrganismos que realizam essa função. O principal interesse produtivo do ruminante está na capacidade de aproveitar os nutrientes da degradação microbiana. No rúmen e no ceco, o desenvolvimento desta microbiota permite o aproveitamento eficiente de vários nutrientes, principalmente para produção de energia, essencial na manutenção corporal e produção do bovino, demonstrando assim a simbiose com o animal (ARCURI et al. apud BERCHIELLI et al., 2006).

Dentro desse aspecto, o ecossistema ruminal é constituído por 2 grupos distintos, com base na utilização das fontes de energia e carbono, compostos nitrogenados e eficiência de crescimento:

- Os microrganismos que fermentam carboidratos não fibrosos – fermentadores de amido, pectina e açúcares solúveis, e utilizam amônia (NH<sub>3</sub>), aminoácidos e peptídeos como fontes de nitrogênio e crescem rapidamente.

- Os microrganismos que fermentam carboidratos fibrosos – fermentam especificamente a celulose e hemicelulose, utilizam NH<sub>3</sub> como fonte primária de nitrogênio para a síntese de proteína e apresentam lento crescimento.

O rúmen (Fig. 17) é um ecossistema anaeróbio, definido como uma câmara de fermentação estável (temperatura, pressão osmótica, equilíbrio iônico) capaz de fornecer substratos à microbiota (nutrientes na forma do alimento e água recém ingeridos) e, ainda, remover os subprodutos da fermentação (ácidos graxos voláteis - AGV, células microbianas, resíduos não digeridos) (ARCURI et al. apud BERCHIELLI et al., 2006).

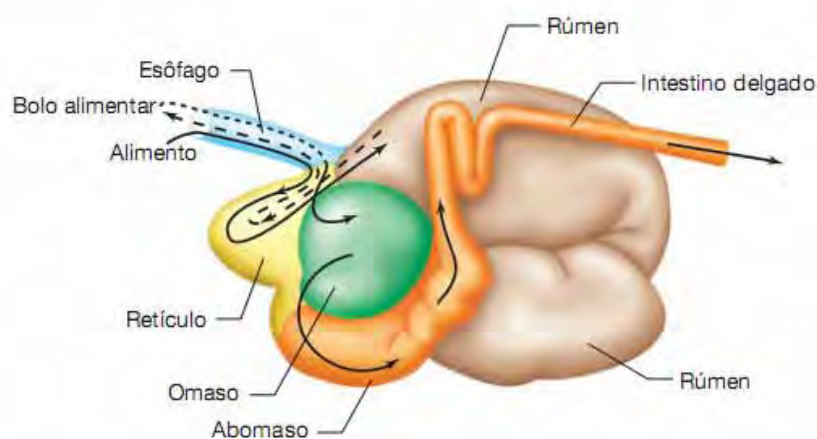


Figura 17. Diagrama esquemático do rúmen e sistema gastrointestinal de um bovino (MADIGAN et al., 2004)

A composição e proporção de microrganismos no rúmen varia de acordo com a dieta (complexidade do substrato), com a interação microrganismo x animal hospedeiro e localização geográfica (CHEN et al., 2008). A microbiota ruminal é constituída de três principais microrganismos: bactérias, fungos e protozoários.

A população bacteriana é a mais diversa no rúmen, tanto em termos de número de espécies quanto em tipos metabólicos. O número total de espécies ruminais ainda não é conhecido, porém mais de 400 já foram isoladas dos tratos digestórios de diferentes animais.

Os principais grupos de bactérias ruminais estão relacionados com o processo de degradação da fibra vegetal. Entre esses grupos destacam-se:

Bactérias fermentadoras de carboidratos estruturais (celulolíticas ou fibrolíticas). Estas bactérias hidrolisam a celulose por meio das celulases, que na maioria das bactérias celulolíticas estão associadas às células aderidas firmemente às partículas fibrosas do conteúdo ruminal. As espécies celulolíticas produzem, principalmente, acetato, propionato, butirato, succinato, formato,  $\text{CO}_2$  e  $\text{H}_2$ . São liberados também etanol e lactato (HUNGATE apud BERCHIELLI et al, 2006). Segundo vários autores citados por Krause e colaboradores (apud BERCHIELLI et al, 2006), as principais espécies celulolíticas são *Ruminococcus flavefaciens*, *Ruminococcus albus* e *Fibrobacter succinogenes*.

Bactérias fermentadoras de carboidratos não estruturais (Amilolíticas e Pectinolíticas): são as responsáveis pela fermentação do amido e pectina. O amido é fermentado por espécies do gênero *Bacteroides* enquanto a pectina é fermentada pelas espécies *Lachnospira multiparus* e *Streptococcus bovis* (também fermentador do amido) e algumas espécies celulolíticas.

Bactérias proteolíticas: são capazes de degradar proteína

Bactérias lipolíticas: hidrolisam os lipídeos no rúmen, embora este grupo de bactérias não seja muito numeroso pelo fato do ambiente ruminal apresentar baixo potencial de oxidorredução, característico de ambientes anaeróbios.

Distintos filogeneticamente das bactérias, o Domínio Archaea inclui microrganismos Metanogênicos (anaeróbios estritos) capazes de produzir metano. Estes microrganismos são especialmente importantes para o ecossistema ruminal, pois tem um papel importante na regulação da fermentação pela remoção das moléculas de  $\text{H}_2$ , em contínuo processo, que representa uma significativa perda de energia pelo animal (DEHORITY apud OLIVEIRA et al., 2007). Praticamente todo o metano é produzido pelas reações de redução de  $\text{CO}_2$  acoplada ao fornecimento de elétrons pelo  $\text{H}_2$ . O gênero *Methanobacterium* desempenha importante papel no equilíbrio químico no ecossistema ruminal ao utilizar o  $\text{H}_2$  presente no meio, contribuindo para a regeneração de co-fatores, como  $\text{NAD}^+$  e  $\text{NADP}^+$  (ARCURI apud BERCHIELLI et al., 2006).

Os protozoários presentes no rúmen são organismos eucariotos unicelulares, anaeróbios, não patogênicos, que têm as bactérias como a fonte principal de nitrogênio (WILLIAMS, apud OLIVEIRA et al., 2007). Alguns protozoários são celulolíticos, mas os principais substratos utilizados por eles como fonte de energia são os açúcares solúveis e amido, que são assimilados rapidamente e estocados na forma de amilopectina.

Os fungos anaeróbios encontrados no rúmen desempenham um importante papel na degradação da fibra, incluindo a degradação parcial da lignina, hemicelulose e pectinas (MADIGAM et al., 2004) e estão presentes em grande número quando a dieta é rica em forragens. Os zoósporos móveis aderem-se aos fragmentos das forragens colonizando-os, invadindo os tecidos vegetais através de talos e rizóides (BAUCHOP apud BERCHIELLI et al, 2006).

A ação dos fungos sobre a parede vegetal diminui a rigidez estrutural das forragens (BORNEMAN apud FONDEVILA, 1998), e favorece sua ruptura em partículas aumentando também a superfície acessível para a ação das bactérias. Estudos com culturas puras revelam que estes são capazes de fermentar a celulose em AVGs. *Neoclimastix* sp, por exemplo, é um fungo anaeróbio obrigatório que fermenta glicose em formato, acetato, lactato, etanol, CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>. Embora seja um eucarioto, este fungo é desprovido de mitocôndrias e citocromos, apresentando assim uma existência fermentativa obrigatória (FONDEVILA, 1998).

Cheng e Costerton (apud BERCHIELLI et al, 2006) dividem a microbiota em três populações básicas: a população do líquido ruminal, a dos microrganismos aderentes à fração sólida da digesta e a população ligada à parede do rúmen. A primeira compreende a porção mais investigada, devido aos métodos clássicos de coleta de amostra e cultivo do conteúdo ruminal. Os autores incluem nesta população os microrganismos aptos a colonizarem alimentos recém-ingrididos ou superfícies de tecidos recém-expostos, o que os leva a atribuir-lhes grande atividade metabólica. A população aderente à fração sólida está relacionada com a degradação dos alimentos fibrosos (STEWART apud BERCHIELLI et al, 2006). Um grupo totalmente distinto ocorre na parede do rúmen. São anaeróbios facultativos, que digerem células epiteliais mortas e apresentam importante atividade ureolítica, num ambiente situado na interface entre o tecido bem oxigenado e o conteúdo ruminal anaeróbio (CZERKAWSKI apud BERCHIELLI et al, 2006).

#### 2.4.1. EFEITO DA ADIÇÃO DE ENZIMAS NO PROCESSO DE DIGESTÃO EM RUMINANTES

A aplicação de enzimas despolimerizantes de material vegetal em nutrição animal, visando a degradação parcial de resíduos agroindustriais que servem como matéria prima para alguns tipos de ração pode aumentar o rendimento nutricional dos mesmos (PANDEY;

SOCCOL; MITCHELL, 2000). Nesse processo, os substratos lignocelulósicos tratados com enzimas lignocelulolíticas podem ser convertidos em alimento de alta qualidade para ruminantes por tornarem-se mais facilmente disponíveis para hidrólise pelos sistemas enzimáticos presentes no rumen (KARUNANANDAA; VARGA, 1996).

Para que enzimas sejam efetivas, elas precisam ter atividade e estabilidade ótima por um período maior de tempo (COLOMBATTO et al., 2004b). O uso de enzimas como aditivos de rações ou suplementos alimentares, com a finalidade de atuarem dentro do rúmen, é uma perspectiva interessante sob ponto de vista de praticidade de uso. Considerando essa possibilidade de aplicação de enzimas, fica óbvia a necessidade de que as mesmas sejam estáveis a 40°C, pH 6,0 e em condições de alta concentração de solutos. Em adição, as enzimas ainda precisam ter certa resistência à presença de sais e à ação de proteases.

Muitos trabalhos utilizando enzimas fibrolíticas exógenas para melhorar a digestão de materiais vegetais vêm sendo conduzidos nas duas últimas décadas no campo da nutrição animal. Avellaneda e colaboradores (2008) verificaram que o uso de enzimas fibrolíticas exógenas não afetou o fluxo intestinal e digestão de MS (matéria seca), MO (matéria orgânica), PB (proteína bruta) e FDN (fibra em detergente neutro). Beauchemin e colaboradores (2003) concluíram em seus estudos que a dose enzimática deve ser considerada, porque a adição de altos níveis de enzimas pode ser menos efetiva que níveis mais baixos. Jalilvand e colaboradores (2008) verificaram que a adição de enzimas (comercial) afetou a fermentação ruminal de forragens de forma diferente, conforme o conteúdo de fibra e composição dos polissacarídeos presentes, e ainda verificaram que a concentração enzimática foi um fator importante na eficácia das mesmas.

Como no Brasil grande parte dos bovinos é alimentada principalmente em pastagem, e as forragens tropicais, além de apresentarem qualidade nutricional inferior, também apresentam menores teores de proteína, a busca por enzimas despolimerizantes de material vegetal, principalmente as enzimas do complexo lignocelulolítico, é de grande importância. Entretanto, poucas são as informações publicadas em que a aplicação de enzimas fibrolíticas afetou a qualidade de forragens tropicais.

Dean e colaboradores (2008) avaliaram o efeito da amônia e enzimas fibrolíticas na composição química e degradabilidade de fenos produzidos por capins tropicais, e encontraram que a amoniação foi mais efetiva que o tratamento com preparações de enzimas comerciais. No entanto, dos preparados enzimáticos comerciais testados, a Biocelulase X-20<sup>®</sup> e a Biocelulase A-20<sup>®</sup>, mostraram-se mais promissoras por reduzirem a concentração de fibra e aumentarem a fase inicial e tardia da digestão da matéria seca in vitro.

As enzimas fibrolíticas exógenas adicionadas à dieta devem atuar em conjunto com aquelas produzidas pela microbiota ruminal potencializando a degradação de polissacarídeos estruturais e aumentando a taxa de degradação das forragens. O benefício nutricional desta suplementação parece depender de muitos fatores, muitos deles ainda sendo avaliados (WALLACE et al., 2001).

Nsereko e colaboradores (2000) relataram que produtos enzimáticos contendo xilanases e esterases tiveram efeitos estimulatórios na degradação *in vitro* do feno de alfafa, enquanto Colombatto e colaboradores (2003b) indicaram que algumas xilanases e proteases melhoraram a degradação *in vitro* do feno de alfafa. Eun e colaboradores (2006) observaram uma melhora na produção de gás nos estudos *in vitro* a partir da forragem tratada com algumas enzimas proteolíticas que continha pouca atividade polissacaridase, e também que houve diferenças na eficácia entre os tipos de proteases.

Melhorias na produção de ruminantes com suplementação de enzimas fibrolíticas são geralmente atribuídas ao aumento da digestão ruminal da fibra, mas o mecanismo pelo qual este aumento ocorre não é completamente entendido. Numerosos mecanismos potenciais têm sido propostos incluindo efeitos ruminais e pré ingestivos como hidrólise direta, mudanças estruturais na fibra, aumento da fixação microbiana ruminal, estimulação das populações microbianas ruminais e sinergismo com as enzimas microbianas ruminais. As diferenças no nível, na composição e na estrutura da fibra entre as forragens, são razões prováveis para a especificidade extensamente reconhecida entre as enzimas fibrolíticas exógenas e a composição do alimento (WALLACE et al., 2001; COLOMBATTO et al., 2003a, b). Mais evidências para a especificidade entre a atividade enzimática e composição do alimento vem dos estudos que compararam as características da digestão *in vitro* de várias forragens intactas (EUN et al, 2006; GIRALDO et al., 2007).

Eun, Beauchemin e Schulze (2007) avaliaram a degradação *in vitro* de feno de alfafa e silagem de milho utilizando várias enzimas fibrolíticas, a dose ótima de cada enzima necessária para aumentar a degradação e a relação entre a atividade enzimática e as respostas da degradação. Os autores observaram que dos cinco produtos utilizados dois apresentaram uma melhora significativa na degradação da Fibra em Detergente Neutro (FDN) e Fibra em Detergente Ácido (FDA) em ambas as forragens utilizadas. A dose ótima para este produto foi de 1,4mg/g de MS, em ambas as forragens, com aumento da digestibilidade do FDN de até 20,6% na alfafa. É importante salientar que melhorias na degradabilidade da FDN permitem o aumento na ingestão voluntária de alimento por reduzir o tamanho das partículas no rúmen. O

aumento da degradabilidade da FDN também aumenta a densidade energética das dietas e estimula a produção do nitrogênio microbiano (OBA; ALLEN, 1999).

Observações microscópicas dos volumosos estudados realizadas por Martins e colaboradores (2007) indicaram aumento da colonização microbiana sobre os diferentes tecidos com a adição de enzimas fibrolíticas (xilanase e celulase comercial), embora esses dados não tenham sido condizentes com os parâmetros de degradação ruminal, mostrando que o aumento na colonização e digestão dos tecidos observados ao microscópio eletrônico de varredura, com a adição de enzimas, não foi suficiente para gerar uma resposta efetiva sobre a degradação ruminal da fibra. Essa ausência de resposta pode estar relacionada, entre outros fatores, à quantidade de enzimas fornecidas ao animal e ao tipo de forragem avaliada. Beauchemin e Rode (1996) sugeriram que a inconsistência dos resultados decorre de diversos fatores com composição da dieta, tipo de enzima, atividade do complemento da enzima, quantidade de enzima fornecida, estabilidade da enzima e método de aplicação.

Produtos à base de enzimas fibrolíticas, tais como celulases e xilanases, há algum tempo têm sido usados como aditivos durante o processo de ensilagem com a finalidade de melhorar o processo fermentativo e as características químicas das silagens resultantes e, conseqüentemente, o desempenho animal (McDONALD; HENDERSON; HERONT, 1991). A redução dos conteúdos de fibra em detergente neutro (FDN) e de fibra em detergente ácido (FDA) da forragem ensilada é uma das vantagens a ser destacada, tendo em vista a possibilidade de aumento da ingestão e da eficiência da digestão de matéria seca (MS), quando oferecida aos ruminantes.

As gramíneas tropicais apresentam elevado potencial de produção de matéria seca, contudo seu valor alimentício não permite explorar em plenitude o potencial genético dos animais em pastejo. Nos atuais sistemas de adequação de dietas para ruminantes são necessárias informações relativas às proporções das frações dos alimentos, bem como de suas taxas de digestão, no sentido de sincronizar a disponibilidade de energia e nitrogênio no rúmen, maximizar a eficiência microbiana, a digestão dos alimentos, e reduzir as perdas decorrentes da fermentação ruminal (NRC, 2001).

O avanço da idade das plantas exerce efeito sobre a fração da parede celular. Primeiramente, a proporção de carboidratos da parede celular aumenta, mas simultaneamente as características da composição química e da digestão também são alteradas (VAN SOEST; ROBERTSON; LEWIS, 1991). Um papel menor pode ser atribuído ao tempo de colonização no rúmen. No caso de gramíneas tropicais, a produção da proteína microbiana é limitada também pelo suprimento de substratos prontamente fermentescíveis.

### 3. OBJETIVOS

#### Geral

Obtenção de preparado enzimático, com alta atividade de ligninases (manganês peroxidase, lignina peroxidase e lacase), a partir do cultivo de fungos basidiomicetos por fermentação em estado sólido utilizando-se resíduos agro industriais, que possa ter potencial de aplicação na degradação das fibras vegetais buscando aumento na digestibilidade do material lignocelulósico no rúmen.

#### Específicos

- Selecionar linhagens de basidiomicetos produtoras de ligninases, a partir de coleção de espécimes coletados na região do Noroeste Paulista, e produzir enzimas por fermentação em estado sólido utilizando como substratos, os resíduos sólidos agro-industriais farelo de algodão, farelo de trigo, polpa cítrica, polpa cítrica com farelo de algodão (1:1 p/p) e resíduo de cervejaria (bagaço de cevada).
- Avaliar o perfil de produção das ligninases (LiP, MnP e lacase) e também o perfil de produção de celulases (CMCase e Avicelase) e hemicelulases (xilanasas e pectinasas), além de quantificar os açúcares redutores e proteínas totais do extrato enzimático bruto.
- Caracterizar físico-quimicamente as enzimas produzidas quanto ao pH e temperatura ótimos para atividade, e avaliar estabilidade das enzimas frente às variações de pH e temperatura, em ausência de substrato.
- Avaliar a estabilidade das enzimas nas condições do rúmen (pH 6,0, 39-40 °C).
- Avaliar a composição do resíduo sólido, por meio de análise bromatológica, após o processo fermentativo a fim de verificar eventuais mudanças nessa composição.
- Avaliar o efeito das enzimas na hidrólise das fibras vegetais por quantificação dos açúcares redutores
- Avaliar o efeito das enzimas na digestibilidade *in vitro* da matéria orgânica das forragens e resíduos fibrosos.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. MICRORGANISMOS

Foram utilizadas 25 linhagens de basidiomicetos (Tab. 2) isoladas em projetos anteriores (XAVIER-SANTOS, 2003; ABRAHÃO, 2007), pertencentes à coleção de culturas do Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada do IBILCE/ Unesp - Campus de São José do Rio Preto. As culturas utilizadas foram mantidas por repiques sucessivos em meio Batata Dextrose Agar (Oxoid) mantidas em incubadora tipo B.O.D. a 28°C até crescimento visível do micélio e então conservadas no óleo mineral, água, e criopreservadas (- 80 °C).

Tabela 2. Basidiomicetos isolados da Estação Ecológica do Noroeste Paulista, S. J. Rio Preto que foram utilizados no projeto (XAVIER-SANTOS, 2003; ABRAHÃO, 2007).

<i>Corioloropsis byrsina</i> (SXS16)	<i>Gloeophyllum</i> (SXS 40)
<i>Schizophyllum commune</i> (SXS 38)	SXS 58
<i>Schizophyllum commune</i> (SXS 385)	SXS 59
<i>Schizophyllum commune</i> (SXS 125)	<i>Cf Perenniporia</i> (SXS 69)
<i>Pycnoporus sanguineus</i> (SXS 43)	SXS 388
<i>Pycnoporus sanguineus</i> (MCA 16)	<i>Marasmius SP</i> (SXS 214)
<i>Pycnoporus sanguineus</i> (SXS 306)	SXS 02
<i>Pycnoporus sanguineus</i> (SXS 365)	<i>Datronia stereoides</i> (Fr.) Ryvardeen (MCA 167)
<i>Pycnoporus sanguineus</i> (L.) Murril (MCA 220)	<i>Polyporus sp</i> (MCA 128)
<i>Lentinus stringellus</i> (SXS 355)	<i>Hexagonia hirta</i> (P. Beauv.) Fr. (MCA 131)
<i>Lentinus sp</i> (SXS 360)	SXS 17
<i>Dacryopinax elegans</i> (SXS 323)	SXS 80
<i>Perenniporia medullapanis</i> (SXS 358)	

### 4.2. SUBSTRATOS PARA A FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO

Os substratos utilizados para a fermentação foram: farelo de algodão (FA), farelo de trigo (FT), cevada (BC), polpa cítrica (PC) e a combinação PC+FA (1:1 p/p). Os materiais foram lavados e secos a 55 °C até peso constante, moídos e peneirados em granulometria de

aproximadamente 5 mm. Os materiais foram esterilizados em autoclave a 120 °C, por 30 minutos.

#### 4.3. OBTENÇÃO DAS ENZIMAS POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO (FES)

A FES ocorreu em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 5 g do substrato. O material foi inoculado com 2 discos ( $\pm 1,5$  cm diâmetro) de cultura pura obtidos através do crescimento do micélio em BDA, em placas de Petri (7 a 14 dias). Os substratos foram suplementados com solução de  $\text{NH}_4\text{SO}_4$  1% (p/v) e  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,01% (p/v) e água estéril (70% de umidade) (CARVALHO, 2005). O cultivo foi realizado a 28 °C, por 5 semanas (crescimento visível e amplo do micélio). A cada semana, frascos foram retirados da incubadora e 40 mL de água destilada foram adicionados ao material fermentado, sendo homogeneizado e posteriormente agitado por 40 minutos em shaker a 120 rpm. O material foi então filtrado e centrifugado a 10000 xg durante 40 minutos (2 vezes de 20 minutos), a 8°C e o sobrenadante foi utilizado como solução enzimática bruta.

#### 4.4. DETERMINAÇÃO DAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS

##### 4.4. 1. ATIVIDADES DE LIGNINASES

A atividade de peroxidase dependente de Manganês (MnP) na solução enzimática bruta foi determinada a 40°C por 10 minutos numa mistura de reação composta de tampão lactato de sódio a 50 mM (pH 4,5), solução de  $\text{MnSO}_4$  a 400 mM e 0,1 mL da solução de enzima bruta, com volume final de 1 mL. A reação foi iniciada com a adição de peróxido de hidrogênio (40  $\mu\text{M}$ ) e a absorbância medida em espectrofotômetro a 240nm. O branco foi preparado substituindo o extrato bruto por igual volume de água destilada, enquanto os controles para cada extrato enzimático foram feitos substituindo o  $\text{MnSO}_4$  nas misturas de reação descritas por água destilada. Uma unidade de atividade de enzima (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para formar 1  $\mu\text{mol}$  de  $\text{Mn}^{+3}$  por minuto, utilizando o coeficiente de extinção molar ( $\epsilon$ ) de  $8,1 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (GLENN; AKILESWAREAN; GOLD, 1986; AITKEN; IRVINE, 1990).

A atividade de Lignina peroxidase (LiP) na solução enzimática bruta foi determinada a 40°C por 10 minutos numa mistura de reação composta de tampão tartarato de sódio 50 mM (pH 3,5), solução de solução de álcool veratrílico a 40 mM e 0,1 mL da solução de enzima bruta, com volume final de 1 mL. A reação foi iniciada pela adição de peróxido de hidrogênio (0,2 mM) e o aumento da absorbância, devido à oxidação do álcool veratrílico, medido em espectrofotômetro a 310nm. O branco foi preparado substituindo o extrato bruto por igual volume de água destilada, enquanto os controles para cada extrato enzimático foram feitos substituindo o substrato álcool veratrílico por água destilada. Uma unidade de atividade de enzima (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para formar 1  $\mu$ mol de veratraldeído por minuto, considerando  $\epsilon_{310\text{nm}} = 9,3 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  para o veratraldeído (TIEN; KIRK, 1988).

A atividade de lacase foi determinada a 40°C por 1 minuto usando 2,2'-azino-bis-etilbenthiazolina (ABTS) como substrato, em mistura contendo tampão acetato de sódio 0,1M (pH 5,0), solução de ABTS a 0,03% (p/v) e 0,1 mL da solução enzimática bruta para um volume final de 1 mL (BUSWELL et al., 1995). A oxidação do ABTS foi medida pelo monitoramento do aumento da absorbância a 420 nm. Uma unidade de atividade de enzima foi definida como a quantidade de enzima necessária para oxidar 1  $\mu$ mol de ABTS por minuto, utilizando o  $\epsilon_{420} = 3,6 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  para o ABTS oxidado (BOURBONNAIS; PAICE, 1988).

#### 4.4.2. ATIVIDADE DE XILANASE, PECTINASE, CMCASE, AVICELASE

A atividade xilanase foi medida em mistura de reação contendo 0,1 mL da solução enzimática bruta e 0,9 ml de uma solução de 0,5% de xilana "birchwood" (Sigma) em tampão acetato 0,2 M e pH 5,0. Após a incubação, feita em temperatura de 40 °C por 10 minutos, os açúcares redutores foram quantificados pelo método ADNS (MILER, 1959). Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1  $\mu$ mol de xilose por minuto nas condições de ensaio.

As atividade de pectinase (exopoligalacturonase), CMCcase (endoglucanase) e avicelase (exoglucanase) foram determinadas pelo mesmo procedimento descrito para xilanase, exceto que os substratos utilizados foram pectina comercial de alta esterificação, carboximetilcelulose (CMC – Sigma) e avicel (Merck), respectivamente, e os açúcares

reduzidos foram quantificados a partir da curva padrão de glicose (CMCase e avicelase) e do ácido galacturônico (pectinase).

#### 4.4.3. ATIVIDADE DA FERULOIL ESTERASE

A atividade de feruloil esterase (FAE) foi determinada através da medida de produção de 4-Nitrofenil do 4-Nitrofenil ferulato. A solução de substrato foi preparada pela mistura de 9 volume de tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 6,5, contendo 2,5% de Triton X-100 com 1 volume de 4 - Nitrofenil ferulato 10,5 mM em DMSO. A mistura de reação foi composta de 0,1 mL de enzima e 2 mL da solução de substrato, a mesma foi mantida a 40 °C por 60 minutos. A leitura da absorbância foi realizada a 410 nm de acordo com o método proposto por Mastihuba (2002). Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1,0  $\mu$ mol de 4-Nitrofenil por minuto, sob as condições de ensaio.

#### 4.5. OUTROS MÉTODOS ANALÍTICOS

A determinação dos teores de proteínas solúveis da solução enzimática bruta foi feita através do método de Bradford (1976), usando soro albumina bovina como padrão.

A determinação de açúcares redutores totais foi feita seguindo as metodologias de Somogy-Nelson (1952) e ADNS de Miller (1959).

#### 4.6. CARACTERIZAÇÃO DA LACASE PRODUZIDAS POR FES

##### 4.6.1. DETERMINAÇÃO DO pH E TEMPERATURA ÓTIMOS PARA A ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Para a determinação do pH ótimo para a atividade da enzima, foram utilizadas as soluções tampão com pH entre 4,0 e 7,0 (4,0 a 5,5 tampão acetato 0,25M; 5,5 a 7,0 tampão citrato fosfato 0,25M), seguindo-se o procedimento do item 4.1 e 4.2.

Para a determinação das temperaturas ótimas, as misturas da reação foram incubadas em temperaturas entre 35 °C a 60 °C, no pH ótimo de atividade das enzimas, por 10 minutos, seguindo-se o procedimento do item 4.1 e 4.2.

#### 4.6.2. ESTABILIDADE DAS ENZIMAS FRENTE ÀS VARIAÇÕES DE pH E TEMPERATURA

Para este estudo, foi utilizado o tampão McIlvaine com pH 2,5 a 8,0, 0,1M. Uma alíquota de 0,5 mL de solução enzimática bruta foi misturada a 0,5 mL de tampão em cada valor de pH, sendo a mistura mantida a 25 °C por 24 horas. Após esse período, a atividade residual foi determinada no pH e temperatura ótimos de cada enzima, seguindo-se o procedimento dos itens 4.1 e 4.2.

O efeito da temperatura sobre a estabilidade das enzimas foi avaliado incubando-se as soluções enzimáticas, em ausência de substrato, em temperaturas de 30 °C a 60 °C por uma hora, sendo o controle a atividade da enzima não incubada. A atividade residual foi determinada na temperatura e pH ótimos de cada enzima, seguindo-se o procedimento dos itens 4.1 e 4.2.

#### 4.7. AVALIAÇÃO DAS ENZIMAS QUANTO À ESTABILIDADE EM FLUIDO RUMINAL

As enzimas CMCase, xilanase, e lacase do fungo selecionado, foram avaliadas quanto à sua estabilidade quando em presença do fluido ruminal, temperatura de 39°C, por 24 horas, sendo medida a atividade enzimática em vários períodos de incubação (zero, uma, duas, três, quatro, cinco, seis, oito, e vinte e quatro horas). A coleta da ingesta (fluido ruminal) foi realizada em um garrote cruzado fistulado, que pertencia a este grupo de pesquisa e estava alocado em piquete de capim braquiarião (*Brachiria brizantha*) na Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios (APTA Regional), São José do Rio Preto/SP. Para tanto, foi realizada a coleta do fluido em diferentes partes do rúmen, sendo filtrado em pano tipo fralda e armazenado, cerca de um litro do líquido, em garrafa térmica para ser transportado ao Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada. As amostras foram incubadas na proporção de 1:1 (v/v) da seguinte forma:

fluido ruminal + extrato enzimático;

fluido ruminal + água destilada;

extrato enzimático + solução de saliva artificial (McDOUGALL, 1948).

#### 4.8. AVALIAÇÃO BROMATOLÓGICA DAS FIBRAS VEGETAIS E DO MATERIAL FERMENTADO

As fibras vegetais (bagaço de cana, *Brachiaria brizantha*, *Brachiaria decumbens* e *Panicum maximum*) usadas nos ensaios de hidrólise enzimática e digestibilidade *in vitro*, assim como o resíduo utilizado no processo fermentativo, foram analisados para as frações protéicas e para composição da parede celular. As análises seguiram as metodologias de Van Soest (1994), para as determinações dos componentes da parede celular. Nesses materiais foram determinados: Fibra em Detergente Neutro (FDN), Fibra em Detergente Acido (FDA), Lignina, Nitrogênio total, Matéria Mineral e Extrato Etéreo.

As frações FDN e FDA foram determinadas através do equipamento determinador de fibras (TE 149, Tecnal). A lignina foi determinada com a adição de ácido sulfúrico 72% no resíduo insolúvel da determinação da FDA (VAN SOEST, 1994).

Para a determinação do nitrogênio total utilizou-se o método micro kjedal. O teor de matéria seca foi determinado em estufa a 55 °C por 72 h e posteriormente a 105 °C por 24 h, e a matéria mineral em mufla a 600 °C por 3h.

#### 4.9. HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DAS FIBRAS LIGNOCELULÓSICAS

A partir dos extratos enzimáticos brutos obtidos do cultivo de *C. byrsina* (cevada) e *T. reesei* QM9414 (bagaço de cana com farelo de trigo 1:1), volumes de 2 e 6 mL foram incubados em tubos de hidrólise contendo 0,7 mL de tampão citrato (0,1M pH 6.0) e azida sódica 1% e completados com água destilada para um volume final de 7,0 mL, e 0,1 g de diferentes tipos de biomassa lignocelulósicas (capim braquiária - *Brachiaria decumbens*, bagaço de cana - *Saccharum* sp, capim *Brachiaria brizantha* em estágio avançado de maturidade – macega, e capim Tanzânia - *Panicum maximum*). O bagaço de cana foi obtido de usinas da região de São José do Rio Preto, a macega e o tanzânia foram cortados com faca, rente ao início da moita e a braquiária foi coletada somente a segunda folhinha da rebrota. Todas as fibras vegetais utilizadas para a hidrólise enzimática foram secas, moídas e passadas em peneiras com granulometria de 1 mm.

As amostras foram mantidas em banho de hidrólise com agitação horizontal de 150 rpm, a 40 °C, por 24h. A cada intervalo de tempo (0, 10', 30', 1, 2, 4, 8 e 24h) uma amostra foi retirada, filtrada e os açúcares liberados foram quantificados pelo método de Somogy-Nelson (1952). Um controle foi feito para a solução enzimática em ausência de fibras vegetais

para quantificar os açúcares livres presentes nessa solução e posteriormente esses foram descontados dos frascos contendo o material hidrolisado.

Os tratamentos utilizados nesse experimento foram o TI (controle) que continha água; o TII que continha 2 mL de extrato enzimático e o TIII que continha 6 mL de extrato enzimático. Todos os experimentos foram conduzidos em duplicata. Os resultados foram estatisticamente avaliados por análise de variância fatorial (ANOVA), usando *Statistica software*, onde os fatores considerados foram o tipo de alimento fibroso, a dose enzimática e o tempo (8 e 24h).

#### 4.9.1. ANÁLISE DOS PRODUTOS DE HIDRÓLISE POR HPLC

As análises dos açúcares liberados após a hidrólise enzimática foram feitas usando HPAEC-PAD (ICS 3000, Dionex Corporation, EUA), equipado com amostrador automático AS40, coluna de troca aniônica CarboPac PA-1 e uma guarda-coluna CarboPac PA 1. As amostras foram injetadas num “loop” de X uL. A forma de onda empregada foi a “standard quadruple” com os seguintes pulsos potenciais e durações: E1= 0,10V (t1=0,40s); E2= -2,00V (t2=0,02s); E3= 0,60V (t3=0,01s); E4= 0,10V (t4=0,06s). Os eluentes foram preparados com água deionizada ultra pura (18M  $\Omega$ ) e degaseificada com N<sub>2</sub>; eluente A consistia de A: 200 mM de NaOH; solvente B: água ultra pura e solvente C: 500 mM de acetato de sódio com 150 mM de NaOH. Para as análises dos monos- e di- sacarídeos (glicose, xilose, galactose, arabinose, xilobiose e celobiose), a eluição utilizada foi de 0 a 14 min eluição isocrática com 5% de A e 95% de eluente B. De 14 a 30 min foi gradiente linear de 5 a 90% de eluente A e de 0 a 10% de eluente C, a uma temperatura de 35 °C e fluxo de 1 minuto. Os padrões glicose, celobiose, xilose, xilobiose, arabinose e galactose (Sigma) foram utilizados para identificação dos picos. Os dados foram coletados utilizando-se o software Chromeleon, versão 6.8 (Dionex Corporation, EUA). As amostras foram realizadas em duplicata.

#### 4.10. AVALIAÇÃO DA DOSE ENZIMÁTICA NA DIGESTIBILIDADE IN VITRO DAS FIBRAS VEGETAIS PELA TÉCNICA SEMI AUTOMÁTICA DE PRODUÇÃO DE GASES

Para avaliar a melhor concentração do extrato enzimático na digestibilidade dos alimentos utilizou-se três concentrações do extrato bruto que tinha alta atividade de lacase. As

quantidades avaliadas foram 2, 4 e 6 mL (Tab.3) e seguiu-se o procedimento descrito por Mauricio e colaboradores (1999).

Tabela 3. Tratamentos empregados na digestibilidade *in vitro* pela produção de gases.

Branco	30 mL meio total (meio de cultivo tamponado + fluido ruminal) + 6,0 mL água
G	0,2 g amostra de volumoso + 6,0 mL água + 30,0 mL meio total
GI	0,2 g amostra de volumoso + 2,0 mL solução enzimática + 4,0 mL água + 30,0 mL meio total
GII	0,2 g amostra de volumoso + 4,0 mL solução enzimática + 2,0 mL água + 30,0 mL meio total
GIII	0,2 g amostra de volumoso + 6,0 mL solução enzimática + 30,0 mL meio total

\* para cada grupo foi feito um controle onde havia apenas o extrato bruto com o meio total

O volume final dos tratamentos foi o mesmo em todos os frascos (6 mL) e, portanto, onde se utilizou menor volume de enzima completou-se para o volume final com água destilada.

Foram pesados 200 mg dos volumosos secos, moídos e passados em peneira de granulometria 1 mm: capim braquiária (*Brachiaria decumbens*), bagaço de cana (*Saccharum sp*), capim braquiária em estágio avançado de maturidade (macega) e capim Tanzânia (*Panicum maximum*). As amostras foram individualmente incubadas em triplicata em frascos de vidro (115 ml) numerados, previamente lavados e secos em estufa.

No dia anterior à incubação preparou-se o meio de cultivo tamponado (Theodorou et al., 1994), apresentado nas tabelas 4 e 5, que foi mantido em banho-maria ou em estufa a 39°C.

As soluções foram misturadas em uma garrafa de vidro de 4,0 litros na seguinte ordem e proporção: 1446 mL de água destilada; 577 mL de solução tampão; 577 mL de solução macromineral; 0,3 mL de solução micromineral; 3,0 mL de solução rezasurina totalizando 2603,3 mL de meio de cultivo, que foi devidamente agitado para que as soluções se misturassem. No dia da incubação foi adicionado 117 mL do agente redutor ao meio de cultivo tamponado (solução de cor azul) e em seguida saturado com CO<sub>2</sub> por aproximadamente 3 h até que o pH atingisse 6,8 (solução de cor rosa). Em seguida, foram adicionados 680 mL de líquido ruminal (20% volume final).

O líquido ruminal foi coletado de um animal fistulado no rumen, que pertenceu a este grupo de pesquisa e que estava alocado em piquete na Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios (APTA Regional), São José do Rio Preto/SP. A dieta do animal doador consistia de capim *Brachiaria brizantha*, com suplemento de sal mineral (Fig 18). As coletas foram realizadas no final de setembro e final de outubro (início do período das águas).

As coletas foram realizadas às 07:00 do primeiro dia de cada experimento (antes da alimentação matinal). A digesta foi retirada manualmente do rúmen, juntamente com o líquido ruminal, e armazenado em garrafa térmica previamente aquecida com água morna a 40 °C, para seu transporte até o laboratório.

No laboratório, o líquido ruminal foi filtrado com 2 panos de algodão sobrepostos, e o filtrado foi transferido para o frasco contendo o meio de cultivo.

Em cada frasco, já contendo as amostras, foram adicionados 30 mL de solução completa, ou seja, composta de meio de cultivo tamponado e líquido ruminal mais os extratos enzimáticos a serem avaliados. Os resultados foram corrigidos para o branco (garrafas contendo fluido ruminal tamponado, sem a presença de amostra) e para o controle das enzimas (garrafas contendo solução completa mais a solução enzimática, sem a presença de amostra). Após 24, 48 e 60 h, os valores encontrados foram utilizados para prever o valor energético e a digestibilidade *in vitro* da matéria orgânica das amostras incubadas.

A leitura da pressão, em psi (libras por polegada quadrada), originada pelo acúmulo de gases oriundos da ação bacteriana sobre o substrato, foi medida por meio de um transdutor de pressão (manômetro) modelo Kimo MP 112 conectado a um leitor digital e a uma válvula de três saídas, sendo que a primeira saída foi conectada à uma agulha (0,7 x 25 mm), a segunda ao transdutor de pressão e a terceira aberta para a liberação dos gases (Fig 19).

Para se aferir a pressão, a agulha acoplada à válvula foi inserida na tampa do frasco e no mesmo momento o leitor digital informava a pressão no interior do frasco. As leituras foram realizadas 1, 2, 4, 8, 12, 24, 28, 32, 36, 48, 54 e 60 horas após a inoculação, e os dados obtidos foram devidamente anotados para análise posterior.

A transformação dos dados das leituras de pressão (psi) para volume (mL) foi feita através da equação 1, obtida com leituras de pressão de diferentes quantidades conhecidas de volume de gás nas garrafas, mantendo as mesmas condições de temperatura da incubação.

$$y = 0,18 x^2 + 3,61x + 0,56 \quad [1]$$

Em que, y é o volume de gás (mL) e x é a pressão (psi).

A digestibilidade *in vitro* da matéria orgânica (DIVMO) e energia metabolizável (EM) foram calculadas utilizando as equações preconizadas por MENKE e STEINGASS (1988):

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

$$\text{DIVMO: (g/Kg MS)} = 14,88 + (0,889 * \text{gás}_{24}) + (0,045 * \text{PB}) + (0,065 * \text{MM}) \times 0,9358 \quad [3]$$

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

As mesmas equações descritas anteriormente, porém com a produção de gás in vitro tomada em 48h (Gás 48h) e 60h (Gás 60h) de incubação, foram avaliadas, para as amostras de forrageiras tropicais, uma vez que apresentam conteúdo mais elevado de FDN em sua composição, necessitando assim, de um tempo mais elevado de incubação para permitir uma digestão eficiente da fibra dessas forrageiras.

Posteriormente, todos esses valores foram convertidos em nutrientes digestíveis totais (NDT) utilizando as seguintes equações, preconizadas pelo NRC, 2001:

$$\text{ED (Mcal/kg de MS)} = \text{EM}/0,82 \quad [4]$$

$$\text{NDT (\%)} = \text{ED}/4,409 * 100 \quad [5]$$

Os resultados foram estatisticamente avaliados por análise de variância fatorial (ANOVA), usando Statistica software, tendo como fatores o tipo de alimento fibroso e a dose enzimática.

Tabela 4 . Composição do meio tamponado para a produção de gases in vitro.

<b>Ingredientes</b>	<b>Quantidades (mL/L meio total)</b>
Solução de macrominerais	212
Solução de microminerais	0,12
Solução tampão	212
Solução de resazurina	1,1
Agente redutor	43
Água destilada	531

Tabela 5. Composição das soluções do meio tamponado.

<b>Ingredientes</b>	<b>Quantidades (g/L)</b>
<b>Solução de macrominerais</b>	
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	5,7
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	6,2
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,6
<b>Solução de microminerais</b>	
CaCl <sub>2</sub> . 2H <sub>2</sub> O	132
MnCl <sub>2</sub> . 4H <sub>2</sub> O	100
CoCl <sub>2</sub> . 6H <sub>2</sub> O	10
FeCl <sub>3</sub> . 6H <sub>2</sub> O	80
<b>Solução tampão</b>	
NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub>	4
NaHCO <sub>3</sub>	35
<b>Resazurina</b>	0,01
<b>Agente redutor</b>	
Cysteine HCL	625 <sup>a</sup>
Água destilada	95 <sup>b</sup>
NaOH 1M	4 <sup>b</sup>
Na <sub>2</sub> S. 9H <sub>2</sub> O	625 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> mg/100mL <sup>b</sup> mL/100mL



Figura 18. Coleta do fluido ruminal



Figura 19. Procedimento realizado para determinação da digestibilidade in vitro pela técnica semi automática de produção de gases

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. TRIAGEM DAS LINHAGENS E A PRODUÇÃO ENZIMÁTICA NOS DIFERENTES RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS

Vinte e cinco fungos foram escolhidos para a primeira etapa deste trabalho e triados com base no seu potencial de produção de ligninases. O cultivo inicial foi realizado em farelo de trigo (FT) e farelo de algodão (FA) como fontes de carbono e consistiu de uma fase importante para a escolha dos melhores produtores e continuidade dos experimentos. Os perfis de produção de enzimas de todos eles foram traçados ao longo de cinco semanas de cultivo, uma vez que o crescimento desses fungos é lento e conseqüentemente a detecção das enzimas não seria possível em poucos dias de cultivo. As 25 linhagens analisadas foram capazes crescer e de produzir enzimas hidrolíticas e oxidativas durante o processo de fermentação dos substratos lignocelulósicos. Os resultados foram apresentados em tabelas com os valores máximos encontrados devido à quantidade de informações.

Na Tabela 6 estão apresentadas as produções das enzimas ligninolíticas (lacase, LiP e MnP) quando o cultivo dos fungos foi realizado em FT. Observa-se que a lacase foi produzida por quase todas as linhagens em estudo, enquanto que o níveis das enzimas LiP e MnP foram muito baixos. Dentre as espécies que se destacaram quanto à produção de lacase estão *Coriolopsis byrsina* com produção de 939,3 Unidades de enzima por grama de material seco (U/gMS), todos os isolados da espécie *Pycnoporus sanguineus* com produção que variou de 61,26 U/gMS a 151,37 U/gMS, e o isolado SXS 80 (não identificado) com produção de 72,76 U/g MS.

Em FA (tabela 7) foi observado ao longo do processo fermentativo uma maior compactação do meio, e para algumas especies a produção foi menor quando comparada ao farelo de trigo. As espécies que se destacaram com as maiores produções de lacase foram *Coriolopsis byrsina* com 178,15 U/gMS, *Pycnoporus sanguineus* (SXS43) com produção de 43,91 U/gMS, SXS 80 com 278,14 U/gMS, *Schizophyllum comune* (SXS 125) com 134,60 U/gMS e *Lentinus* sp com 257,77 U/gMS.

Tabela 6. Atividade das enzimas ligninolíticas em FT. O cultivo foi realizado por 5 semanas e os resultados apresentados correspondem aos valores máximos encontrados.

Linhagens	Atividade Enzimática U.g <sup>-1</sup> MS		
	Lacase	Lignina Peroxidase	Manganês Peroxidase
<i>Coriolopsis byrsina</i> (SXS16)	939,3 ± 11,38 <sup>e</sup>	1,13 ± 0,02 <sup>d</sup>	2,01 ± 0,00 <sup>d</sup>
<i>Schizophyllum commune</i> (SXS 38)	5,00 ± 0,95 <sup>c</sup>	1,02 ± 0,05 <sup>c</sup>	1,63 ± 0,05 <sup>d</sup>
<i>Schizophyllum commune</i> (SXS 385)	0,28 ± 0,10 <sup>c</sup>	0,93 ± 0,05 <sup>d</sup>	1,49 ± 0,04 <sup>d</sup>
<i>Schizophyllum commune</i> (SXS 125)	16,45 ± 3,20 <sup>c</sup>	0,86 ± 0,05 <sup>b</sup>	0,98 ± 0,08 <sup>b</sup>
<i>Pycnoporus sanguineus</i> (SXS 43)	76,54 ± 1,69 <sup>d</sup>	1,03 ± 0,06 <sup>e</sup>	0,66 ± 0,08 <sup>b</sup>
<i>Pycnoporus sanguineus</i> (MCA 16)	151,37 ± 7,07 <sup>e</sup>	1,01 ± 0,06 <sup>b</sup>	1,23 ± 0,11 <sup>a</sup>
<i>Pycnoporus sanguineus</i> (SXS 306)	106,39 ± 6,49 <sup>c</sup>	0,91 ± 0,04 <sup>c</sup>	1,50 ± 0,13 <sup>b</sup>
<i>Pycnoporus sanguineus</i> (SXS 365)	61,26 ± 0,55 <sup>d</sup>	3,47 ± 0,08 <sup>b</sup>	3,03 ± 0,07 <sup>a</sup>
<i>Pycnoporus sanguineus</i> (L.) Murril (MCA 220)	23,10 ± 1,89 <sup>b</sup>	1,02 ± 0,02 <sup>e</sup>	1,68 ± 0,04 <sup>d</sup>
<i>Lentinus stringellus</i> (SXS 355)	32,31 ± 3,17 <sup>c</sup>	1,14 ± 0,02 <sup>c</sup>	1,55 ± 0,15 <sup>a</sup>
<i>Lentinus</i> sp (SXS 360)	10,32 ± 0,77 <sup>a</sup>	1,07 ± 0,04 <sup>d</sup>	1,70 ± 0,10 <sup>d</sup>
<i>Dacryopinax elegans</i> (SXS 323)	0,13 ± 0,03 <sup>b</sup>	0,96 ± 0,03 <sup>c</sup>	0,60 ± 0,06 <sup>c</sup>
<i>Perenniporia medullapanis</i> (SXS 358)	5,75 ± 0,07 <sup>d</sup>	1,13 ± 0,12 <sup>d</sup>	1,07 ± 0,13 <sup>a</sup>
<i>Gloeophyllum</i> (SXS 40)	ND	0,98 ± 0,07 <sup>b</sup>	1,01 ± 0,04 <sup>c</sup>
SXS 58	2,76 ± 0,59 <sup>e</sup>	0,75 ± 0,10 <sup>e</sup>	0,27 ± 0,06 <sup>c</sup>
SXS 59	2,57 ± 0,63 <sup>b</sup>	0,97 ± 0,07 <sup>e</sup>	0,39 ± 0,04 <sup>e</sup>
<i>Cf Perenniporia</i> (SXS 69)	ND	0,84 ± 0,07 <sup>e</sup>	0,82 ± 0,08 <sup>d</sup>
SXS 388	0,24 ± 0,01 <sup>c</sup>	0,87 ± 0,05 <sup>b</sup>	1,10 ± 0,03 <sup>d</sup>
<i>Marasmius</i> SP (SXS 214)	24,08 ± 1,74 <sup>c</sup>	0,91 ± 0,03 <sup>d</sup>	1,17 ± 0,02 <sup>a</sup>
SXS 02	ND	0,57 ± 0,03 <sup>c</sup>	0,80 ± 0,04 <sup>d</sup>
<i>Datronia stereoides</i> (Fr.) Ryvarde (MCA 167)	0,39 ± 0,08 <sup>c</sup>	0,67 ± 0,02 <sup>c</sup>	0,76 ± 0,03 <sup>d</sup>
<i>Polyponus</i> sp (MCA 128)	5,51 ± 0,66 <sup>b</sup>	1,00 ± 0,05 <sup>c</sup>	1,53 ± 0,05 <sup>e</sup>
<i>Hexagonia hirta</i> (P. Beauv.) Fr. (MCA 131)	ND	1,16 ± 0,06 <sup>e</sup>	1,19 ± 0,10 <sup>d</sup>
SXS 17	ND	0,48 ± 0,04 <sup>b</sup>	0,68 ± 0,04 <sup>d</sup>
SXS 80	72,76 ± 1,06 <sup>e</sup>	0,92 ± 0,02 <sup>e</sup>	2,06 ± 0,06 <sup>d</sup>

ND – não detectável; a, b, c, d, e representam o tempo de produção em semanas, sendo a = 1; b = 2; c = 3; d = 4; e = 5

Tabela 7. Atividade das enzimas ligninolíticas em FA. O cultivo foi realizado por 5 semanas e os resultados apresentados correspondem aos valores máximos encontrados.

Linhagens	Atividade Enzimática U.g <sup>-1</sup> MS		
	Lacase	Lignina Peroxidase	Manganês Peroxidase
<i>Coriopsis byrsina</i> (SXS16)	178,15 ± 4,32 <sup>d</sup>	1,19 ± 0,40 <sup>e</sup>	2,06 ± 0,00 <sup>e</sup>
<i>Schizophyllum commune</i> (SXS 38)	3,38 ± 0,22 <sup>c</sup>	1,84 ± 0,08 <sup>e</sup>	0,83 ± 0,11 <sup>e</sup>
<i>Schizophyllum commune</i> (SXS 385)	ND	1,99 ± 0,03 <sup>d</sup>	0,96 ± 0,04 <sup>e</sup>
<i>Schizophyllum commune</i> (SXS 125)	134,60 ± 1,96 <sup>b</sup>	1,53 ± 0,03 <sup>e</sup>	2,55 ± 0,08 <sup>d</sup>
<i>Pycnoporus sanguineus</i> (SXS 43)	43,91 ± 1,24 <sup>c</sup>	0,98 ± 0,01 <sup>c</sup>	1,10 ± 0,04 <sup>e</sup>
<i>Pycnoporus sanguineus</i> (MCA 16)	9,71 ± 0,73 <sup>b</sup>	1,59 ± 0,02 <sup>d</sup>	2,04 ± 0,07 <sup>e</sup>
<i>Pycnoporus sanguineus</i> (SXS 306)	18,97 ± 2,47 <sup>a</sup>	0,92 ± 0,04 <sup>b</sup>	1,57 ± 0,10 <sup>c</sup>
<i>Pycnoporus sanguineus</i> (SXS 365)	19,38 ± 2,85 <sup>d</sup>	3,45 ± 0,04 <sup>b</sup>	2,25 ± 0,15 <sup>a</sup>
<i>Pycnoporus sanguineus</i> (L.) Murril (MCA 220)	29,87 ± 3,63 <sup>b</sup>	1,04 ± 0,09 <sup>a</sup>	1,17 ± 0,04 <sup>d</sup>
<i>Lentinus stringellus</i> (SXS 355)	6,71 ± 0,42 <sup>e</sup>	1,76 ± 0,06 <sup>d</sup>	3,00 ± 0,06 <sup>d</sup>
<i>Lentinus sp</i> (SXS 360)	257,77 ± 13,21 <sup>c</sup>	2,37 ± 0,09 <sup>c</sup>	2,48 ± 0,09 <sup>d</sup>
<i>Dacryopinax elegans</i> (SXS 323)	ND	2,74 ± 0,21 <sup>c</sup>	2,19 ± 0,01 <sup>e</sup>
<i>Perenniporia medullapanis</i> (SXS 358)	8,07 ± 1,14 <sup>b</sup>	1,65 ± 0,13 <sup>b</sup>	1,73 ± 0,06 <sup>b</sup>
<i>Gloeophyllum</i> (SXS 40)	ND	0,99 ± 0,05 <sup>e</sup>	1,91 ± 0,03 <sup>d</sup>
SXS 58	6,21 ± 0,95 <sup>d</sup>	0,95 ± 0,06 <sup>b</sup>	0,96 ± 0,08 <sup>e</sup>
SXS 59	ND	1,94 ± 0,10 <sup>e</sup>	1,48 ± 0,03 <sup>e</sup>
<i>Cf Perenniporia</i> (SXS 69)	ND	1,97 ± 0,08 <sup>e</sup>	2,60 ± 0,05 <sup>e</sup>
SXS 388	ND	1,76 ± 0,06 <sup>e</sup>	1,60 ± 0,09 <sup>d</sup>
<i>Marasmius SP</i> (SXS 214)	1,51 ± 0,05 <sup>e</sup>	1,94 ± 0,08 <sup>d</sup>	2,24 ± 0,08 <sup>d</sup>
SXS 02	ND	1,88 ± 0,01 <sup>a</sup>	1,77 ± 0,02 <sup>b</sup>
<i>Datronia stereoides</i> (Fr.) Ryvarden (MCA 167)	6,00 ± 0,28 <sup>c</sup>	0,87 ± 0,09 <sup>b</sup>	1,08 ± 0,02 <sup>d</sup>
<i>Polyponus sp</i> (MCA 128)	20,26 ± 1,85 <sup>b</sup>	0,87 ± 0,01 <sup>e</sup>	1,38 ± 0,05 <sup>d</sup>
<i>Hexagonia hirta</i> (P. Beauv.) Fr. (MCA 131)	ND	1,54 ± 0,10 <sup>c</sup>	1,19 ± 0,05 <sup>d</sup>
SXS 17	ND	6,14 ± 0,18 <sup>e</sup>	0,95 ± 0,10 <sup>a</sup>
SXS 80	278,14 ± 2,80 <sup>b</sup>	2,49 ± 0,03 <sup>d</sup>	4,45 ± 0,34 <sup>d</sup>

ND – não detectável; a, b, c, d, e representam o tempo de produção em semanas, sendo a = 1; b = 2; c = 3; d = 4; e = 5

Com relação à produção de enzimas extracelulares hidrolíticas, foram quantificadas a endoglucanase (CMCase), xilanase e pectinase, onde quantidade produzida variou conforme o tipo de resíduo utilizado. Pouca ou nenhuma quantidade de avicelase foi detectada. A tabela 8 apresenta os valores máximos encontrados para cada uma dessas enzimas em FT e a tabela 9 em FA. As maiores atividades de avicelase foram 13,46 U/g (SXS 58); 25,42 U/g (*P. sanguineus* SXS 43); 19,71 U/g (SXS 388) em FT e 13,13 U/g (*Gloeophyllum* sp SXS 40) em FA.

A atividade de CMCase variou entre 5,2 e 18,7 U/g MS e foi melhor quando o substrato utilizado foi o farelo de algodão, destacando-se entre os melhores produtores o *P. sanguineus* (MCA 16) com produção de 17,7 U/g MS, *S. commune* (SXS 38) 16,0 U/g MS, *Gloeophyllum* (SXS 40) 18,6 U/g MS, *P. sanguineus* (SXS 43) 16,7 U/g MS, *Marasmius* (SXS 214) 18,1 U/g MS, *P. sanguineus* (SXS 306) 15,0 U/g MS e *P. medullapanis* (SXS 358) 17,4 U/g MS.

As linhagens MCA 128, MCA 167, SXS 38, SXS 58, SXS 125, SXS 323 e SXS 385 foram as melhores produtoras de xilanases com diferenças na quantidade de atividade detectada em ambos os substratos. Em geral, a produção no farelo de algodão foi maior em relação ao farelo de trigo, e variou de 41,6 a 96,3 U/g no FA e 6,2 a 77,3 U/g no FT.

As maiores quantidades de pectinases expressas estão relacionadas às linhagens MCA 16, MCA 220, SXS 40, SXS 43 e SXS 365 que variaram de 48,7 a 185,5 U/g MS. A quantidade de enzimas também variou quando comparado ambos os substratos, sendo as maiores quantidades produzidas no farelo de algodão. A produção de pectinases pelas espécies *P. sanguineus* e por *Gloeophyllum* foram muito expressivas, mostrando-se muito superior aos dados apresentados na literatura (SILVA et al, 2005). Dados de produção de pectinases por fermentação em estado sólido mostraram uma produção de 47 U/g MS (MARTINS et al., 2002) e 82 U/g MS (MARTIN, 2006), quando utilizados fungos ascomicetos e zigomicetos, respectivamente.

As informações encontradas na literatura sobre a produção de hidrolases secretadas por basidiomicetos são escassas. Além do mais, pouca atenção tem sido dada ao estudo simultâneo de produção de enzimas hidrolíticas e oxidativas por estes fungos (RODRIGUES et al., 2008).

Tabela 8. Atividade das enzimas hidrolíticas em FT. O cultivo foi realizado por 5 semanas e os resultados apresentados correspondem aos valores máximos encontrados.

Linhagens	Atividade Enzimática U.g <sup>-1</sup> MS			
	CMcase	Avicelase	Xilanase	Pectinase
<i>Corioloopsis byrsina</i> (SXS16)	12,17±1,63 <sup>a</sup>	4,64±1,06 <sup>a</sup>	35,44±3,46 <sup>b</sup>	14,71±1,15 <sup>a</sup>
<i>Schizophyllum commune</i> (SXS 38)	13,14 ± 1,12 <sup>a</sup>	11,28 ± 1,51 <sup>b</sup>	68,27 ± 3,15 <sup>c</sup>	31,32 ± 2,05 <sup>a</sup>
<i>Schizophyllum commune</i> (SXS 385)	14,38 ± 1,85 <sup>b</sup>	nd	79,33 ± 2,81 <sup>b</sup>	30,03 ± 0,25 <sup>a</sup>
<i>Schizophyllum commune</i> (SXS 125)	12,88 ± 1,55 <sup>b</sup>	2,57 ± 3,63 <sup>a</sup>	56,75 ± 5,18 <sup>a</sup>	23,81 ± 2,62 <sup>a</sup>
<i>Pycnoporus sanguineus</i> (SXS 43)	10,63 ± 2,14 <sup>a</sup>	25,42 ± 1,04 <sup>b</sup>	7,86 ± 1,58 <sup>c</sup>	63,56 ± 1,77 <sup>a</sup>
<i>Pycnoporus sanguineus</i> (MCA 16)	11,87 ± 1,30 <sup>a</sup>	nd	9,45 ± 1,56 <sup>a</sup>	50,56 ± 1,66 <sup>a</sup>
<i>Pycnoporus sanguineus</i> (SXS 306)	13,96 ± 1,31 <sup>a</sup>	nd	nd	52,48 ± 1,40 <sup>b</sup>
<i>Pycnoporus sanguineus</i> (SXS 365)	13,19 ± 1,15 <sup>a</sup>	nd	34,53 ± 0,96 <sup>b</sup>	160,54 ± 3,11 <sup>a</sup>
<i>Pycnoporus sanguineus</i> (L.) Murri (MCA 220)	8,32 ± 0,85 <sup>b</sup>	nd	9,34 ± 0,58 <sup>c</sup>	49,31 ± 0,85 <sup>a</sup>
<i>Lentinus stringellus</i> (SXS 355)	12,79 ± 0,56 <sup>c</sup>	nd	22,50 ± 4,18 <sup>c</sup>	19,61 ± 2,26 <sup>c</sup>
<i>Lentinus</i> sp (SXS 360)	12,60 ± 1,23 <sup>b</sup>	5,76 ± 0,69 <sup>a</sup>	28,84 ± 1,88 <sup>b</sup>	25,75 ± 1,44 <sup>a</sup>
<i>Dacryopinax elegans</i> (SXS 323)	11,96 ± 1,33 <sup>a</sup>	12,25 ± 0,49 <sup>b</sup>	53,73 ± 1,95 <sup>a</sup>	nd
<i>Perenniporia medullapanis</i> (SXS 358)	15,11 ± 1,11 <sup>b</sup>	8,83 ± 0,56 <sup>b</sup>	24,63 ± 1,80 <sup>b</sup>	13,88 ± 2,54 <sup>a</sup>
<i>Gloeophyllum</i> (SXS 40)	15,29 ± 1,72 <sup>b</sup>	13,03 ± 0,28 <sup>d</sup>	17,43 ± 1,12 <sup>b</sup>	127,81 ± 15,21 <sup>b</sup>
SXS 58	5,98 ± 0,01 <sup>e</sup>	13,46 ± 1,99 <sup>b</sup>	7,1 ± 1,29 <sup>b</sup>	15,72 ± 1,49 <sup>b</sup>
SXS 59	7,11 ± 1,10 <sup>b</sup>	7,23 ± 0,94 <sup>a</sup>	10,66 ± 0,81 <sup>b</sup>	nd
<i>Cf Perenniporia</i> (SXS 69)	12,26 ± 0,71 <sup>b</sup>	7,10 ± 0,64 <sup>b</sup>	24,48 ± 1,98 <sup>a</sup>	20,47 ± 1,86 <sup>a</sup>
SXS 388	10,76 ± 2,24 <sup>b</sup>	19,71 ± 2,53 <sup>c</sup>	12,85 ± 2,85 <sup>b</sup>	14,18 ± 1,45 <sup>b</sup>
<i>Marasmius</i> SP (SXS 214)	12,94 ± 0,84 <sup>b</sup>	nd	21,54 ± 1,1 <sup>c</sup>	19,42 ± 0,78 <sup>c</sup>
SXS 02	5,98 ± 1,14 <sup>d</sup>	nd	45,80 ± 4,20 <sup>a</sup>	24,79 ± 0,26 <sup>a</sup>
<i>Datronia stereoides</i> (Fr.) Ryvarden (MCA 167)	11,23 ± 1,05 <sup>c</sup>	nd	17,59 ± 0,87 <sup>c</sup>	22 ± 1,24 <sup>c</sup>
<i>Polyporus</i> sp (MCA 128)	11,97 ± 1,21 <sup>c</sup>	nd	60,28 ± 1,04 <sup>b</sup>	26,25 ± 1,53 <sup>b</sup>
<i>Hexagonia hirta</i> (P. Beauv.) Fr. (MCA 131)	14,53 ± 0,68 <sup>a</sup>	nd	23,89 ± 0,30 <sup>b</sup>	17,24 ± 0,65 <sup>a</sup>
SXS 17	nd	nd	6,73 ± 0,74 <sup>b</sup>	9,71 ± 0,69 <sup>a</sup>
SXS 80	7,10 ± 1,12 <sup>d</sup>	nd	20,63 ± 2,00 <sup>c</sup>	24,54 ± 1,87 <sup>a</sup>

ND – não detectável; a, b, c, d, e representam o tempo de produção em semanas, sendo a = 1; b = 2; c = 3; d = 4; e = 5

Tabela 9. Atividade das enzimas hidrolíticas em FA. O cultivo foi realizado por 5 semanas e os resultados apresentados correspondem aos valores máximos encontrados.

Linhagens	Atividade Enzimática U.g -1 MS			
	CMcase	Avicelase	Xilanase	Pectinase
<i>Coriolopsis byrsina</i> (SXS16)	10,02 ± 4,66 a	12,50 ± 11,30 d	18,61 ± 5,69 b	11,08 ± 3,97 a
<i>Schizophyllum commune</i> (SXS 38)	16,00 ± 0,02 d	nd	80,12 ± 1,43 d	19,05 ± 0,91 c
<i>Schizophyllum commune</i> (SXS 385)	6,83 ± 0,27 b	nd	40,19 ± 2,03 e	2,20 ± 3,11 e
<i>Schizophyllum commune</i> (SXS 125)	11,07 ± 1,46 a	6,58 ± 0,79 a	63,32 ± 6,55 c	19,00 ± 0,27
<i>Pycnoporus sanguineus</i> (SXS 43)	17,62 ± 1,30 b	nd	9,12 ± 0,99 b	161,41 ± 2,54 b
<i>Pycnoporus sanguineus</i> (MCA 16)	18,35 ± 0,94 d	9,86 ± 0,49 d	25,89 ± 1,20 d	71,86 ± 1,97 d
<i>Pycnoporus sanguineus</i> (SXS 306)	16,91 ± 2,65 a	nd	22,81 ± 3,70 a	58,82 ± 1,87 a
<i>Pycnoporus sanguineus</i> (SXS 365)	10,85 ± 0,41 a	nd	32,62 ± 1,22 a	187,64 ± 2,99 c
<i>Pycnoporus sanguineus</i> (L.) <i>Murril</i> (MCA 220)	11,77 ± 0,63 a	9,06 ± 0,24 a	32,64 ± 0,71 c	60,96 ± 1,73 a
<i>Lentinus stringellus</i> (SXS 355)	11,11 ± 0,32 c	2,64 ± 3,74 a	10,16 ± 1,48 c	22,64 ± 1,21 b
<i>Lentinus</i> sp (SXS 360)	11,48 ± 1,69 e	nd	20,99 ± 0,14 d	27,85 ± 2,39 b
<i>Dacryopinax elegans</i> (SXS 323)	11,75 ± 0,68 b	nd	40,79 ± 1,49 d	7,97 ± 1,30 b
<i>Perenniporia medullapanis</i> (SXS 358)	16,85 ± 0,80 d	nd	33,13 ± 0,44 d	6,43 ± 0,63 e
<i>Gloeophyllum</i> (SXS 40)	19,06 ± 0,57 d	13,13 ± 0,03 b	20,40 ± 1,63 b	9,12 ± 0,64 a
SXS 58	12,41 ± 0,27 c	nd	67,26 ± 4,17 b	53,47 ± 2,34 d
SXS 59	8,89 ± 0,42 c	nd	7,05 ± 1,18 a	5,68 ± 0,75 c
<i>Cf Perenniporia</i> (SXS 69)	6,75 ± 0,06 d	3,84 ± 5,44 d	5,96 ± 0,52 d	34,81 ± 1,14 c
SXS 388	12,64 ± 0,85 b	nd	31,01 ± 1,23 e	18,29 ± 4,62 e
<i>Marasmius</i> SP (SXS 214)	18,26 ± 0,24 d	5,84 ± 0,66 a	24,67 ± 1,07 c	29,61 ± 0,78 d
SXS 02	13,87 ± 0,48 d	5,64 ± 0,71 a	26,96 ± 2,59 a	10,24 ± 0,37 a
<i>Datronia stereoides</i> (Fr.) <i>Ryvarden</i> (MCA 167)	7,20 ± 0,98 a	10,93 ± 0,56 c	98,21 ± 2,70 b	17,69 ± 1,78 d
<i>Polyporus</i> sp (MCA 128)	8,27 ± 0,13 b	8,16 ± 0,40 d	92,15 ± 4,70 a	17,77 ± 1,05 b
<i>Hexagonia hirta</i> (P. <i>Beauv.</i> ) <i>Fr.</i> (MCA 131)	9,93 ± 0,26 a	6,76 ± 0,66 d	24,62 ± 0,68 b	6,77 ± 0,35 a
SXS 17	nd	nd	9,42 ± 1,34 e	9,68 ± 0,65 a
SXS 80	9,39 ± 0,79 d	nd	17,70 ± 1,75 b	28,09 ± 1,42 b

ND – não detectável; a, b, c, d, e representam o tempo de produção em semanas, sendo a = 1; b = 2; c = 3; d = 4; e = 5

O perfil de produção das enzimas foi dependente das espécies fúngicas e diferiu entre os isolados de uma mesma espécie. Além disso, quase todos os fungos exibiram respostas consideravelmente diferentes quanto ao crescimento e produção de enzimas em relação ao substrato lignocelulósico usado. Todos os fungos cultivados cresceram em ambos os

substratos, no entanto, o crescimento foi mais acentuado para algumas espécies e a penetração das hifas entre as partículas foi claramente observada no farelo de trigo.

As possíveis explicações para as diferenças encontradas na quantidade de enzimas produzida podem estar relacionadas à compactação do substrato que diminui a transferência de oxigênio e calor entre as partículas, à composição relativa dos polissacarídeos (quantidade de celulose e hemicelulose); à forma como esses polissacarídeos estão arranjados na parede celular vegetal (interações, tipos de ligações); à quantidade de lignina presente em cada resíduo e à forma como ela interage com a celulose e hemicelulose; e à presença de compostos aromáticos nos materiais lignocelulósicos que atuam como indutores naturais na síntese e secreção de ligninases (ELISASHVILI; KACHLISHVILI; PENNINCKX, 2008).

O arranjo da fibra pode expor mais ou menos um determinado polissacrideo. No presente trabalho, as maiores produções de xilanase e pectinase por FES foram obtidas utilizando FA com substrato. Ao observar-se a tabela 1, pode-se verificar que a porcentagem de hemicelulose presente no farelo de algodão é menor em relação ao farelo de trigo, dessa forma pode-se inferir que a hemicelulose contida no FA esteja mais exposta e permite induzir a síntese e secreção de hemicelulases. Resultados semelhantes foram observados por Facchini (2010) que utilizou farelo de soja e farelo de trigo na produção de xilanases extracelulares e observou melhores resultados para o farelo de soja, que em sua composição também apresentou menor porcentagem de hemicelulose em relação ao farelo de trigo.

De um modo geral, todos os fungos apresentaram lento crescimento (em torno de 10 dias em placa). Quando se tem por meta viabilizar o processo para uma aplicação industrial, tempo é uma das características que pode limitar o processo. Além disso, quanto mais lento o crescimento de um determinado microorganismo, maiores as chances de um contaminante crescer explosivamente e dominar aquele ambiente de cultivo.

O menor tempo de crescimento em placas (pré inoculo) associado à produção de lacase foram os dois fatores que permitiram selecionar 3 dos 25 fungos testados: *Corioloopsis byrsina*, *Schizophyllum comune* (SXS 125) e *Pycnoporus sanguineus* (MCA 16). Os novos cultivos foram fermentados utilizando-se os subprodutos PC, FA+PC (1:1 p/p) e BC para avaliar o perfil de produção e secreção das enzimas lacase, endoglucanase e xilanase e ao final dedicarmos qual condição seria adotada para a obtenção das enzimas.

Mais uma vez pode-se observar diferenças no padrão de síntese e secreção das enzimas em função do tipo de material utilizado. A tabela10 apresenta a média dos valores encontrados nos cultivos em cada substrato avaliado. O resíduo de cervejaria mostrou-se como um bom meio no que se refere à produção de lacase pelo *C. byrsina*. Este, sem dúvida

foi o fungo que apresentou as melhores características em relação à expressão de lacase. O valor máximo encontrado, foi 822,64 U/gMS, próximo ao valor encontrado quando o cultivo foi em farelo de trigo. Endoglucanase e xilanase foram encontradas em quantidades menores, mas satisfatórias quando comparadas às quantidades encontradas para espécies de basidiomicetos na literatura.

Nestes ensaios, o *C. byrsina* apresentou crescimento homogêneo em FES e potencial para produção de lacase em todos os substratos utilizados. Além do mais, esse fungo não apresentou qualquer alteração morfológica visual pelo período manipulado e a quantidade de enzima produzida sempre foi muito próxima não apresentando grandes oscilações entre uma fermentação e outra. Este é um indicativo de que o mecanismo de síntese e secreção da lacase por este fungo ocorre de forma constitutiva, e que a presença de indutores no meio de cultivo (como por exemplo alguns compostos fenólicos) aumenta a produção.

A lacase pode ser acrescentada em um mix de enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas produzidas por outros microrganismos, para uso em nutrição de ruminantes, uma vez que os carboidratos que fornecem energia para os animais estão presos numa matriz de lignina, cuja degradação das ligações que unem esses compostos, nem sempre alcançam a extensão necessária para o aproveitamento total dos nutrientes (COLOMBATTO et al., 2003a).

Portanto, o *C. byrsina* foi escolhido para a continuidade deste trabalho onde foram avaliadas as características físico-químicas e os ensaios de aplicação na digestão dos alimentos.

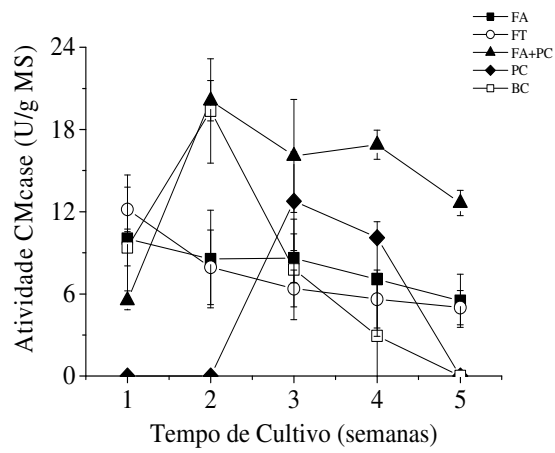
Tabela 10. Atividade enzimática das enzimas pelos fungos *Corioloopsis byrsina*, *Schizophyllum commune* e *Pycnoporus sanguineus* cultivados por 5 semanas em 5g de farelo de trigo (FT), farelo de algodão (FA), farelo de algodão + polpa cítrica (1:1 p/p), polpa cítrica e resíduo de cervejaria, a 28 °C.

Linhagens	Atividade Enzimática U.g <sup>-1</sup> MS		
	Lacase	Xilanase	CMcase
<i>Corioloopsis byrsina</i> (SXS16)			
FT	939,3 ± 11,38 <sup>c</sup>	35,44±3,46 <sup>b</sup>	12,17±1,63 <sup>a</sup>
FA	178,15± 4,32 <sup>d</sup>	18,61 ± 5,69 <sup>b</sup>	10,02 ± 4,66 <sup>a</sup>
FA+PC	279,02 ± 1,69 <sup>d</sup>	40,15 ± 2,47 <sup>c</sup>	20,11 ± 1,47 <sup>b</sup>
PC	6,13 ± 0,21 <sup>b</sup>	18,81 ± 0,32 <sup>b</sup>	12,77 ± 3,59 <sup>c</sup>
BC	822,64± 34,49 <sup>c</sup>	15,57 ± 2,10 <sup>b</sup>	19,35 ± 3,79 <sup>b</sup>
<i>Schizophyllum commune</i> (SXS 125)			
FT	16,45 ± 3,20 <sup>c</sup>	56,75 ± 5,18 <sup>a</sup>	12,88 ± 1,55 <sup>b</sup>
FA	134,60 ± 1,96 <sup>b</sup>	63,32 ± 6,55 <sup>c</sup>	11,07 ± 1,46 <sup>a</sup>
FA+PC	157,99 ± 3,13 <sup>b</sup>	195,33 ± 1,27 <sup>c</sup>	21,54 ± 0,51 <sup>c</sup>
PC	62,82 ± 5,42 <sup>b</sup>	53,68 ± 5,38 <sup>b</sup>	11,88 ± 2,69 <sup>b</sup>
BC	0,13 ± 0,18 <sup>b</sup>	19,09 ± 9,73 <sup>b</sup>	12,19 ± 0,44 <sup>b</sup>
<i>Pycnoporus sanguineus</i> (MCA 16)			
FT	151,37 ± 7,07 <sup>c</sup>	9,45 ± 1,56 <sup>a</sup>	11,87 ± 1,30 <sup>a</sup>
FA	9,71 ± 0,73 <sup>b</sup>	25,89 ± 1,20 <sup>d</sup>	18,35 ± 0,94 <sup>d</sup>
FA+PC	29,52 ± 1,86 <sup>c</sup>	21,31 ± 0,11 <sup>c</sup>	20,33 ± 2,34 <sup>b</sup>
PC	16,68 ± 0,48 <sup>b</sup>	14,94 ± 0,38 <sup>d</sup>	14,40 ± 0,66 <sup>c</sup>
BC	146,27 ± 6,66 <sup>c</sup>	26,47 ± 1,14 <sup>c</sup>	13,98 ± 2,30 <sup>b</sup>

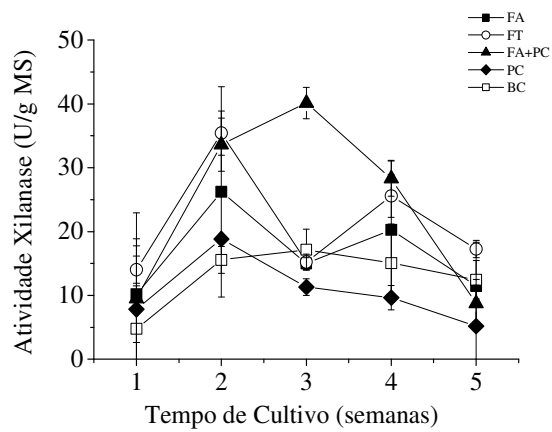
ND – não detectável; a, b, c, d, e representam o tempo de produção em semanas, sendo a = 1; b = 2; c = 3; d = 4; e = 5. FT (farelo de trigo) FA (farelo de algodão) PC (polpa cítrica) BC (bagaço de cevada)

O perfil de produção das enzimas, açúcares redutores e proteínas extracelulares quantificados no meio fermentativo quando *C. byrsina*, *Schizophyllum commune* e *Pycnoporus sanguineus* foram cultivados em FT, FA, FA+PC, PC e BC estão apresentados nas figuras 20, 21 e 22.

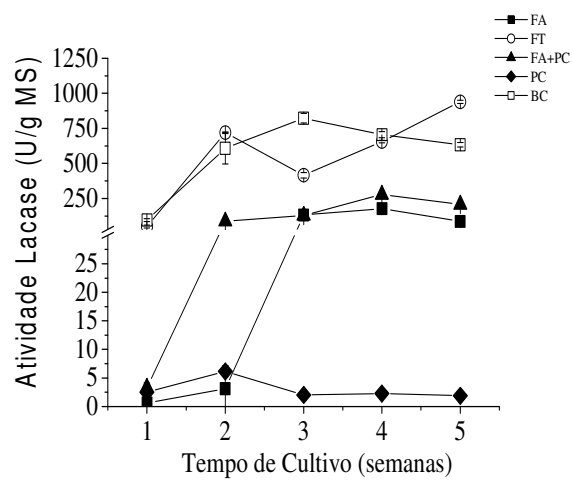
a)



b)



c)



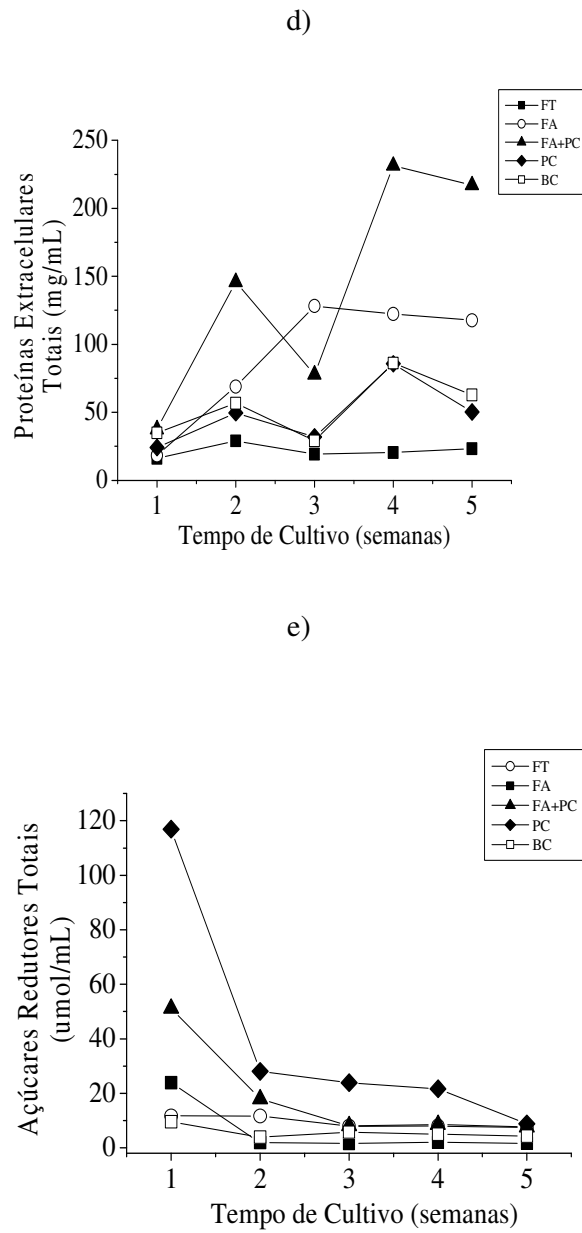
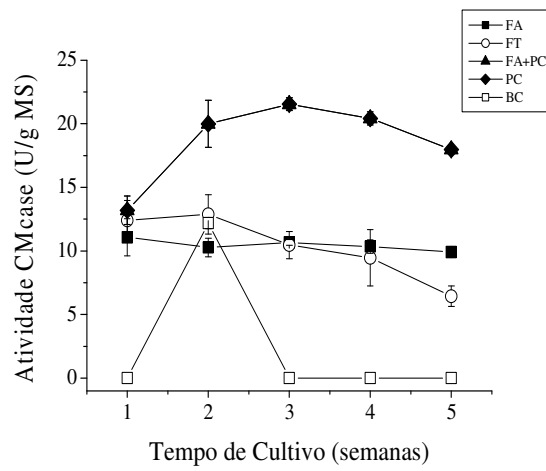
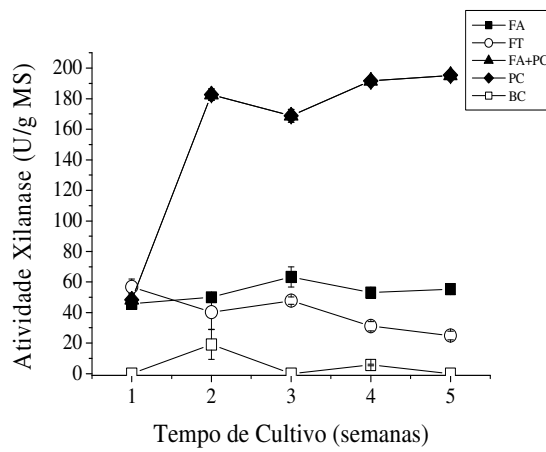


Figura 20. Perfil de produção da CMcase (a), Xilanase (b), Lacase (c) e quantificação das proteínas (d) e açúcares redutores (e) ao longo do tempo de cultivo pelo *Coriolopsis byrsina* SXS 16, em meio composto por farelo de trigo (FT), farelo de algodão (FA), polpa cítrica (PC) e bagaço de cevada (BC)

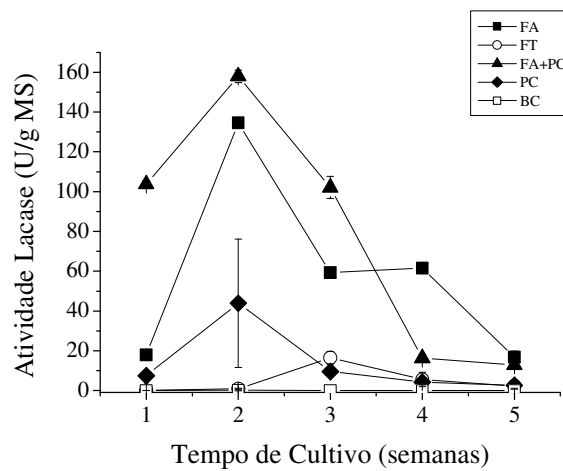
a)



b)



c)



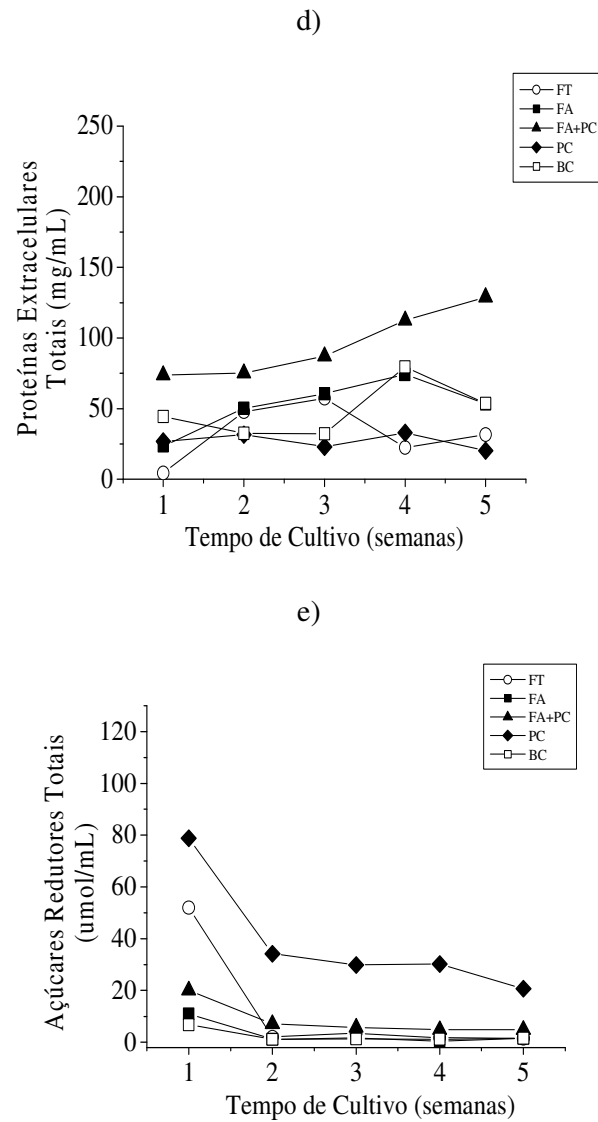
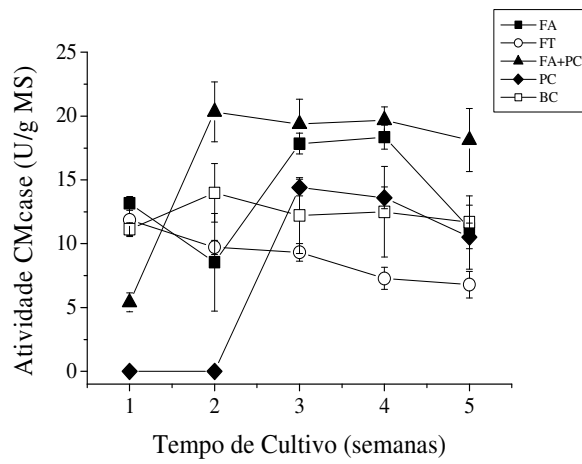
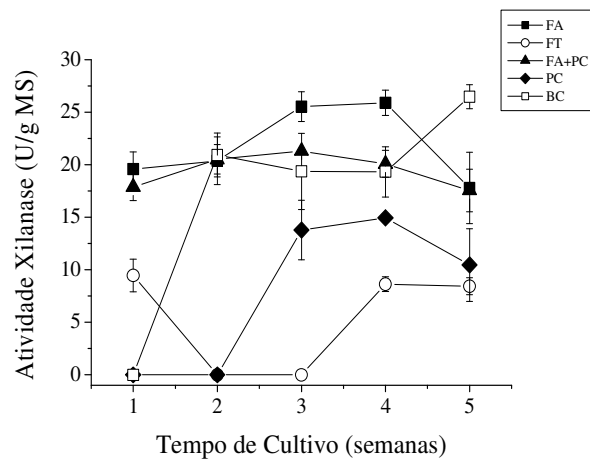


Figura 21. Perfil de produção da CMcase (a), Xilanase (b), Lacase (c) e quantificação das proteínas (d) e açúcares redutores (e) ao longo do tempo de cultivo pelo *Schizophyllum commune* SXS 125, em meio composto por farelo de trigo (FT), farelo de algodão (FA), polpa cítrica (PC) e bagaço de cevada (BC)

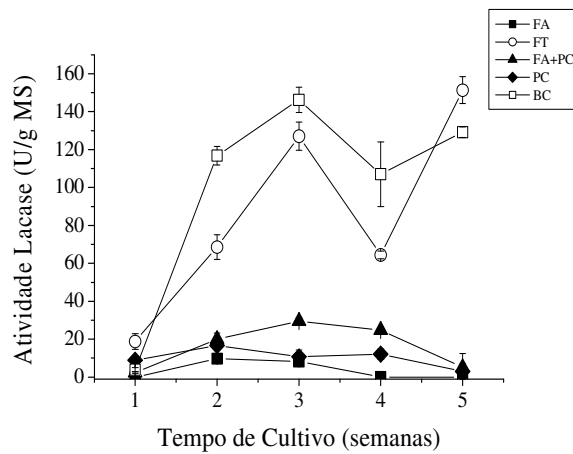
a)



b)



c)



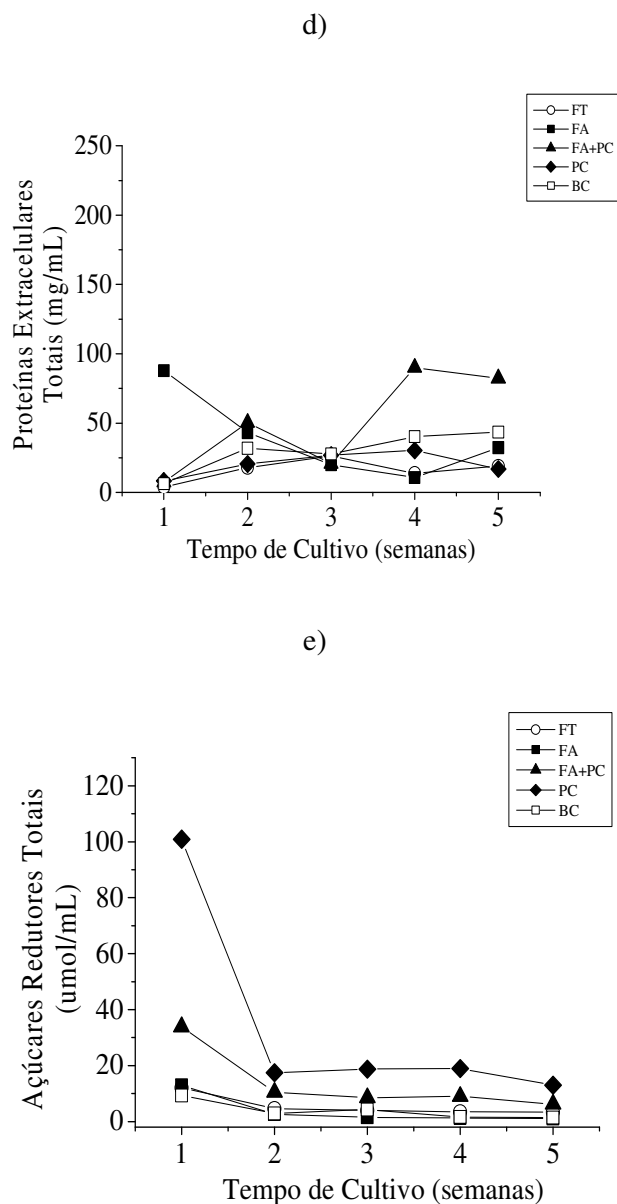


Figura 22. Perfil de produção da CMcase (a), Xilanase (b), Lacase (c) e quantificação das proteínas (d) e açúcares redutores (e) ao longo do tempo de cultivo pelo *Pycnoporus sanguineus* MCA 16, em meio composto por farelo de trigo (FT), farelo de algodão (FA), polpa cítrica (PC) e bagaço de cevada (BC)

Neste trabalho, várias linhagens de basiodimicetos foram comparadas primeiramente por sua capacidade em produzir enzimas ligninolíticas por FES utilizando diferentes subprodutos/resíduos agroindustriais. O cultivo dos fungos em condições de cultivo idênticas apresentou uma ampla diferença entre todas as espécies estudadas e entre diferentes linhagens de uma mesma espécie. Esses resultados corroboram vários dados encontrados na literatura

relatando variações nas atividades das enzimas durante o cultivo de várias espécies de basidiomicetos em diversos substratos lignocelulósicos.

Os basidiomicetos da decomposição branca são únicos em sua habilidade para degradar muitos dos componentes da madeira devido a sua capacidade para sintetizar enzimas extracelulares hidrolíticas (celulases e hemicelulases) e oxidativas (ligninolíticas) (ELISASHVILI et al, 2008; ELISASHVILI; KACHLISHVILI; PENNINGCKX, 2008). Estas são responsáveis pela degradação dos maiores componentes do substrato, isto é, celulose, hemicelulose e lignina em compostos de baixo peso molecular que podem ser assimilados pela nutrição fúngica (KIRK; FARRELL 1987; ERIKSSON; BLANCHETTE; ANDER, 1990).

As potenciais aplicações dessas enzimas em tecnologias na indústria e no ambiente requerem enormes quantidades e que apresentem um custo relativamente baixo. Dessa forma, a possibilidade de selecionar novos organismos com alta capacidade biossintética destas enzimas associada à utilização de resíduos ou subprodutos que apresentam ampla disponibilidade e baixo custo compõem um cenário para desenvolver estratégias para um aumento na produção por FES. No entanto, o cultivo em substrato sólido apresenta alta heterogeneidade e os substratos não estão completamente acessíveis ao microrganismo, dificultando também o monitoramento do sistema. Esse fato pode ser uma das explicações sobre o “sobe e desce” nas curvas de produção por FES apresentadas nas figuras 20 a 22.

Substratos lignocelulósicos mostraram induzir eficientemente altas quantidades de enzimas ligninolíticas em outros fungos, no entanto, os resultados apresentados a seguir são inferiores quando comparados aos valores encontrados neste trabalho pelo cultivo de *Coriolopsis byrsina* em farelo de trigo (939 U/g MS) e resíduo de cervejaria (822 U/g MS). Alguns dados da literatura apresentaram que as maiores produções de lacase obtidas por *Coriolopsis rigida* cultivado em meio farelo de cevada foram 108 U/g (GÓMEZ et al., 2005) e por *Trametes hirsuta* foram 68,4 U/g (RODRIGUEZ-COUTO; SANROMÁN, 2005).

Nos estudos de Elisashvili e colaboradores (2008) diferenças consideráveis na quantidade de enzimas hidrolíticas e oxidativas foram encontradas durante o cultivo de *Lentinus edodes* e *Pleurotus* sp em palha de trigo e folhas de árvore (*Fagus sylvatica*). A atividade de CMCase encontrada para as espécies do gênero *Pleurotus* variou de 25 U/frasco (0,5 U/mL considerando que o volume de extração foi 50 mL, segundo o artigo) a 1300 U/frasco (26 U/mL), enquanto a atividade de xilanase variou de 155 (3,1 U/mL) a 2185 U/frasco (43,7 U/mL). Duas linhagens de *L. edodes* foram melhores produtoras de lacase com atividade máxima de 57 U/frasco (1,14 U/mL). Eles ainda mostraram que não apenas as

peculiaridades de cada fungo, mas também a natureza do material lignocelulósico é um fator muito importante que determina a expressão do potencial lignocelulolítico dos fungos.

Papinutti e Forchiassin (2007) estudaram a produção de enzimas lignocelulolíticas em farelo de soja e farelo de soja misturado com farelo de trigo, por *Fomes sclerodermeus* e encontraram valores semelhantes para as enzimas hidrolíticas, enquanto que para as ligninases os valores foram bem menores no meio constituído pela mistura dos dois substratos. Os valores encontrados pelos autores foram de 31, 16,5, 28,42, 14,5 e 520 U/g de endoxilânase, endoglucanase, poligalacturonase, MnP e lacase, respectivamente em meio farelo de soja.

Badhan e colaboradores (2007) obtiveram diferentes produções de xilanase e celulasas quando o fungo termofílico *Myceliophthora* sp IMI 387099 foi cultivado em meio contendo diferentes fontes de carbono. A produção máxima em palha de arroz foi de 900 U/ g MS de xilanase, 32 U/ g MS endoglucanase. A palha de trigo foi um substrato relativamente inferior e a atividade de xilanase foi menor (656,20 U/g MS), embora a atividade de endoglucanase foi comparável ao observado na palha de arroz. A produção dessas duas enzimas nos demais substratos – bagaço de cana, sabugo de milho e farelo de trigo – foi relativamente menor. Os autores atribuíram à natureza heterogênea e a complexidade estrutural da palha de arroz uma relação com a capacidade indutora.

Nos experimentos conduzidos no presente trabalho, a produção de MnP variou de 2,0 a 4,2 U/g, enquanto que para LiP, os valores encontrados foram de 0,9 a 2,5 U/g. Ao explorar os resultados de alguns autores pode-se perceber que estes são muito variáveis com relação à produção destas enzimas. A variação encontrada nos vários trabalhos pode estar relacionada ao microrganismo, ao meio de cultivo utilizado para o crescimento microbiano e também aos protocolos utilizados nos ensaios enzimáticos, que muitas vezes diferem no procedimento ou no substrato de atuação, e dessa forma obtém-se diferentes resultados que não podem ser comparados. Papinutti e Forchiassin (2007) relataram um pico de produção de MnP de 14,5 U/g em 15 dias de cultivo em farelo de soja pelo fungo *Fomes sclerodermeus*, enquanto a atividade de MnP pelo fungo *Lentinus tigrinus* em palha de trigo foi de 0,75 U/g (LECHNER; PAPANUTTI, 2006).

Ao final de todas as etapas de triagem, optou-se para a continuidade dos estudos, usar o fungo *C. byrsina* cultivado em resíduo de cervejaria. Este subproduto mostrou ser interessante tanto econômico (disponibilidade e preço) como nutricionalmente.

Papinutti e Forchiassin (2007) relataram que a produção de enzimas diferiu em quantidade, embora a produção de biomassa fúngica utilizada como inóculo fosse similar nos dois meios de cultura utilizados (farelo de soja e farelo de soja misturado com farelo de trigo).

Dessa forma os autores mostram que a diferença encontrada na produção foi independente da quantidade de biomassa produzida.

Muito das pesquisas realizadas com os fungos da decomposição branca “White-rot” para melhorar a degradação de palhas, cascas e outros resíduos focam principalmente na utilização de um número específico de espécies e linhagens fúngicas. Com exceção de Zadrazil (1985), que examinou aproximadamente 200 linhagens de fungos da decomposição branca, e Capelari e Zadrazil (1997) que triaram 72 espécies e linhagens de fungos tropicais, grande parte dos trabalhos encontrados na literatura usam espécies clássicas como *Phanerochaete chrysosporium*, *Cyathus stercoreus* e *Pleurotus* spp. Além do mais, o enfoque dado nesses trabalhos é em sua maior parte relacionado com a degradação de xenobióticos. Os experimentos deste trabalho foram realizados com um objetivo diferente e pouco comum no que tange a utilização de basidiomicetos, que foi a utilização de extratos enzimáticos no tratamento de alimentos fibrosos, comumente utilizados nas dietas de ruminantes.

Extratos fermentativos contendo enzimas fibrolíticas que são amplamente utilizados para não ruminantes, estão agora, sendo usados em dietas de ruminantes e alguns benefícios já são observados (RODRIGUES et al., 2008; KRUEGER; ADESOGAN, 2008; KRUEGER et al., 2008). O benefício nutricional desta suplementação parece depender de vários fatores, muitos deles ainda sendo avaliados (WALLACE et al., 2001). Alguns autores afirmam que a atividade de enzimas exógenas adicionadas ao rúmen para melhorar a digestibilidade da fibra não pode ser muito alta, devido à própria atividade endógena que está presente naquele ambiente (BEAUCHEMIN et al., 2003; NSEREKO et al., 2000; WALLACE et al., 2001).

Além disso, sugere-se a que a utilização de um coquetel multienzimático, contendo misturas de enzimas como xilanases, celulasas e ferulato esterase, possa ser usado como um aditivo para aumentar a digestibilidade de forragens tropicais que possuem um baixo valor nutritivo devido às concentrações relativamente altas de lignina. As ligações cruzadas entre o ácido ferulico e a lignina limitam o acesso microbiano às xilanas digestíveis na parede celular das forragens tropicais (KRUEGER; ADESOGAN, 2008; KRUEGER et al., 2008).

Muito da variabilidade da atuação enzimática pode ser atribuída a fatores tais como o tipo de enzima, nível de suplementação, método de aplicação da enzima e o balanço energético dos animais teste. A resposta tem sido mostrada como devido a atividade enzimática, mas as enzimas chave envolvidas ainda não são bem conhecidas (BEAUCHEMIN et al., 2003; AVELLANEDA et al., 2008).

Poucos estudos foram publicados com relação aos possíveis efeitos de enzimas ligninolíticas sobre a degradabilidade das fibras vegetais e testaram a adição direta dessas

enzimas em dietas de ruminantes. Alguns estudos foram conduzidos para identificar basidiomicetos da decomposição branca que podem degradar as ligações entre a lignina preservando as fibras de celulose, e desse modo melhorar a qualidade dos substratos lignocelulósicos para alimentação de ruminantes (ZADRAZIL; PUNIYA, 1995; KARUNANANDAA; VARGA, 1996). Além disso, poucos também são os estudos realizados com a utilização de enzimas em forragens tropicais, e tais pesquisas envolvem os mecanismos de ação de celulase, xilanase e feruloil esterase (KRUEGER; ADESOGAN, 2008; KRUEGER et al., 2008).

Os açúcares redutores e proteínas solúveis foram quantificados ao longo do período de cultivo por cada linhagem fúngica, no entanto, estão demonstrados somente para as 3 linhagens que apresentaram as maiores produções de enzimas, como descrito anteriormente.

Ao longo do período de cultivo pôde-se notar consumo na quantidade de açúcar redutor total no meio, enquanto o nível de proteína extracelular aumentou, coincidindo algumas vezes com os picos de secreção das enzimas (Fig. 20, 21 e 22). Embora houvesse uma quantidade elevada de açúcares no início do cultivo, esse não foi suficiente para causar repressão das enzimas, uma vez que foram detectadas atividades enzimáticas nesse período. Esse fato corrobora os dados da literatura que relatam que o mecanismo de repressão catabólita é mais comum em fermentação submersa (FSm) que em fermentação em estado sólido (FES), e é mais conhecido em bactérias que em fungos (SUTO; TOMITA, 2001; VINIEGRA-GONZÁLES et al., 2002; GHRIBI et al., 2007; RAJAGOPALAN; KRISHNAN, 2008).

A queda nos teores de açúcares pode estar relacionada ao consumo destes para o metabolismo microbiano e biossíntese de compostos necessários para o crescimento. Já o aumento de proteínas solúveis no meio pode estar relacionado à secreção das enzimas extracelulares necessárias para decompor os substratos utilizados pelos microrganismos que servirão como fonte de carbono e energia.

A produção e secreção de enzimas extracelulares dependem de muitos fatores que estejam relacionados principalmente ao papel fisiológico dos microrganismos. Em geral, elas são afetadas pela composição do meio de cultura, pH, quantidade de carbono e nitrogênio, temperatura, aeração e presença de substrato ou indutores específicos (MADIGAN et al., 2004).

## 5.2. QUANTIFICAÇÃO DA ENZIMA FERULOIL ESTERASE

Ao final dos ensaios fermentativos, decidiu-se avaliar a atividade da enzima feruloil esterase (FAE) pela sua potencial importância na hidrólise da parede celular. Portanto, utilizou-se apenas o extrato enzimático bruto liofilizado (armazenado) obtido da fermentação de *C. byrsina* em resíduo de cervejaria, uma vez que o presente trabalho não tinha como objetivo estudar o perfil de produção dessa enzima. A atividade encontrada neste extrato enzimático bruto foi de 0,059 U/mL após 3 semanas de cultivo. Esse valor é relativamente baixo quando comparado à atividade de 0,47 U/mL encontrada nos ensaios de Mandalari e colaboradores (2008) utilizando o resíduo de cevada. No entanto, há que se considerar que o procedimento realizado por eles foi diferente do utilizado neste trabalho, e assim torna-se difícil a comparação entre dois protocolos diferentes.

Muitos protocolos experimentais para os ensaios de FAE foram desenvolvidos com base na quantificação do ácido ferulico liberado após a ação enzimática. Uma variedade de substratos naturais e ésteres sintéticos foram introduzidos nos ensaios. Os substratos cromogênicos mais utilizados nos ensaios espectrofotométricos de FAE estão descritos em Marmuse e colaboradores (2007). Métodos cromatográficos também são bastante utilizados na detecção da atividade de FAE (TOPAKAS; VAFIADI; CHRISTAKOPOULOS, 2007; SHIN; CHEN, 2006).

Acredita-se que muito do sinergismo entre celulases e hemicelulases surge da capacidade das segundas em expor as microfibrilas de celulose pela remoção da hemicelulose ou de suas cadeias laterais que estão covalentemente ligadas à lignina. Essa interação deve-se à presença dos ácidos fenólicos, principalmente ferúlico e p-cumárico, encontrados em quantidades significativas em plantas da família Graminacea (PANAGIOTOU; OLAVARRIA; OLSSON, 2007).

Xiros e colaboradores (2009) investigaram a liberação de ácido ferulico do bagaço de cevada utilizando o sistema enzimático de *Fusarium oxysporium*. O extrato bruto produzido continha 24 mU/mL de FAE e 30 U/mL de xilanase e foi utilizado na hidrólise da biomassa, sendo capaz de liberar 2,5 vezes mais ácido ferulico em relação à biomassa não tratada enzimaticamente.

Feruloil esterases (EC 3.1.1.73) (FAE), conhecidas também como esterases de ácido ferúlico, esterases de ácido cinâmico ou cinamoil esterases, são uma classe de enzimas que estão envolvidas na liberação do ácido ferulico e outros ácidos cinâmicos dos polissacarídeos

da parede celular. FAE pode ser usada nos processos de polpa e papel e como aditivos alimentares para animais para facilitar a assimilação de nutrientes (MATHEW apud SHIN; CHEN, 2006). No entanto, o ácido ferulico liberado por ação dessa enzima pode ter ação tóxica, com diferentes graus de inibição, sobre as populações bacterianas presentes no rumen que não estejam adaptadas (VAN SOEST, 1994). O mecanismo pelo qual o ácido ferulico inibe o crescimento microbiano parece não ser bem explorado, mas algumas teorias de controle de microrganismos por agentes químicos sugerem que os derivados fenólicos atuam desnaturando proteínas e rompendo membranas.

De acordo com Jung, Mertens e Payne (1993) os ácidos fenólicos extraídos da alfafa, vanílico, p-hidroxibenzóico, ferúlico, diminuíram a atividade celulolítica das populações bacterianas *Fibrobacler succinogenes* e *Ruminococcus flavefaciens*. Em experimentos com culturas mistas, também houve decréscimo linear na atividade celulolítica e amilolítica quando os ácidos ferulico e p-coumárico foram incubados in vitro. Contudo, os autores recomendaram cuidado na análise desses testes, pois a concentração desses ácidos fenólicos são baixas no rúmen (in vivo), sendo liberadas durante o processo fermentativo, podendo atingir 10 vezes menos a concentração usadas em laboratório. Nessa mesma revisão, os autores citaram outros experimentos nos quais não houve impactos na degradabilidade do amido ou da celulose em uma concentração de ácidos fenólicos semelhante à encontrada em quatro fontes de forragem. Dessa forma, é preciso mais investigações científicas no que concerne a aplicação dessas enzimas na nutrição de ruminantes.

A FAE também pode ser usada para liberar ácido ferúlico da biomassa e subsequentemente ser convertida para vanilina natural. Além disso, como as ligações cruzadas, formadas por meio de ligações éster de ácido ferulico, aumentam substancialmente a recalcitrância da biomassa e a resistência à hidrólise enzimática, a FAE tem um importante função na deslignificação e despolimerização das cadeias de polissacarídeos (SHIN; CHEN, 2006) hidrolisando essas ligações de ester entre os resíduos de açúcar e os compostos fenólicos facilitando o acesso das outras hidrolases.

Outra aplicação de feruloil esterases está relacionada com a produção do etanol combustível a partir de materiais lignocelulósicos renováveis. A FAE-A de *A. niger* foi usada em associação com xilanases e lacases para a conversão de biomassa lignocelulósica em açúcares fermentáveis para a produção de bioetanol. No passo da sacarificação, a eficácia do tratamento enzimático foi avaliada pelo rendimento dos açúcares medidos com os melhores resultados obtidos com a combinação do tratamento FAE-A e xilanase (TABKA et al., 2006).

Grande parte dos estudos e trabalhos publicados sobre feruloil esterases estão relacionados às espécies do gênero *Aspergillus* e *Penicillium*, sendo necessário averiguar a presença e o modo de ação da FAE no sistema enzimático de fungos basidiomicetos. Projetos futuros poderão desvendar quais os fungos desse grupo produzem feruloil esterases, quais os substratos induzem sua produção e quais os tipos de FAE encontradas. Alguns substratos melhoram a indução de esterases devido à complexidade de arabinoxilanas que podem ter muitos grupos laterais substituintes ligados à cadeia principal por ligações do tipo ester (WILLIAMSON apud PANAGIOTOU et al., 2007).

### 5.3. CARACTERIZAÇÃO DAS ENZIMAS PRODUZIDAS PELO CORIOLOPSIS BYRSINA

O pH é um dos fatores importantes em qualquer reação enzimática; dele dependem as conformações da enzima e do substrato, e as condições ótimas de pH (distribuição de cargas ideal) para a ocorrência da interação proteína-substrato e catálise devem ser observadas (NELSON; COX, 2006).

Os experimentos para a caracterização da CMCase, xilanase e lacase foram realizados a partir de soluções enzimáticas brutas obtidas pelo cultivo do fungo em meio sólido contendo cevada, sendo o tempo de cultivo usado, aquele correspondente à maior produção de lacase (3ª semana).

Para a determinação do pH ótimo, utilizou-se tampões com pH entre 4,0 a 7,0 contendo os substratos de atuação das enzimas numa concentração de 0,5%. Para os ensaios de estabilidade frente à variação de pH, os extratos enzimáticos foram submetidos a diferentes valores de pH, numa faixa de 2,5 a 8,0, por um período de 24h a 25 °C e a atividade de referência (100%) foi aquela determinada no tempo zero em água destilada.

As três enzimas apresentaram sua atividade ótima em pH 4,5 (Fig. 23 a).

Observou-se um aumento na atividade residual das enzimas CMCase e lacase durante a avaliação do efeito do pH na estabilidade das enzimas. Sabe-se que na catálise enzimática, alguns íons são capazes de aumentar ou diminuir a atividade de algumas enzimas. Neste caso, algum dos compostos utilizados no preparo do tampão McIlvaine pode ter favorecido a estrutura e estabilidade protéica levando a um aumento na atividade residual. Esse tipo de

ocorrência também fora encontrado no estudo de amilases por *Thermomyces lanuginosus* realizado por Gonçalves (2006).

Com relação ao perfil de estabilidade, A CMCase foi estável na faixa de pH de 2,5 a 8,0, a xilanase apresentou 30% de sua atividade original nos pHs de 3,0 a 8,0 e a lacase apresentou 70% de sua atividade em pH 3,5 e 85% em pH 6,0 a 8,0 (Fig. 23 b).

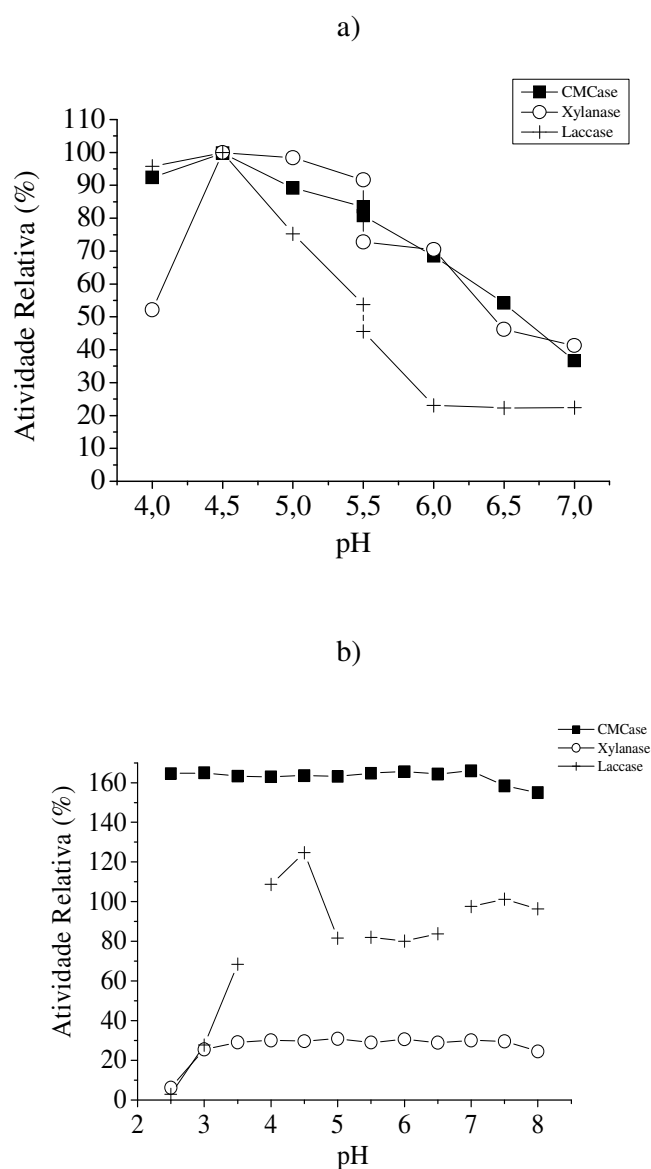


Figura 23. Efeito do pH na atividade (a) e estabilidade (b) das enzimas produzidas em resíduo de cervejaria pelo *C. byrsina* SXS 16

Gao e colaboradores (2008) estudaram a produção e as características de celulases produzidas por *Aspergillus terreus* M11 e encontraram que a CMCase exibiu uma atividade máxima em pH 2,0 e manteve 65% da sua atividade residual quando incubada em pH 2,0 e 3,0 por 6h a 70 °C. Por 24h de incubação, a enzima manteve em torno de 15% de sua atividade em pH 2,0, 3,0 e 4,0.

Khandeparkar e Bhosle (2006) isolaram e caracterizaram uma xilanase produzida por *Arthrobacter* sp MTCC5214 em meio sólido, e verificaram em seus experimentos que a enzima apresentou atividade ótima em pH 9,0. Além disso, a enzima reteve 100% de sua atividade inicial em pH 7,0 e 8,0 após 24 horas de incubação. Lee e colaboradores (2009) estudaram a caracterização de uma xilanase de *Laetiporus sulphureus*, um fungo que causa a decomposição marrom. O pH ótimo para atividade da xilanase foi 3,0 e sua atividade relativa foi mantida em torno de 50 % em pH 2,5 a 5,0. Muitas xilanases fúngicas apresentam atividade elevada em condições ácidas. Xilanases estáveis em condições de pH ácido (pH 1,0 – 5,0) foram relatadas para fungos como *Aspergillus kawachii*, *Penicillium* sp. 40 e *Cryptococcus* sp. S-2 (KRISANA et al., 2005; HEO et al., 2006; IEFUJI et al., 1996). A  $\beta$ -xilanase de *Ceriporiopsis subvermispora* apresentou um pH ótimo de 8,0 quando avaliada durante o processo de biopolpação (MAGALHÃES; MILAGRES, 2009).

Todas as enzimas hidrolíticas estudadas por Heidorne e colaboradores (2006) apresentaram um pH ótimo entre 3,5 e 5,0 e temperatura ótima de 60 °C. Segunda Saha e Zeikus (1989), os valores de pH ótimo encontrados para enzimas com propriedades catalíticas diferentes, diferem entre os microrganismos e os grupos taxonômicos estudados, e os fungos produzem enzimas que apresentam melhor atuação numa faixa de pH de ácido a neutro.

O perfil de atividade da lacase foi similar ao de outras lacases fúngicas que apresentam seus pHs ótimos na faixa mais ácida, como por exemplo *Pycnoporus sanguineus* SCC 108, com atividade máxima em pH 3,0 (LITTHAUER et al., 2007). Já o perfil de estabilidade em diferentes pH por 24h em ausência de substrato diferiu em relação aos dados obtidos de outras lacases. (BALDRIAN 2006). A lacase de *Trametes trogii* apresentou um pH ótimo de 4,0 e sua atividade foi estável em pH 7,0 quando incubada por 24 h em temperatura ambiente e reteve mais de 50 % de sua atividade em pH 5,0. A enzima também foi estável por 24 h a 50 °C, entretanto, ela perdeu mais de 90 % de sua atividade a 60 °C (ZOUARI-MECHICHI et al., 2006).

De acordo com Baldrian (2006) as lacases fúngicas apresentam sua faixa ótima de atuação em pH ácidos, em função dos padrões estruturais da enzima: a atividade das lacases diminui à medida em que a proporção de ânions OH<sup>-</sup> no meio aumenta, porque as hidroxilas

se ligam aos cobres dos domínios T2/T3 do sítio ativo, bloqueando a transferência de elétrons. Uma possível explicação para o comportamento observado em relação a estabilidade é que após 24 horas de incubação em pH ácido, os efeitos sobre a estrutura protéica e eventual desnaturação tenham suplantado aqueles causados ao sítio ativo por hidróxi-ânions em meio neutro (HENN, 2009).

Como revisado por Graminha e colaboradores (2008), as enzimas requerem uma atividade ótima e estabilidade por um período de tempo prolongado para serem efetivas. Colombatto e colaboradores (2004c) demonstraram que enzimas mesofílicas conservam pelo menos 70% de sua atividade por 48 h em 39 °C numa escala de pH de 4,0 a 6,8; enzimas de microrganismos termofílicos têm frequentemente melhores estabilidades que enzimas de microrganismos mesofílicos. Aumentando a estabilidade das enzimas, o rendimento dos produtos para serem usados em dietas de ruminantes pode ser aumentado. Em adição, o uso direto de enzimas como aditivos em rações ou suplementos alimentares para agir dentro do rúmen pode ser demonstrado na prática. Tais enzimas devem ser estáveis sob as condições físico-químicas do rúmen, como pH de aproximadamente 6,0 e temperaturas até 40 °C, assim como resistência aos sais e proteases.

Com relação à temperatura ótima de atuação, a endoglucanase teve seu melhor desempenho entre 40 e 50°C, a xilanase entre 50 e 60 °C e a lacase em 40 e 55 °C. Todas elas, exceto a lacase, mantiveram em torno de 60 a 90 % das suas atividades iniciais quando incubadas por 1 hora em ausência de substrato em temperaturas de 30 a 50°C (Fig. 24).

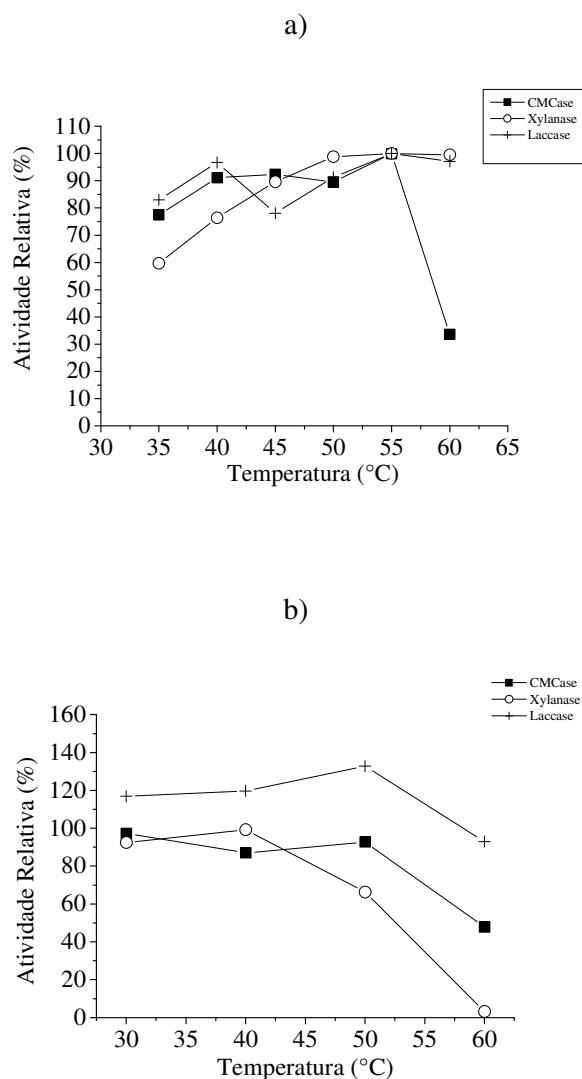


Figura 24. Efeito da temperatura na atividade (a) e estabilidade (b) das enzimas produzidas em resíduo de cervejaria pelo *C. byrsina* SXS 16

A tabela 11 apresenta um resumo das características físico-químicas encontradas para a CMCase, xilanase e lacase estudadas neste trabalho.

Para a lacase foi observado um aumento na atividade residual após incubação da enzima em ausência de substrato. Esse fenômeno também foi relatado por Neto (2006), mas ainda é pouco explicado.

A maior atividade para a xilanase de *Laetiporus sulphureus* foi detectada a 80 °C e sua atuação diminuiu rapidamente em temperaturas acima de 80 °C. Entretanto, a enzima ainda reteve 70 % de sua atividade em 90 °C (LEE et al., 2009). Muitas xilanases provenientes de fungos são mesofílicas e a temperatura ótima para xilanases de fungos decompositores de

madeira são tipicamente entre 50 e 60 °C (LEE; WONG; ROBERTSON, 2005; KREMER; WOOD, 1992; LEE et al., 2007; KIMURA et al., 2000).

Ritschkoff, Buchert e Viikari (1994) relataram uma xilanase termofílica do fungo da decomposição marrom *Gloeophyllum trabeum* que demonstrou atividade ótima a 80 °C e pH 4,0. Entretanto sua atividade relativa foi cerca de 50% a 90 °C. As condições ótimas para a atividade de xilanase de *C. byrsina* no presente estudo foram inferiores àquelas relatadas para *L. sulphureus* e *G. trabeum*.

As propriedades bioquímicas da xilanase de *Ceriporiopsis subvermispora* foram avaliadas durante o processo de biopolpação, e os pesquisadores relataram que a enzima teve uma atividade ótima em 50 °C tendo uma pequena redução na atividade entre 50 e 60 °C (MAGALHÃES; MILAGRES, 2009).

Enzimas estáveis e ativas em temperaturas muito elevadas são comumente descritas para microrganismos termofílicos e termotolerantes e são consideradas mais resistentes a desnaturantes químicos, como solventes, e a altas concentrações de sais. Enzimas comerciais termoestáveis poderiam ser mais benéficas em alimentos para animais, se adicionadas aos alimentos antes do processo de peletização (tipicamente realizado a 70 – 95 °C).

Considerando-se que muitas das enzimas comerciais testadas, frequentemente tem pH e temperatura ótimos que diferem marcadamente das condições no rúmen onde a temperatura é 39 °C e o pH de 5,5 a 6,8, o mais importante é que elas permaneçam ativas por um maior período de tempo.

Tabela 11. Resumo da caracterização físico-química das enzimas.

	faixa ótima de pH	faixa de estabilidade ao pH	faixa ótima de T°C	faixa de estabilidade à T °C
<b><i>Corioloopsis byrsina</i></b>				
CMCase	4,5	2,5 - 8,0 (>100% AR*)	40-45	30 - 50 (90 % AR*)
Xilanase	4,5-5,0	3,0 - 8,0 (30% AR*)	50-60	30 - 40 (90% AR*)
Lacase	4,5	3,5 - 8,0 (70 - 100% AR*)	40 e 55	30 - 50 (>100% AR*)

\*AR- Atividade Residual

#### 5.4. AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO DAS ENZIMAS DO CORIOLOPSIS BYRSINA QUANDO SUBMETIDAS ÀS CONDIÇÕES DO FLUIDO RUMINAL

Suplementos contendo enzimas são amplamente aplicados nas indústrias de alimentos de aves e suínos, mas ainda estão sob desenvolvimento em dietas de ruminantes. Um grande problema é que enzimas não glicosiladas quando usadas como aditivos em alimentos, particularmente proteínas solúveis, são em geral, rapidamente degradadas no rúmen (VYVER et al., 2004). Para que as enzimas sejam eficazes como modificadoras da fermentação ruminal, elas devem resistir as condições ruminais como temperatura, pH e principalmente à proteólise pelos microrganismos ruminais por um tempo suficientemente longo para influenciar a digestão. Além disso, no rúmen há um fluxo constante de matéria que determina os parâmetros de cinética ruminal (ingestão, passagem e digestibilidade). Chesson (apud VYVER et al., 2004) considerou que a liberação no meio ruminal poderia expor as enzimas exógenas a condições desfavoráveis (temperatura, pH e condições físicas da digestão), podendo comprometer sua estrutura e, conseqüentemente, limitar sua atividade no substrato.

Neste ensaio, as enzimas foram misturadas com fluido ruminal e ao longo do tempo alíquotas foram retiradas e a atividade das enzimas foi quantificada.

A CMCase manteve-se estável quando incubada no fluido ruminal por 24 h (Fig. 25), enquanto a atividade de xilanase foi diminuindo gradativamente ao longo do período de incubação mantendo cerca de 30% de sua atividade inicial após 24 h. A lacase foi a enzima menos tolerante às condições ruminais, apresentando apenas 30% de sua atividade inicial após 6 h de incubação, e após 8h já não foi mais detectada.

Esta análise forneceu informações a respeito do tempo da atividade catalítica das enzimas nas condições físico-químicas do rúmen. É preciso ressaltar que durante a execução desse experimento, em laboratório, houve a manipulação da ingesta para incubação com a enzima permitindo a entrada de oxigênio, e portanto, não reproduzindo as reais condições do ambiente ruminal.

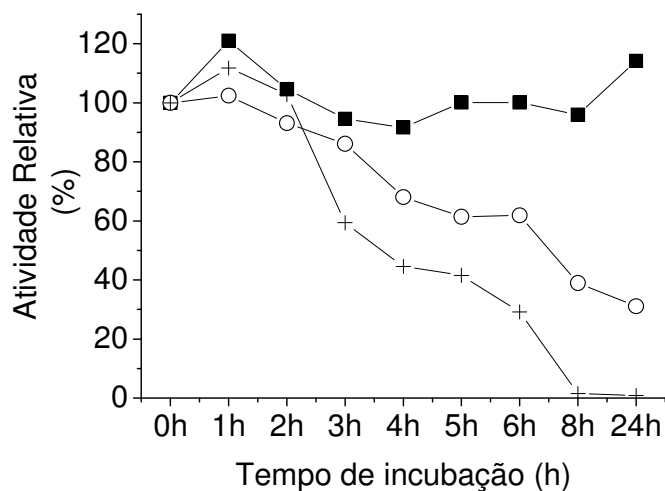


Figura 25. Efeito do tempo de incubação da lacase (+), xilanase (○) e CMcase (■), produzidas pelo *C. byrsina* em resíduo de cervejaria, na presença de fluido ruminal

Considerando-se a taxa de fluxo do fluido ruminal de 3,3 L/h e um volume de líquido total de 29,35 L, a reciclagem total desse volume aconteceria em teoricamente em 8,89 h (MARTINS et al. 2006). Em 4 h, período onde se encontra 50% da atividade inicial de lacase, 70% de xilanase e 90% de CMcase (Fig. 25), aproximadamente 50% do fluido ruminal teria sido renovado, e, desta forma, um período de 3 h seria suficiente para a atuação de enzimas exógenas.

Neste caso, o extrato enzimático deve ser continuamente adicionado para que se mantenha uma quantidade de enzima capaz de atuar nas fibras melhorando sua digestão. Outra forma seria promover a proteção da enzima por encapsulação de tal forma que ela vai sendo liberada gradativamente no decorrer do tempo.

Morgavi e colaboradores (2000) avaliaram o potencial de preparações comerciais quanto à estabilidade nas condições do fluido ruminal. Dentre os preparados, o que possuía xilanase proveniente de *T. viride* foi o mais estável, preservando sua atividade em 90% com seis horas de incubação.

Vyver e colaboradores (2004) relataram que a xilanase desglicosilada utilizada em seus experimentos perdeu cerca de 40% de sua atividade original dentro das primeiras 6 h de incubação em fluido ruminal, enquanto que a xilanase glicosilada reteve mais a sua atividade no mesmo período de tempo.

Enzimas fibrolíticas exógenas podem reter atividade mesmo no intestino de pequenos ruminantes, como foi demonstrado por Hristov e colaboradores (1998a, b). Alguns pesquisadores acreditam que a glicosilação pós-traducional inibe a proteólise e infere alguma proteção para as enzimas contra a degradação (WANG et al., 1998).

Vários estudos demonstraram que o tratamento do alimento com enzimas fibrolíticas antes da alimentação, ou incubada com fluido ruminal, aumentaram os efeitos benéficos das enzimas na fermentação ruminal (GIRALDO et al., 2004; GIRALDO et al., 2007; GIRALDO et al., 2008).

No entanto, a grande maioria de pesquisas na área de suplementos com enzimas exógenas para ruminantes tem focado em preparações de enzimas fibrolíticas e digestão de fibras. O aumento da digestão da fibra no rúmen pode largamente explicar melhorias na produtividade dos ruminantes resultante da suplementação dietética com enzimas degradantes de parede celular.

### 5.5. HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DAS FIBRAS VEGETAIS

Para avaliar a taxa de hidrólise enzimática das fibras vegetais foi utilizada uma mistura de extratos enzimáticos, onde o extrato produzido por *C. byrsina* apresentou alta atividade de lacase e o extrato produzido por *Trichoderma reesei* QM9414, que produziu grande quantidade de xilanase em meio constituído por bagaço de cana e farelo de trigo (1:1) a 28 °C por 8 dias. O ensaio foi conduzido dessa forma uma vez que testes preliminares usando somente a enzima de *C. byrsina* não apresentaram quantidades de açúcares detectáveis pelo método de Somogy-Nelson (1952). A tabela 12 apresenta as quantidades de enzima utilizadas no processo (U totais).

Os resultados apresentados na Figura 26 evidenciam a liberação de açúcares em todos os tratamentos. Os açúcares presentes no próprio extrato enzimático também foram quantificados e descontados das amostras tratadas ao final da reação de hidrólise. Com exceção do bagaço de cana, as demais forragens não foram lavadas e nem passaram por processo de diálise, sendo assim, a detecção de açúcares nas amostras controle (sem a presença da enzima) está relacionada à presença destes nas amostras e também à hidrólise natural que ocorre somente na presença de água.

Com relação aos tratamentos, pode-se observar que houve diferença nas quantidades de açúcares liberados por ação das enzimas principalmente para macega, Tanzânia e braquiária.

A quantidade de açúcares liberados na macega de *Brachiaria brizantha* utilizando 6 mL de extrato enzimático correspondeu a 40,4 mg/g após 24 h de hidrólise contra os 12,8 mg/g liberados no controle. O mesmo tratamento quando aplicado para os capins Tanzânia e braquiária liberaram 57,5 mg/g (contra 19,58 mg/g no controle) e 36,4 mg/g de açúcar redutor (contra 30,6 mg/g no controle), respectivamente.

Considerando a biomassa seca total da amostra, haveria, por exemplo, para o capim macega um valor de 4% de hidrólise, entretanto, se for considerado que esse material possui aproximadamente 70% de polissacarídeos (hemicelulose + celulose – Tab. 14), esse valor eleva-se para 6%, o que pode significar um ganho energético dentro do sistema ruminal.

Dentre os materiais testados, o bagaço de cana in natura (BIN) foi o que apresentou a menor taxa hidrólise chegando a um máximo 8,11 mg/g açúcares liberados.

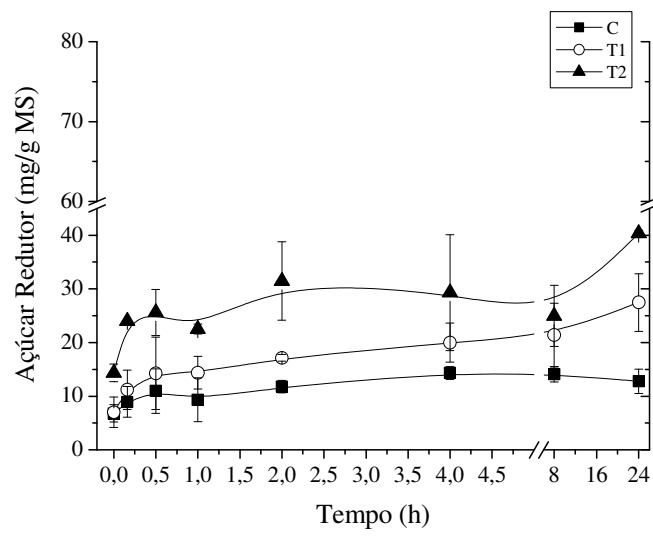
É também possível analisar que a maior velocidade de hidrólise ocorreu nas primeiras 4 horas de incubação. Como esses materiais não sofreram nenhum tipo de pré-tratamento, a utilização de enzimas pode ser considerada adequada.

A menor quantidade de fibra e menor porcentagem de lignina expressa na FDN presente no capim braquiária “verde” o torna mais susceptível à hidrólise. A presença de água pode provocar um entumescimento da fibra e diminuir o grau de polimerização da celulose e facilitar a liberação de alguns açúcares.

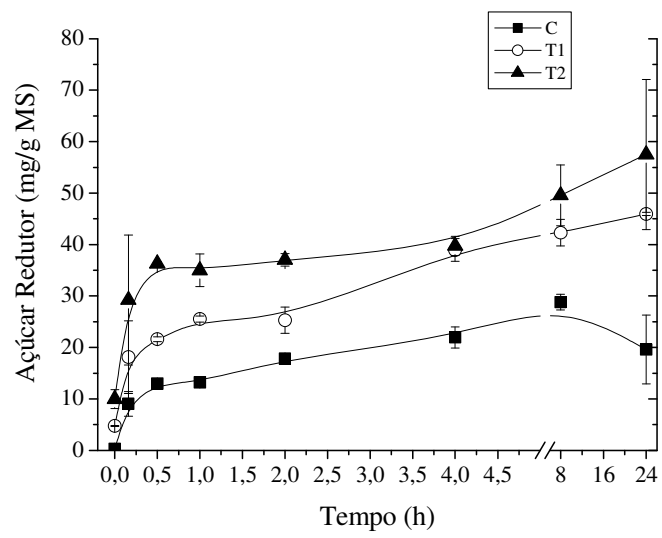
Tabela 12. Composição enzimática do extrato bruto utilizado no experimento de hidrólise.

Microrganismo	Volume utilizado (mL)	U totais			
		Lac	CMcase	Xil	B- glicosidase
<i>C. byrsina</i>	1,0	67,8	4,6	23,9	0,13
<i>Trichoderma reesei</i>	1,0				
<i>C. byrsina</i>	3,0	203,4	13,8	71,4	0,39
<i>Trichoderma reesei</i>	3,0				

A



B



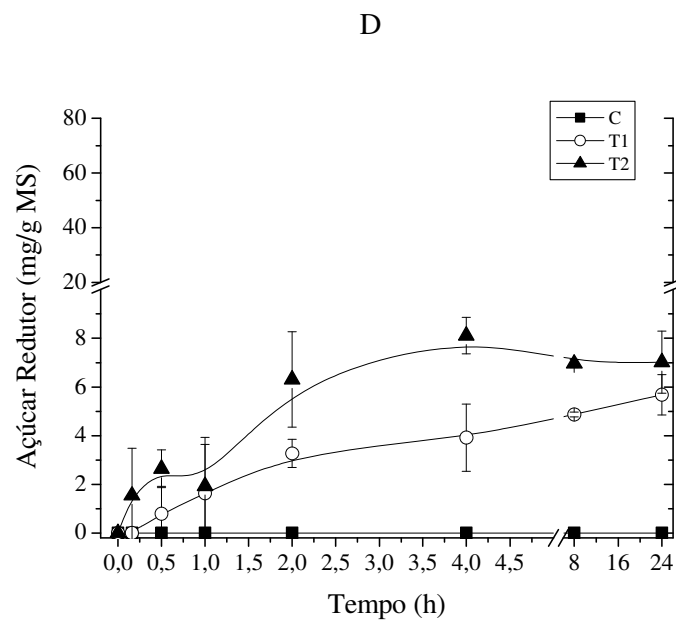
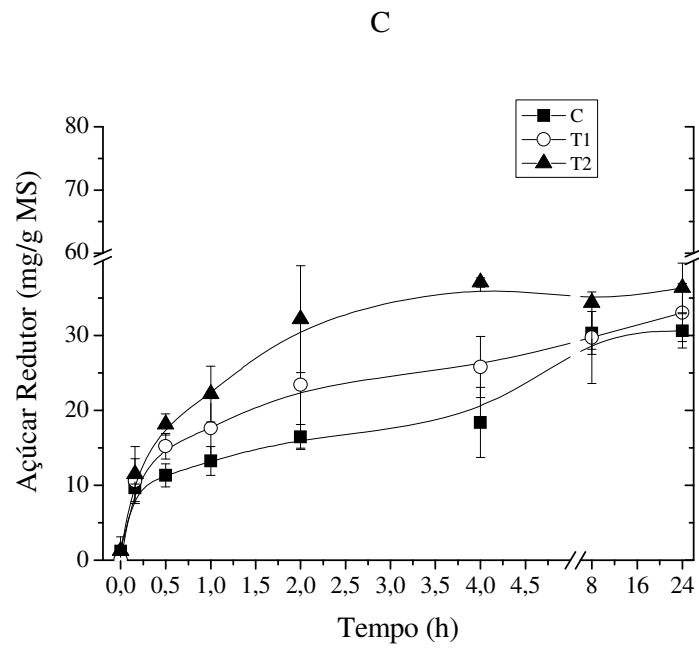


Figura 26. Hidrólise enzimática das fibras vegetais por 24 h. C = grupo controle (tratado com água); T1 = tratado com 2 mL e T2 = tratado com 6 mL. (A) Capim Brachiaria em estágio avançado de maturidade (Macega) (B) Tanzânia (C) *Brachiaria decumbens* (D) Bagaço de cana *in natura*

A análise estatística aplicada, ANOVA fatorial, mostrou que houve uma diferença significativa no tipo de material vegetal ( $F=203,62$ ;  $p=0,0$ ), os tratamentos ( $F=70,459$ ;  $p=0,0$ ), o tempo ( $F=6,109$ ;  $p<0,05$ ) e para as interações entre vegetal x tratamento ( $F=12,27$ ;  $p=0,0$ ) e tratamento x tempo ( $F=5,84$ ;  $p<0,01$ ).

A hidrólise enzimática de biomassa lignocelulósica, vem sendo cada dia mais estudada para encontrar doses ideais para o processo de sacarificação quando se trata da obtenção do álcool de segunda geração. Muitos trabalhos apresentam taxas de recuperação dos açúcares hidrolisados relativamente altas. A maioria frequentemente associa algum pré-tratamento, seja ele físico ou químico, à hidrólise enzimática.

Várias enzimas são requeridas para a hidrólise dos polissacarídeos estruturais da parede celular vegetal. A utilização de enzimas fibrolíticas exógenas na hidrólise desses materiais mostra a forma de atuação das enzimas sobre o substrato e a eficácia com que essas enzimas estão atuando na formação do produto (açúcares). A melhora na disponibilização desses açúcares fermentecíveis, presos na barreira física formada pela lignina, permitirá um maior e melhor aproveitamento da celulose pela microbiota ruminal. É importante ressaltar que esses microrganismos fermentadores da celulose no rúmen são capazes de hidrolisá-la completamente se não fosse a presença da hemicelulose e da lignina.

Apesar dos esforços de investigação de institutos de pesquisa, universidades, governo e particularmente as indústrias do mundo todo que resultaram em significativas reduções de custo das enzimas, há considerável influência das características dos substratos na eficiência de hidrólise. As tentativas de correlacionar propriedades do substrato específico com a eficácia da hidrólise enzimática das celulasas foram problemáticas, principalmente devido à heterogeneidade da matriz lignocelulósica e diferenças entre os substratos resultantes após diferentes estratégias de pré-tratamento (CHANDRA et al., 2007). Os fatores do substrato mais frequentemente relatados em limitar ou influenciar a eficácia enzimática na hidrólise da celulose tem sido a cristalinidade desse polissacarídeo, o teor de lignina e a forma como ela encontra-se distribuída no substrato, o grau de polimerização da celulose e sua área de superfície que é acessível às enzimas. Nas fibras de celulose coexistem regiões de alta cristalinidade e regiões amorfas menos organizadas, e quanto maior for a proporção da forma cristalina, maior a resistência ao ataque enzimático (MANSFIELD; MOONEY; SADDER, 1999).

O bagaço da cana foi menos acessível às enzimas, quando comparado às outras forragens. Apesar da composição bromatológica (expressa em porcentagem de MS) do bagaço ser semelhante à da macega (tab. 14), o arranjo e disposição dos polímeros de celulose

e hemicelulose e suas interações com a lignina podem limitar o grau de hidrólise dos polissacarídeos.

O bagaço apresenta consideráveis quantidades de celulose, entretanto, seu teor de lignina é 2 a 4 vezes maior que os capins verdes (tanzânia e braquiária). A lignina, que protege a biomassa de agressões externas, sejam elas biológicas, físicas ou químicas (BON et al, 2008) dificulta o acesso das enzimas. E como o substrato é insolúvel em solução aquosa, as enzimas têm que entrar em contato com a superfície para que possam reagir.

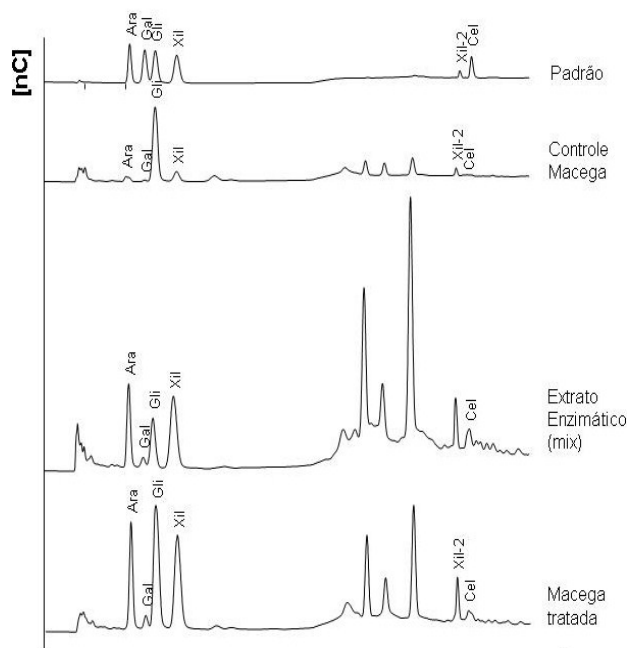
Ao considerar a quantidade de açúcares redutores totais (Fig. 26) provenientes da hidrólise enzimática do bagaço expressa em quantidade de celulose, a porcentagem de hidrólise obtida foi de 10%, evidenciando dessa forma, maior eficiência hidrolítica.

Esses dados são importantes visto que o bagaço é considerado um alimento de baixa qualidade para ruminantes e a aplicação de enzimas fibrolíticas exógenas nesse tipo de material seria de grande importância.

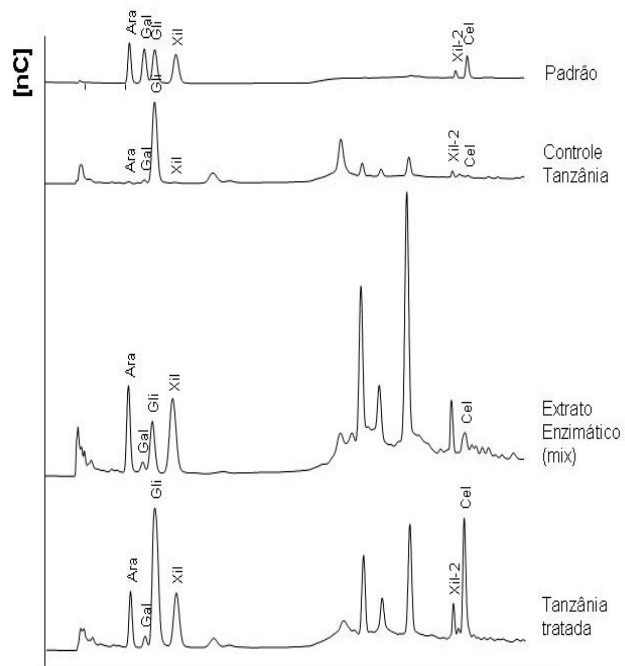
Etapas de pré-tratamento antes da hidrólise enzimática têm sido propostas devido à necessidade de aumentar a acessibilidade do substrato às celulases. Hendriks e Zeeman (2009) revisaram em seu artigo vários pre-tratamentos utilizados para melhorar a digestibilidade da biomassa lignocelulósica. No entanto, todos esses trabalhos são voltados para o setor energético que buscam hidrolisar a lignocelulose para a obtenção do álcool de segunda geração.

#### 5.6. ANÁLISE QUANTITATIVA E QUALITATIVA DOS AÇÚCARES LIBERADOS NA HIDRÓLISE VEGETAL POR HPAEC-PAD

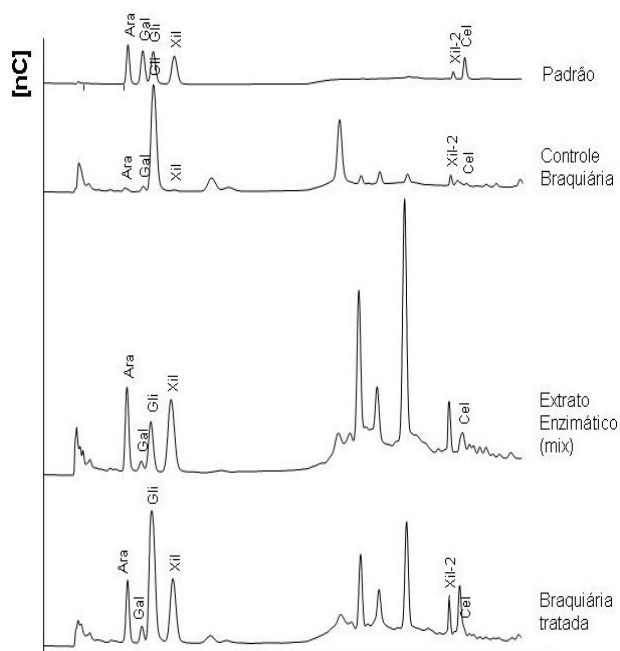
A análise cromatográfica das amostras e controles (substrato e enzima) foi realizada para verificar e quantificar quais açúcares foram liberados durante a hidrólise (Fig. 27). A condição utilizada foi a melhor obtida no primeiro ensaio, ou seja, volume de 6 mL sob 24h de agitação a 40 °C, conforme descrito na tabela 12. Nesta análise, foram identificados e quantificados os carboidratos glicose, xilose, arabinose, galactose, celobiose e xilobiose (Fig.27), através de suas respectivas curvas de calibração (R = 0,98483; 0,99828; 0,99783; 0,99709; 0,99987; 0,99991).



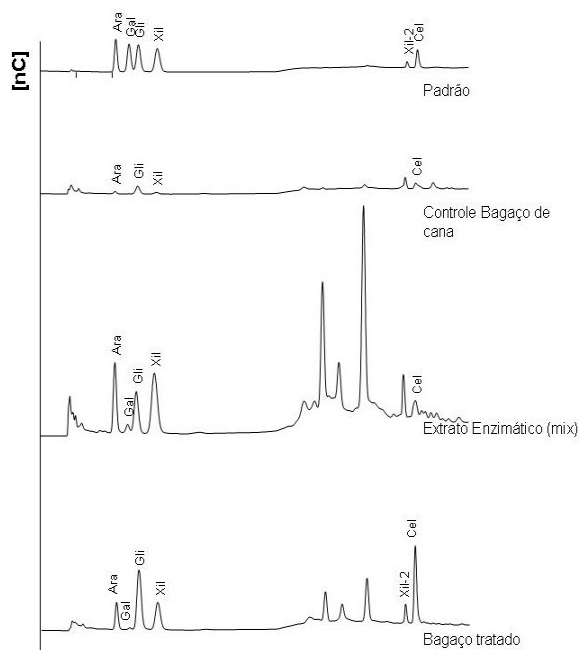
A



B



C



D

Figura 27. Perfil dos açúcares identificados nas análises feitas por HPAEC-PAD; Ara (arabinose), Gal (galactose), Gli (glicose), Xil (xilose), Xil-2 (xilobiose) e Cel (celobiose). (A) macega (B) Tanzânia (C) braquiária (D) bagaço de cana *in natura*

A tabela 13 apresenta os resultados da quantidade total e individual dos açúcares detectados pelo HPAEC-PAD. Pela análise pode-se observar que o tratamento apresentou boa resposta para todas as amostras quando comparado ao controle, confirmando os resultados obtidos no primeiro experimento.

A quantidade de açúcares liberados diferiu de uma amostra para outra. Isso pode estar relacionados com as quantidades de hemicelulose, celulose e lignina presentes em cada um dos vegetais, com as diferentes composições e arranjos dos polímeros em suas células e também com a forma de atuação das enzimas em cada um desses alimentos.

Fica claro que a atuação de enzimas do complexo xilanolítico foi bastante expressiva ao verificar as quantidades de arabionose, xilose e xilobiose, principalmente no capim braquiária em estágio avançado de maturidade (macega).

A fermentação de carboidratos no rúmen dá origem à produção de ácidos graxos voláteis que representam a principal fonte de energia para ruminantes, atendendo até 80% das exigências diárias. Além disso, o uso de carboidratos pelos microrganismos do rúmen é um fator crítico para a maximização da síntese de proteína microbiana e manutenção da função ruminal (Nussio apud BERCHIELLI et al., 2006).

Encontrar a dose enzimática que irá agir com eficiência ainda representa um ponto crítico no processo. Esses resultados, embora sejam preliminares, indicam a possibilidade de uso das enzimas no tratamento de forragens tropicais e outros alimentos fibrosos utilizados pelos ruminantes.

É importante destacar que as enzimas atuaram de forma expressiva na celulose do bagaço liberando maior quantidade de glicose entre todos os materiais estudados, equanto nos demais, parece que a hemicelulose foi o polissacarídeo mais hidrolisado (Tab. 13).

Tabela 13. Análise dos carboidratos liberados após 24 h de hidrólise enzimática, por HPAEC-PAD. (T) tratamento com as enzimas obtidas do cultivo de *C. byrsina* em resíduo de cervejaria e *T. reesei* QM9414 em bagaço de cana + farelo de trigo (1:1p/p) (C) controle (sem enzimas).

Amostras	Carboidratos ( $\mu\text{g/mL}$ )													
	arabionose		galactose		glicose		xilose		xilobiose		celobiose		total	
	T	C	T	C	T	C	T	C	T	C	T	C	T	C
Macega	80,1	1,0	2,7	0,3	363,6	225,8	93,3	12,9	24,2	1,7	4,3	2,4	570,3	247,7
Tanzânia	16,1	1,7	1,8	0,6	446,5	209,0	26,3	1,0	14,0	0,2	72,1	0,5	613,1	235,0
Braquiária	29,0	4,8	4,2	1,2	427,9	383,0	39,2	1,3	15,5	2,2	33,8	0,9	529,7	375,4
Bagaço de cana in natura	8,3	0,8	-0,4	nd	251,8	0,6	26,3	0,9	15,9	nd	-5,4	2,4	248,8	2,5

## 5.7. AVALIAÇÃO DA DIGESTIBILIDADE IN VITRO PELA TÉCNICA DE PRODUÇÃO DE GASES

A digestão do ruminante pode ser estudada utilizando-se uma variedade de procedimentos laboratoriais. Dentre eles, o método de fermentação *in vitro* é mais barato e mais fácil de ser repetido do que os demais métodos com animais, além de requerer uma pequena quantidade de reagentes e muitos substratos poderem ser estudados rapidamente. Nele, os microrganismos do rúmen são incubados em um substrato, ou qualquer outra amostra que se queira analisar. É geralmente utilizado na quantificação do desaparecimento do substrato, como o da matéria seca, muito correlacionado com a digestibilidade *in vivo*.

As técnicas *in vitro* de produção de gases são capazes de simular o ambiente ruminal e a digestão enzimática (THEODOROU et al., 1994). Elas também descrevem a cinética de fermentação ruminal e estimam o consumo, sendo dessa forma, uma opção para o estudo de diversos alimentos utilizados na dieta de ruminantes.

O experimento utilizando a técnica de produção de gases avaliou quatro alimentos diferentes cuja composição bromatológica foi determinada (Tab. 14) e três volumes de extrato enzimático, 2, 4 e 6 mL (tab. 15). As Figuras 28, 29, 30 e 31 mostram o perfil de produção de gases ao longo do tempo, e as tabelas 16 e 17 indicam os valores da digestibilidade *in vitro* na matéria orgânica (DIVMO) e a quantidade de nutrientes digestíveis totais (NDT) nos tempo de 24, 48 e 60 h. O experimento foi conduzido em triplicata e com repetição, como descrito no item 10 de Materiais e Método.

A análise estatística aplicada, ANOVA, também mostrou neste experimento que houve uma diferença significativa no tipo de alimento ( $F=52,394$ ;  $p=0,0$ ), para os tratamentos ( $F=53,926$ ;  $p=0,0$ ), e na interação alimento x tratamento ( $F=2,437$ ;  $p<0,01$ ).

Os alimentos que receberam a dose de 6 mL apresentaram um aumento considerável na DIVMO e NDT em 24 e 48 h quando comparado aos alimentos que não receberam o tratamento enzimático. Em 24 h, o capim braquiária apresentou uma diferença de 11,44% na DIVMO em relação ao controle, e quando analisou-se o percentual de digestibilidade em 48 h, essa diferença passou a ser de 18,58%. Nos demais alimentos o mesmo padrão foi observado, sendo os melhores resultados encontrados para o BIN (11,85%) e o tanzânia (13,03%) em 24 h e o capim braquiária (18,58%) e o Tanzânia (19,69%) em 48 h.

Conforme os resultados observados, pode-se dizer que a presença da enzima melhorou o processo de digestão da matéria orgânica e contribuiu para um aumento na quantidade de nutrientes digestíveis de todos os alimentos avaliados. É importante frisar que a porcentagem de lignina presente no bagaço de cana e na macega de *B. brizantha* é maior quando comparada à porcentagem presente nas forragens verdes, no entanto, o aumento observado no percentual de digestibilidade das forragens verdes não foi expressivamente maior. Esse resultado mostra que não é apenas a quantidade de lignina presente na parede celular que influencia na digestibilidade de um alimento, mas também o arranjo e os tipos de interações existentes entre todos os polímeros da parede.

Analisando-se os gráficos de produção de gás (Figs. 28, 29, 30 e 31), pode-se observar que o extrato enzimático bruto atuou sobre os alimentos durante a fermentação, liberando açúcares, e estes provavelmente foram assimilados pela microbiota presente no líquido ruminal com respostas significativas no volume dos gases produzidos.

Tabela 14. Composição química dos diferentes volumosos utilizados na digestibilidade in vitro por gases. Os valores relatados são a média de duas medidas.

Análises químicas	Bagaço de Cana in natura	Capim <i>Brachiaria decumbens</i>	Capim Tanzânia	Macega
MS	94,5	92,58	93,88	94,89
MM	4,78	8,79	8,19	4,92
EE	0,46	2,11	1,02	0,59
PB	1,93	16,01	10,65	3,85
FDN	89,49	52,22	72,52	82,41
FDA	55,09	24,63	42,13	50,33
Lignina	8,11	2,03	4,31	7,78
Hemicelulose	34,4	27,59	30,39	32,08
Celulose	46,98	22,6	37,82	42,55
NDT	46,85	65,44	55,06	49,38

Resultados expressos em porcentagem (%) de MS. FDN – fibra em detergente neutro; FDA – fibra em detergente ácido; NDT – nutrientes digestíveis totais.

Tabela 15. Composição enzimática do extrato bruto utilizado no experimento de digestibilidade in vitro do bagaço de cana, macega de *B. Brizantha*, Tanzânia e *B. Decumbens*.

Microrganismo	Volume utilizado (mL)	U totais (Atividade Específica)		
		Lac	CMcase	Xil
<i>Coriopsis byrsina</i>	2	7,11	0,42	1
	4	14,22	0,84	2
	6	21,34	1,28	3

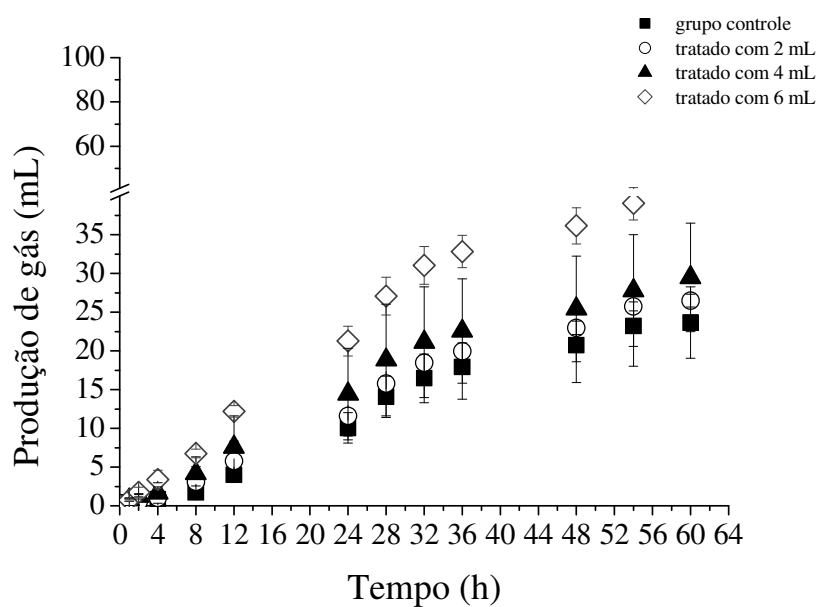


Figura 28. Digestibilidade in vitro com produção de gás do capim macega de *B. brizantha*

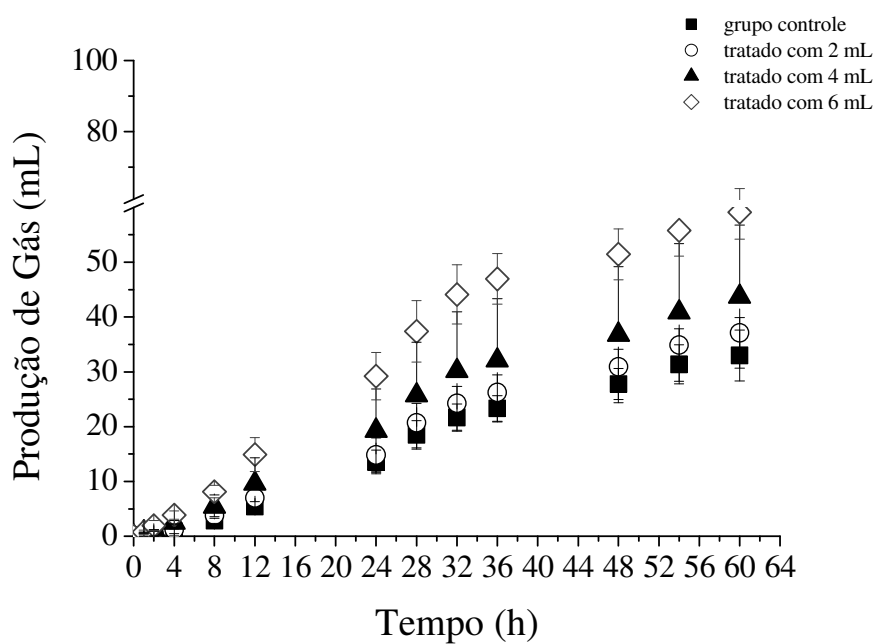


Figura 29. Digestibilidade in vitro com produção de gás do capim tanzânia

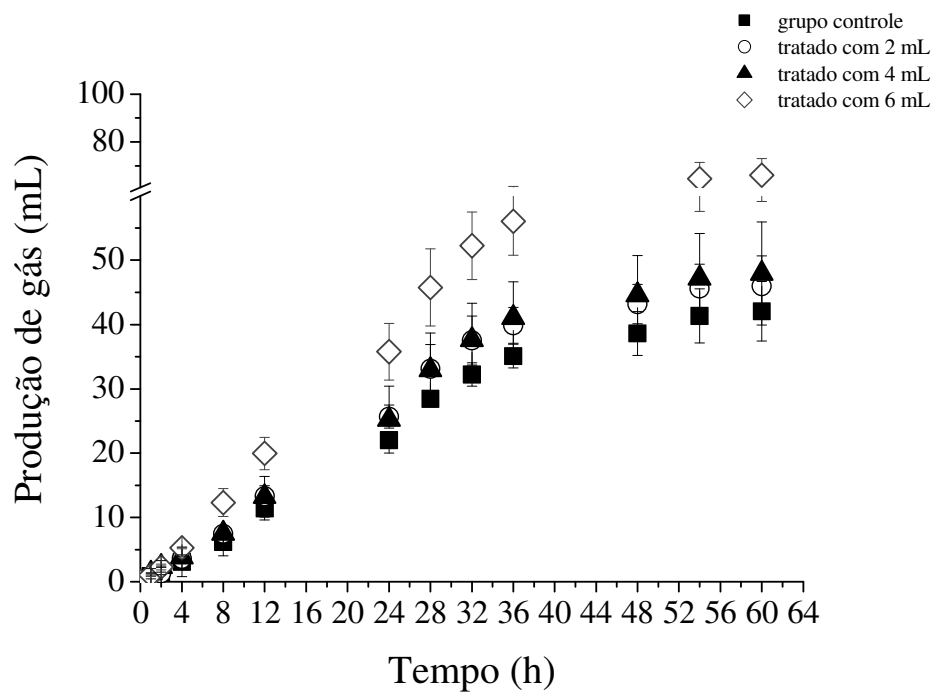


Figura 30. Digestibilidade in vitro com produção de gás do capim *B. decumbens*

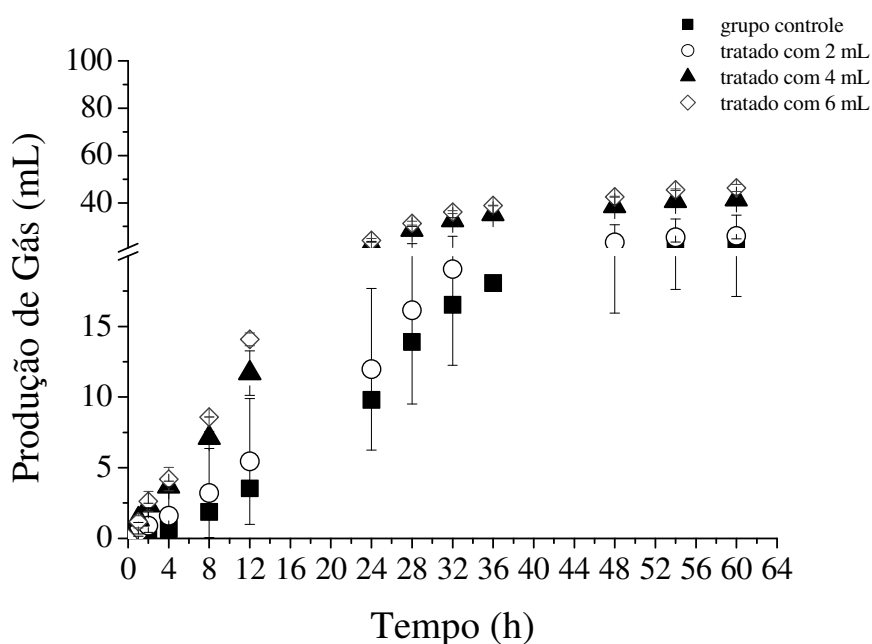


Figura 31. Digestibilidade *in vitro* com produção de gás do bagaço de cana *in natura*

Tabela 16. Digestibilidade *in vitro* da matéria orgânica (%) de diferentes alimentos usando solução enzimática bruta obtida pelo cultivo de *C byrsina*.

Alimento	Volumes Extrato Enzimático (mL)			
	0	2	4	6
% DIVMO 24 h				
Braquiária	44,34	47,39	46,98	55,78
Bagaço de Cana	25,80	28,43	35,83	37,65
Macega	26,90	28,22	30,55	36,23
Tanzânia	34,67	40,64	39,44	47,70
% DIVMO 48 h				
Braquiária	58,13	61,93	63,11	76,71
Bagaço de Cana	34,69	38,15	49,73	53,02
Macega	35,81	37,67	39,70	48,61
Tanzânia	46,50	54,25	54,00	66,19
% DIVMO 60 h				
Braquiária	60,99	64,26	65,89	81,00
Bagaço de Cana	36,92	40,42	52,11	56,13
Macega	38,21	40,58	43,07	52,33
Tanzânia	50,84	57,39	59,76	72,55

DIVMO – digestibilidade *in vitro* da matéria orgânica.

Tabela 17. Estimativa dos nutrientes digestíveis totais (%) nos diferentes alimentos analisados usando solução enzimática bruta obtida pelo cultivo de *C. byrsina*.

Alimento	Volumes Extrato Enzimático (mL)			
	0	2	4	6
	% NDT 24 h			
Braquiária	41,23	44,53	44,10	53,60
Bagaço de Cana	24,13	26,08	34,97	36,94
Macega	26,49	27,91	30,43	36,57
Tanzânia	30,94	37,41	36,10	45,03
	% NDT 48 h			
Braquiária	56,14	60,25	61,53	76,22
Bagaço de Cana	33,74	36,27	49,99	53,54
Macega	36,11	38,12	40,32	49,95
Tanzânia	43,74	52,11	51,85	65,01
	% NDT 60 h			
Braquiária	59,23	62,76	64,53	80,86
Bagaço de Cana	36,15	38,67	52,55	56,91
Macega	38,71	41,27	43,96	53,97
Tanzânia	48,43	55,50	58,07	71,89

NDT – nutrientes digestíveis totais.

O uso de enzimas fibrolíticas é uma das formas de se melhorar o aproveitamento de resíduos de baixa qualidade nutricional como o bagaço de cana, palha de trigo e de arroz e também o de forragens tropicais. O tratamento enzimático desses alimentos favorece a liberação dos açúcares fermentecíveis e conseqüentemente pode haver um aumento nos microrganismos ruminais e melhora no processo de digestão por disponibilizar mais energia metabolizável.

Nestes experimentos, nenhum dos alimentos passou por qualquer tipo de pré-tratamento (químico ou físico). Os pré-tratamentos químicos são muito utilizados para separar a lignina da celulose e hemicelulose, reduzir a cristalinidade da celulose e aumentar a porosidade do material lignoceluloso, favorecendo a hidrólise enzimática (KUO; LEE, 2009), no entanto, quando se trata da utilização para alimentos que serão destinados à alimentação animal, este torna-se inviável, pois os compostos químicos utilizados a base de peróxido de hidrogênio (CHEN et al., 2008), ácido sulfúrico (KUMAR, 2009), ácido fosfórico (JEIHANIPOUR; TAHERZADEH,

2009), amônia e hidróxido de sódio (DEAN et al., 2008), geram resíduos tóxicos que podem prejudicar a saúde dos animais.

A complexidade da parede celular é responsável pela inacessibilidade parcial ao ataque de enzimas hidrolíticas aos componentes da parede limitando o grau de fermentação ruminal, além disso, grande parte dos resíduos lignocelulósicos disponíveis para uso na alimentação de ruminantes apresenta baixo conteúdo de proteínas. Considerando a existência de ligações cruzadas intermoleculares, a digestão dos polissacarídeos da parede celular requer tanto enzimas hidrolíticas quanto enzimas capazes de clivar as pontes dentro dessa matriz com ligações cruzadas (RODRIGUES et al., 2008).

Por este motivo, a utilização de um tratamento que permita aumentar a sua digestibilidade e valor nutritivo é de fundamental importância. Em um estudo realizado por Eun, Beauchemin e Schulze (2007) foram pesquisados produtos com enzimas fibrolíticas exógenas que pudessem ser promissores e as doses necessárias para aumentar a digestibilidade do feno de alfafa e da silagem de milho, além de avaliar a relação entre a atividade enzimática e as respostas da fermentação. Os autores observaram que dos cinco produtos avaliados dois aumentaram substancialmente a degradabilidade das fibras do feno de alfafa e da silagem de milho e concluíram que existe uma correlação ideal entre a atividade das celulasas junto a xilanase para se conseguir bons resultados. A dose ótima para este produto foi de 1,4mg/g de MS, para ambas as forragens, com aumento da digestibilidade do FDN de até 20,6% para alfafa e 60,3% para a silagem.

É importante salientar que melhorias na degradabilidade da FDN permitem o aumento na ingestão voluntária de alimento por reduzir as partículas no rúmen. O aumento da degradabilidade da FDN também aumenta a densidade energética das dietas e estimula a produção do nitrogênio microbiano (OBA; ALLEN, 1999).

Martins e colaboradores (2006) avaliaram o efeito da suplementação com enzimas fibrolíticas (celulase e xilanase – Fibrozyme) sobre a eficiência de síntese microbiana e a atividade enzimática da  $\beta$ -1,4-endoglucanase (celulase) em animais consumindo dietas contendo silagem de milho e feno de tifton 85 (*Cynodon* spp.). Os resultados mostraram que não houve efeito sobre os parâmetros ruminais avaliados, exceto sobre a atividade da  $\beta$ -1,4-endoglucanase, que aumentou com a adição destas enzimas ao feno.

Segundo Morgavi, Beauchemin e Nsereko (2000), as preparações de complexos enzimáticos comerciais são normalmente padronizadas de acordo com sua capacidade em

degradar celulose ou xilana. Entretanto, estes produtos constituem compostos multienzimáticos que desempenham diferentes atividades fibrolíticas. Portanto, não há controle de qualidade sobre as outras enzimas, consideradas complemento, que poderiam alterar o desempenho de um complexo enzimático.

A especificidade da enzima e o alimento representam um dilema para a formulação de produtos enzimáticos para alimentação de ruminantes (BEAUCHEMIN et al., 2003), pois a grande maioria das dietas comerciais possuem vários tipos de forragem e concentrado.

Os efeitos da suplementação de feno de capim, feno de alfafa e palha de cevada com enzimas fibrolíticas exógenas, foram geralmente maiores após 5 h de fermentação ruminal, sendo esses efeitos diminuídos após 10 e 24h. O pH, N-NH<sub>3</sub>, DMD, aNDFD, ADFD de todas as forragens que foram medidos somente após 24 h não foram afetados pelo tratamento enzimático, enquanto que a produção de ácidos graxos totais foi aumentada após 5 h de fermentação do feno de capim (RANILLA et al., 2008).

Beauchemin e colaboradores (2003) apresentaram dados onde 26 produtos enzimáticos foram testados quanto a sua habilidade em influenciar a degradação da matéria seca de feno de alfafa e silagem de milho em 18 h de incubação (digestibilidade *in vitro*). Apenas um dos produtos foi efetivo para ambas as forrageiras. Os autores concluíram por meio destes resultados, a importância de combinar o produto enzimático com o tipo de forragem.

A especificidade da enzima e o alimento representam um dilema para a formulação de produtos enzimáticos para alimentação de ruminantes (BEAUCHEMIN et al., 2003), pois a grande maioria das dietas comerciais possuem vários tipos de forragem e concentrado.

Os resultados encontrados nesse trabalho permitem inferir que a fermentação em estado sólido utilizando substratos economicamente viáveis, aliada a otimização do tempo para a produção de enzimas, podem ser de muita importância no que concerne o aumento da produção bovina, via incremento do ganho de peso ou da produção leiteira, pelo aumento da digestibilidade de forragens tropicais.

## 5.8. AVALIAÇÃO QUÍMICO BROMATOLÓGICA DO MATERIAL FERMENTADO COMO POTENCIAL PARA SER USADO COMO INGREDIENTE EM DIETAS DE RUMINANTES

A bromatologia estuda a composição química dos alimentos com foco no seu valor alimentício e calórico, suas propriedades físicas, químicas, toxicológicas e também adulterantes, como os contaminantes. É uma área importante no controle de qualidade, no processamento e no armazenamento dos alimentos processados. Conhecer a real composição química dos alimentos é uma tarefa bastante utilizada por muitas empresas de nutrição animal durante a formulação de uma dieta, para que todos os nutrientes sejam corretamente balanceados.

Nesse trabalho, a análise bromatológica foi realizada no material fermentado, proveniente do cultivo de um fungo em um resíduo lignocelulósico, para avaliar o potencial uso desse material como suplemento alimentar.

Alguns trabalhos relatam a importância do tratamento biológico de resíduos e subprodutos agroindustriais, principalmente pela utilização de basidiomicetos. Esse tratamento tem por finalidade alterar a parede celular, química e estruturalmente, permitindo que haja maior ação das enzimas produzidas pela microbiota ruminal. Estudos recentes indicam que o pré-tratamento biológico pode melhorar a hidrólise enzimática da lignocelulose além de ter vantagens como o baixo consumo de energia (YU et al, 2009). Os basidiomicetos, especialmente os fungos da decomposição branca, que podem degradar eficientemente a lignina são frequentemente usados no pré-tratamento biológico da lignocelulose, com algumas variações na taxa relativa de degradação dos carboidratos e da lignina (HATAKKA, 2001). Essas modificações são refletidas nas propriedades bromatológicas do material fermentado.

A tabela 18 apresenta os dados da composição bromatológica do resíduo não tratado e do resíduo fermentado com o fungo *C. byrsina* por 21 dias. Após o processo fermentativo pode-se constatar mudanças na composição química do material fermentado em relação à composição original. Houve consumo na matéria graxa (porcentagem que se refere ao extrato etéreo), e na FDN potencialmente digestível do resíduo lignocelulósico, além de uma pequena redução na matéria seca. A hemicelulose foi o componente da parede celular que mais reduziu, enquanto a celulose permaneceu praticamente inalterada.

Como o material avaliado foi retirado com 21 dias de fermentação (período de maior produção de enzimas), é provável que o tempo não tenha sido suficiente para ocorrer uma

despolimerização ou hidrólise consistente na composição da fibra, principalmente na fração da celulose, uma vez que o crescimento dos fungos basidiomicetos é muito lento. É importante salientar que o fungo secreta enzimas para o meio com o intuito de despolimerizar a fibra e utilizar o produto como fonte de energia.

Yu e colaboradores (2009), ao avaliarem o pretratamento biológico de madeiras duras e macias por 120 dias usando o fungo *Echinodontium taxodii*, verificaram que houve perda de lignina em todos os materiais tratados após 30 dias, indicando que esse fungo teve boa capacidade de deslignificação, sem maiores perdas na porcentagem de celulose. Outros trabalhos publicados até o momento que avaliaram o tratamento biológico utilizaram tempos de cultivo de 30 dias ou superiores a isso (JONATHAN et al, 2008), havendo maior degradação das frações da parede celular.

É possível inferir que o tratamento de resíduos ou forragens de baixa qualidade com os fungos é uma alternativa interessante e que pode vir a ser usado como ingrediente alimentar nas dietas.

Tabela 18. Avaliação da composição química do resíduo de cervejaria submetido ao tratamento biológico (processo fermentativo) com o fungo *C. byrsina* por 14 dias. Os resultados foram expressos em % da matéria original (55 °C).

Análises	Resíduo sem o inóculo com o fungo	Resíduo fermentado com o fungo <i>C. byrsina</i>
<b>Matéria seca</b>	94,61	93,73
<b>Extrato Etéreo</b>	6,30	2,24
<b>Matéria Mineral</b>	4,33	2,86
<b>Nitrogênio Total</b>	2,71	4,18
<b>FDN</b>	63,19	59,76
<b>FDA</b>	25,09	29,77
<b>Celulose</b>	19,00	18,78
<b>Hemicelulose</b>	38,10	30,00
<b>Lignina</b>	5,39	10,96

FDN – fibra em detergente neutro; FDA – fibra em detergente ácido

## 6. CONCLUSÕES

- O presente trabalho mostrou que a produção de enzimas por fermentação em estado sólido utilizando resíduos ou subprodutos agrícolas e agroindustriais foi muito boa com alta produção de lacase;
- Os fungos do filo Basidiomycota que foram isolados em projetos anteriores e que pertencem à coleção de cultura do Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada Ibilce/UNESP, apresentaram excelente potencial de produção de muitas enzimas, principalmente as do complexo ligninolítico e merecem uma atenção especial em estudos futuros;
- As enzimas estudadas nesse trabalho apresentaram características interessantes para muitas aplicações industriais. Foi possível avaliar nesse trabalho o efeito sinérgico entre as enzimas, uma vez que o experimento de hidrólise de biomassa vegetal foi realizado com soluções enzimáticas brutas que continham diferentes enzimas, com diferentes quantidades;
- A dose enzimática ideal para aumentar a digestibilidade de materiais vegetais e melhorar a hidrólise dos polissacarídeos ainda não pode ser determinada. Pode-se perceber que quanto maior foi a dose melhor foi a resposta, contudo, quanto mais enzimas utilizarmos no processo, mais caro ele se torna, além dos processos de repressão catabólica exibido por algumas hidrolases.

## 7. CONSIDERAÇÃO FINAL

As propostas para projetos futuros são a ampliação da produção de enzimas em escala industrial utilizando bioreatores para fermentação em estado sólido e a formulação de uma dieta que tenha como ingrediente enzimas que irão atuar nas fibras vegetais e melhorar o desempenho dos animais a campo.

## 8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAHÃO, M. C. **Atividade Ligninolítica de Fungos Basidiomicetos Poliporóides isolados de Resquícios de Matas do Perímetro Urbano de São José do Rio Preto – SP.** 2007. Monografia (Bacharel em Ciências Biológicas), Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto.
- AGOSTINELLI, E., CERVONI, L., A. GIARTOSIO, A. & MORPURGO, L. Stability of Japanese-lacquer-tree (*Rhus vernicifera*) laccase to thermal and chemical denaturation: comparison with ascorbate oxidase. **Biochemical Journal**, v. 306, P. 697 - 702. 1995.
- AITKEN, M.D., IRVINE, R.L. Characterization of reactions catalysed by manganese peroxidase from *Phanerochaete chrysosporum*. **Archives Biochemistry Biophysics**, v. 276, p. 405-414, 1990.
- ARO, N.; PAKULA, T.; PENTTILA, M. Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 29, p. 719–739, 2005.
- AVELLANEDA, J. H.; PINOS-RODRÍGUEZ, J. M.; GONZÁLEZ, S. S.; BÁRCENA, R.; HERNÁNDEZ, A.; COBOS, M.; HERNÁNDEZ, D.; MONTAÑEZ, O. Effects os exogenous fibrolytic enzymes on ruminal fermentation and digestion of Guinea grass hay. **Animal Feed Science and Technology** (2008) doi: 10.1016/j.anifeedsci.2008.05.003
- BADHAN, A. K.; CHADHA, B. S.; KAUR, J.; SAINI, H. S.; BHAT, M. K. Production of multiple xylanolytic and cellulolytic enzymes by thermophilic fungus *Myceliophthora* sp. IMI 387099. **Bioreource Technology**, v. 98, n 3, p. 504-510, 2007.
- BAE, H.-J.; KIM, H. J.; KIM, Y. S. Production of a recombinant xylanase in plants and its potential for pulp biobleaching applications. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 3513 - 3519, 2008.
- BAKSHI, D. K.; GUPTA, K. G.; SHARMA, P. Enhanced biodecolorization of synthetic textile dye effluent by *Phanerochaete chrysosporium* under improved culture conditions. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 15, p. 507-509. 1999.
- BALAN, D. S. L. **Biodegradação e toxicidade de efluentes têxteis: corante indigo.** 1998. 130f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 1998.
- BALDRIAN, P. Fungal laccases – occurrence and properties. **FEMS Microbial Review**, v. 30, p. 215-242, 2006.
- BEAUCHEMIN, K. A.; RODE, L. M. The potential use of feed enzymes for ruminants. In: CORNELL NUTRITION CONFERENCE FOR FEED MANUFACTURERS, 58., 1996. Proceedings... Ithaca: Cornell University, p. 131 – 141, 1996.
- BEAUCHEMIN, K.A., COLOMBATTO, D., MORGAVI, D.P., YANG, W.Z. Use of exogenous fibrolytic enzymes to improve feed utilization by ruminants. **Journal of Animal Science**, v. 81(E.Suppl.2), p. E37-E47, 2003.
- BERCHIELLI, T. T.; PIRES, A. V.; OLIVEIRA, S. G. **Nutrição de Ruminantes.** 1 ed. Jaboticabal: Funep, 538 p, 2006.
- BIDLACK, J.; MALONE, M.; BENSON, R. Molecular structure and component integration of secondary cell walls in plants. **Proc. Okla. Acad. Sci.**, v. 72, p. 51-56, 1992.

- BLANCHETTE, R. A. Degradation of the lignocellulose complex in wood. **Canadian Journal of Botany**, v. 73, p. 999-1010, 1995.
- BON, E. P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L.; VERMELHO, A. B.; PAIVA, C. L. A.; ALENCASTRO, R. B.; COELHO, R. R. R. C. **Enzimas em Biotecnologia – Produção, Aplicações e Mercado**. Rio de Janeiro: Interciência, 2008.
- BONONI, V. L. R. Biodegradação de organoclorados no solo por basidiomicetos lignocelulolíticos. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (ed.). **Microbiologia Ambiental**, Jaguariúna: Embrapa - CNPMA, 1997, p. 243 –267.
- BOOMINATHAN, K.; REDDY, A. Fungal degradation of lignin: biotechnological applications. In: ARORA, D. K.; ELANDER, R. P.; MUKERJI, K. G. (ed.). **Handbook of applied mycology**. New York: Marcel Dekker, v.4, p.763 – 822, 1992.
- BOURBONNAIS, R., PAICE, M.G. Veratryl alcohol oxidases from the lignin-degrading basidiomycete *Pleurotus sajor-caju*. **Biochemistry Journal**, v.255, p.445-450, 1988.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.
- BRANCHI, B.; GALLI, C.; GENTILI, P. Kinetics of oxidation of benzyl alcohols by the dication radical cation ABTS. Comparison with laccase-ABTS oxidations: an apparent paradox. **Organic and Biomolecular Chemistry**, v. 3, p. 2604-2614, 2005.
- BURANOV, U.; MAZZA, G. Review: Lignin in straw of herbaceous crops. **Industrial crops and products**, v.28, p. 237–259, 2008.
- BUSWELL, J.K., CAI, Y.J., CHANG, S.T. Effect of nutrient nitrogen on manganese peroxidase and laccase production by *Lentinula (Lentinus) edodes*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 128, p. 81-88, 1995.
- CABRAL, L.S.; ZERVOUDAKIS, J.T.; COPPEDÊ, C.M.; SOUZA, A.L.; CARAMORI JÚNIOR, J.G.; POLIZEL NETO, A.; OLIVEIRA, I.S. Suplementação de bovinos de corte mantidos em pastagem de *Panicum maximum* cv. Tanzânia-1 no período das águas. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.9, p.293-302, 2008.
- CAMERON, M. D.; TIMOFEEVSKI, S.; AUST, S. D. Enzymology of *Phanerochaete chrysosporium* with respect to the degradation of recalcitrant compounds and xenobiotics. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 54, p. 751-758, 2000.
- CANNEL, E.; MOO-YONG, M. Solid-state fermentation systems. **Process Biochemistry**, v. 15, p. 24-8, 1980.
- CAPELARI, M.; ZADRAZIL, F. Lignin degradation and in vitro digestibility of wheat straw treated with Brazilian tropical species of white rot fungi. **Folia Microbiologica**, v. 42, p. 481 – 482, 1997.
- CARVALHO, C. C. **Produção de Ligninases por Basidiomicetos Através de Fermentação em Estado Sólido, Caracterização e Aplicação das Enzimas**. 2005. 112 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas – Microbiologia Aplicada) – Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2005.

- CASTRO, A. M. Produção, propriedades e aplicação de celulasas na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, v. 33, nº 1, p. 181-188, 2010.
- CHAHAL, D. S. Growth characteristics in solid state fermentation for upgrading of protein values of lignocelluloses e cellulases production. **Am. Chem. Soc. Symp. Ser.**, v. 207, p. 421- 442, 1987.
- CHANDRA R P, BURA R, MABEE W, PAN X, BERLIN A, SADDLER J N Substrate pretreatment: the key to effective enzymatic hydrolysis of lignocellulosics? **Adv Biochem Eng/Biotechnol**, v. 108, p. 67 – 93, 2007.
- CHÁVEZ, R., BULL, P., EYZAGUIRRE, J. The xylanolytic enzyme system from the genus *Penicillium*. **Journal of Biotechnology**, v.123, p. 413–433, 2006.
- CHEN, X.L.; WANG, J.K.; WU, Y.M.; LIU, J.X. Effects of chemical treatments of rice straw on rumen fermentation characteristics, fibrolytic enzyme activities and populations of liquid and solid-associated ruminal microbes in vitro. **Animal Feed and Science Technology**, v.141, p.1-14, 2008.
- CLAUS, H. Laccases and their occurrence in prokaryotes. **Archives of Microbiology**, v. 179, p. 145-150, 2003.
- COLOMBATTO, D., MORGAVI, D.P., FURTADO, A.F., BEAUCHEMIN, K.A. Screening of exogenous enzymes for ruminant diets: Relationship between biochemical characteristics and in vitro ruminal degradation. **Journal of Animal Science**, v.81, p. 2628 - 2638, 2003(a).
- COLOMBATTO, D., MOULD, F.L., BHAT, M.K., OWEN, E. Use of fibrolytic to improve the nutritive value of ruminant diets. A biochemical and in vitro rumen degradation assessment. **Animal Feed Science and Technology**, v.107, p.201-209, 2003(b).
- COLOMBATTO, D., MOULD, F.L., BHAT, M.K., PHIPPS, R.H., OWEN, E. In vitro evaluation of fibrolytic enzymes as additives for maize (*Zea mays* L.) silage I. Effects of ensiling temperature, enzyme source and addition level. **Animal Feed Science and Technology**, v.111, p.111-128, 2004(a).
- COLOMBATTO, D., MOULD, F.L., BHAT, M.K., PHIPPS, R.H., OWEN, E. In vitro evaluation of fibrolytic enzymes as additives for maize (*Zea mays* L.) silage II. Effects on rate of acidification, fibre degradation during ensiling and rumen fermentation. **Animal Feed Science and Technology**, v. 111, p.129-143, 2004(b).
- COLOMBATTO, D., MOULD, F.L., BHAT, M.K., PHIPPS, R.H., OWEN, E. In vitro evaluation of fibrolytic enzymes as additives for maize (*Zea mays* L.) silage III. Comparison of enzymes derived from psychrophilic, mesophilic or thermophilic sources. **Animal Feed Science and Technology**, v. 111, p.145-159, 2004(c).
- COLOMBATTO, D.; BEAUCHEMIN, K.A. A proposed methodology to standardize the determination of enzymic activities present in enzyme additives used in ruminants diets. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 83, n. 3, p. 559 - 568, 2003.
- CONAB. Levantamento da safra 2009/2010. Disponível em [www.conab.gov.br](http://www.conab.gov.br) <acesso em abril de 2010>
- CONESSA, A.; PUNT, P. J.; van den HONDEL, C. A. M. J. J. Fungal peroxidases: molecular aspects and applications. **J. Biotechnol.**, v. 93, p. 143 - 158, 2002.

- DE JONG, E.; DE VRIES, F. P.; FIELD, J. A.; VAN DER ZWAN, R. P.; DE BONT, J. A. M. Isolation and screening of basidiomycetes with high peroxidative activity. **Mycology Research**, v. 96, n. 12, p. 1098 – 1103, 1992.
- DEAN, D. B.; ADESOGAN, A. T.; KRUEGER, N. A.; LITTELL, R. C. Effects of treatment with ammonia or fibrolytic enzymes on chemical composition and ruminal degradability of hays produced from tropical grasses. **Animal Feed Science and Technology**, v. 145, p. 68 – 83, 2008.
- DURÁN, N.; ESPOSITO, E. Biodegradação de lignina e tratamento de efluentes por fungos ligninolíticos. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (eds.). **Microbiologia ambiental**. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, 1997. Documentos, v. 11, p. 269 - 292.
- DURÁN, N.; ESPOSITO, E. Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidase-like compounds in wastewater and soil treatment: a review. **Applied Catalysis B: Environment**, v. 28, p. 83- 90, 2000.
- ELISASHVILI, V.; KACHLISHVILI, E.; PENNINCKX, M. Effect of growth, method of fermentation, and nitrogen source on lignocellulose-degrading enzymes production by White-rot basidiomycetes. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.**, v. 35, p. 1531 – 1538, 2008.
- ELISASHVILI, V.; PENNINCKX, M.; KACHLISHVILI, E.; TSIKLARI, N.; METREVELI, E.; KHARZIANI, T.; KVESITADZE, G. *Lentinus edodes* and *Pleurotus* species lignocellulolytic enzymes activity in submerged and solid state fermentation of lignocellulosic wastes of different composition. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 457-462, 2008.
- EL-NASSER, N. H. A., HELMY, S. M. & EL-GAMMAL, A. A. Formation of enzymes by biodegradation of agricultural wastes with rot fungi. **Polymer Degradation and Stability**, v. 55, p. 249 - 253, 1997.
- ELWAKEEL, E. A.; TITGEMEYER, E. C.; JOHNSON, B. J.; ARMENDARIZ, C. K.; SHIRLEY, J. E. Fibrolytic enzymes to increase the nutritive value of dairy feedstuffs. **Journal of Dairy Science**, v. 90, n. 11, p. 5226 - 5236, 2007.
- ERIKSSON K. E. L.; BLANCHETTE R. A.; ANDER P. **Microbial and Enzymatic Degradation of Wood and Wood Components**. Berlin, Springer-Verlag. ISBN 038751600X, 1990.
- ESPOSITO, E.; CANHOS, V. P.; DURÁN, N. Screening of lignin degrading fungi for removal of color from kraft mill wastewater with no additional extra carbon-source. **Biotechnology Letters**, v. 13, p. 571 - 576. 1991.
- ESPOSITO, E; AZEVEDO, J. L. (org.) **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. Caxias do Sul: Educs, 2004, 510 p.
- EUN, J. S.; BEAUCHEMIN, K. A.; SCHULZE, H. Use of exogenous fibrolytic enzymes to enhance in vitro fermentation of alfalfa hay and corn silage. **Journal Dairy Science**, v. 90, p. 1440 – 1451, 2007.
- EUN, J.S., BEAUCHEMIN, K.A., HONG, S.H., BAUER, M.W. Exogenous enzymes added to untreated or ammoniated rice straw: Effects on in vitro fermentation characteristics and degradability. **Animal Feed Science and Technology**, v. 131, n. 1-2, p. 86 - 101, 2006.
- EVANS, C. S.; DUTTON, M. V.; GUILLÉN, F.; VENESS, R. G. Enzymes and small molecular agents involved with lignocelluloses degradation. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 13, p. 235 - 240, 1994.

- FACCHINI, F. D. A. **Bioprospecção e produção de enzimas fibrolíticas por *Aspergillus japonicus* com potencial para aplicação em nutrição de ruminantes**. 2010. Dissertação (Mestrado em Bioquímica), Universidade de São Paulo.
- GAO, J.; WENG, H.; ZHU, D.; YUAN, M.; GUAN, F.; XI, Y. Production and characterization of cellulolytic enzymes from the thermoacidophilic fungal *Aspergillus terreus* M11 under solid-state cultivation of corn stover. **Bioresource Technology** (2008), doi: 10.1016/j.biortech.2008.02.005
- GHRIBI, D.; ZOUARI, N.; TRABELSI, H.; JAOUA, S. Improvement of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin production by overcome of carbon catabolite repression through adequate control of aeration. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, p. 614 – 622, 2007.
- GIANFREDA, L.; RAO, M. A. Potential of extra celular enzymes in remediation of polluted soils: a review. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 35, p. 339 - 354, 2004.
- GILBERTSON, R. L.; RYVARDEN, L. North American Polypores. **Synopsis Fungorum**, v. 1, p. 1 - 433. 1986.
- GILL, P. K.; ARORA, D. S. Effect of culture conditions on manganese peroxidase production and activity by some white-rot fungi. **Journal of Industrial Microbiology and Technology**, v. 30, p. 28 - 33, 2003.
- GIRALDO, L. A.; RANILLA, M. J.; TEJIDO, M. L.; CARRO, M. D. Effect of enzyme application method on in vitro rumen fermentation of tropical forages. **Journal Animal Feed Science**, v. 13, p.63 – 66, 2004.
- GIRALDO, L. A.; RANILLA, M. J.; TEJIDO, M. L.; CARRO, M. D. Influence of exogenous fibrolytic enzyme and fumarate on methane production, microbial growth and fermentation in *Rusitec fermenters*. **Br. J. Nutr.**, v. 98, p.753 – 761, 2007.
- GIRALDO, L. A.; TEJIDO, M. L.; RANILLA, M. J.; CARRO, M. D. Effects of exogenous fibrolytic enzymes on in vitro ruminal fermentation of substrates with different forage: concentrate ratios. **Animal Feed Scienc Technology** , v. 141, p.306 – 325, 2008.
- GLENN, J.K., AKILESWAREAN, L., GOLD, M.H. Mn(II) oxidation is the principle function of the extracellular Mn-peroxidase from *Phanerochaetes chrysosporium*. **Archives Biochemistry Biophysics**, v. 251, p. 688 - 696, 1986.
- GÓMEZ, J.; PAZOS, M.; RODRIGUEZ-COUTO, S.; SANROMÁN, M. A. Chestnut shell and barley bran as potential substrates for laccase production by *Corilopsis rigida* under solid-state conditions. **Journal of Food Engineering**, v. 68, p. 315 – 319, 2005.
- GONÇALVES, A. Z. L. **Produção de  $\alpha$ -amilase e glicoamilase termoestável pelo fungo termofílico *Thermomyces lanuginosus* TO-03 por fermentação submersa e em estado sólido e caracterização das enzimas**. 2006. 89 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas – Microbiologia Aplicada) – Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2006.
- GORBATOVA, O. N.; KOROLEVA, O. V.; LANDESMAN, E. O.; STEPANOVA, E. V.; ZHERDEV, A. V. Increase of detoxification potential of basidiomycetes by induction of laccase biosynthesis. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 42, n. 4, p. 414 - 419, 2006.

- GRABBER, J. H. How do lignin composition, structure, and cross-linking affect degradability? A review of cell wall model studies. **Crop Science**, vol. 45, p. 820 – 831, 2005.
- GRAMINHA, E. B. N.; GONÇALVES, A. Z. L.; PIROTA, R. D. P. B.; BALSALOBRE, M. A. A.; Da SILVA, R.; GOMES, E. Enzyme production by solid state fermentation: Application to animal nutrition. **Animal Feed Scienc Technology**, v. 144, n 1-2, p. 1 – 22, 2008.
- GUGLIOTTA, A. M. **Utilização de basidiomicetos nativos na remoção de corantes em efluentes da indústria têxtil**. 2001. 115f. Tese (Doutorado em Botânica) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.
- GUTIERREZ-ROJAS, M., FAVELA-TORRES, E. – Curso de fermentaciones en medio solido. **Biotechnologia para el aprovechamineto de residuos agroindustriales y municipales**. Jaguariuna, Ed EMBRAPA, 80 p, 1992.
- HAMMEL, K. E. Organopollutant degradation by ligninolytic fungi. In: YOUNG, L. Y.; CERNIGLIA, C. E. (eds.). **Microbial transformation and degradation of toxic organic chemicals**. New York: Wiley-Liss, 1995. p. 331 - 346.
- HAMMEL, K.E.; CULLEN, D. Role of fungal peroxidases in biological ligninolysis. **Current Opinion Plant Biology**, v.11, p. 349 – 355, 2008.
- HARPER, H.A.; RODWELL, V.W.; MAYES, P. A. 1982. **Manual de Química Fisiológica**. 5 ed. 736 p.
- HATAKKA, A. Biodegradation of lignin. In: Hofrichter M., Steinbüchel A., editors. **Lignin, humic substances and coal**. Wwinheim, Germany: Wiley-VHC; 2001, p. 129 – 179.
- HATAKKA, A. Lignin – modifying enzyme from selected white – rot fungi: production and role in lignin degradation. **FEMS Microbiology Review**. .v. 13, p. 125 – 135, 1994.
- HATFIELD, G.M. Structural polysaccharides in forages and their degradability. **Agronomy Journal**, Madison, v. 81, p. 39 - 46, 1989.
- HENDRIKS, A.T.W.M.; ZEEMAN, G. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 10 - 18, 2009.
- HENN, C. **Seleção de linhagens de basidiomicetos resistentes aos herbicidas atrazina e diurom – produção de enzimas ligninolíticas e degradação dos compostos**. 2009. 136 f. Dissertação (Mestrado em Microbioogia) – Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2009.
- HEO, S. E., KWAK, J. Y., OH, H. W., PARK, D. S., BAE, K. S., SHIN, D. H., AND PARK, H.Y.:Characterization of an extracellular xylanase in Paenibacillus sp. HY-8 isolated form an herbivorous longicorn beetle, **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 16, p. 1753 – 1759, 2006.
- HESSELTINE, C. W. Solid state fermentations. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 14, p. 517 - 532, 1972.
- HIGUCHI, T. Microbial degradation of lignin: role of lignin peroxidase, manganese peroxidase and laccase. **Proceedings of Japanese Academy**, v. 80, p. 204 - 214, 2004.

- HOFRICHTER, M. Review: lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). **Enzyme Microbiol Technology**, v. 30, p. 454 – 466, 2002.
- HÖLKER, U.; LENZ, J. Solid-state fermentation- are there any biotechnological advantages? **Current Opinion in Microbiology**, v. 8, p. 301- 306, 2005.
- HRISTOV, A. N.; McALLISTER, T. A.; CHENG, K. J.; (a) Stability of exogenous polysaccharide-degrading enzymes in the rumen. **Animal Feed Science Technology**, v. 76, p. 161 – 168, 1998 (a).
- HRISTOV, A. N.; McALLISTER, T. A.; CHENG, K. J.; (b) Effect of dietary or abomasal supplementation of exogenous polysaccharide-degrading enzymes on rumen fermentation and nutrient digestibility. **Journal Animal Science**, v. 76, p. 3146 – 3156, 1998 (b).
- IBGE. Pesquisa pecuária municipal. Disponível em: <http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/listabl.asp>, acesso em fevereiro de 2010.
- IEFUJI, H., CHINO, M., KATO, M.; IIMURA, Y.: Acid xylanase from yeast *Cryptococcus* sp. S-2: purification, characterization, cloning, and sequencing, **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v. 60, p. 1331 – 1338, 1996.
- JALILVAND G.; ODONGO, N. E.; LÓPEZ, S.; NASERIAN, A.; VALIZADEH, R.; EFTEKHAR SHAHRODI, F.; KEBREAB, E.; FRANCE, J. Effects of different levels of an enzyme mixture on *in vitro* gas production parameters of contrasting forages. **Animal Feed Science and Technology**, v. 146, p. 289 – 301, 2008.
- JEIHANIPOUR, A.; TAHERZADEH, M.J. Ethanol production from cotton-based waste textiles. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 1007 - 1010, 2009.
- JONATHAN, S. G.; FASIDI, I. O.; AJAYI, A. O.; ADEGEYE O. Biodegradation of Nigerian wood wastes by *Pleurotus tuber-regium* (Fries) Singer. **BioresourceTechnology**, v. 99, p. 807 – 811, 2008.
- JUNG, H. G.; DEETZ, D. A. Cell wall lignification and degradability. In: H. G. JUNG, D. R. BUXTON, R. D. HATFIELD, and J. RALPH (Ed.) **Forage Cell Wall Structure and Digestibility**. P. 315 ASA-CSSA-SSSA, Madison, WI. 1993.
- JUNG, H. G.; MERTENS, D. R.; PAYNE, A. J. Correlation of acid detergent and Klason lignin in forages with *in vitro* and *in vivo* dry matter and neutral detergent fiber digestibility. **Journal of Dairy Science**, vol. 76 (1), p. 248, 1993.
- JUNG, H.G. Forage lignins and their effects on fiber digestibility. **Agron J**, v. 81, p. 33 - 38, 1989.
- KANG, S.W.; PARK, Y.S.; LEE, J.S.; HONG, S.I.; KIM, S.W. Production of cellulases and hemicellulases by *Aspergillus niger* KK2 from lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 91, p. 153 – 156, 2004.
- KANTELINEN, A. **Enzymes in bleaching of kraft pulp**. Espoo, Vt Publications, v. 114, p. 1 - 86. 1992.
- KARUNANANDAA, K., VARGA, G.A. Colonization of rice straw by white-rot fungi (*Cyathus stercoreus*): Effect on ruminal fermentation pattern, nitrogen metabolism, and fiber utilization during continuous culture. **Animal Feed Science and Technology**, v.61, p.1 - 16, 1996.

- KHANDEPARKAR, R. D. S.; BHOSLE, N. B. Isolation, purification and characterization of xylanase produced by *Arthrobacter* sp. MTCC 5214 when grown in solid state fermentation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 4, p. 732 - 742, 2006.
- KIMURA, T.; ITO, J.; KAWANO, A.; MAKINO, T.; KONDO, H.; KARITA, S.; SAKKA, K.; OHMIYA, K. Purification, characterization, and molecular cloning of acidophilic xylanase from *Penicillium* sp. 40, **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v. 64, p. 1230 – 1237, 2000.
- KIRK, P. M.; AINSWORTH; BISBY'S **Dictionary of the Fungi**. 10th ed. Wallingford: CAB International, 2008. 771p.
- KIRK, T. K. Lignin degradation: basic research, progress, and applications in soil remediation and biopulping. In: KENNEDY, J. R.; PHILLIPS, G. O.; WILLIAMS, P. A. (ed.). **Cellulosics: pulp, fibre and environmental aspects**. New York: Ellis Horwood, 1993, cap. 63, p.421 – 430.
- KIRK, T.K. & FARRELL, R.L. 'Enzymatic combustion': The microbial degradation of lignin. **Annual Review of Microbiology** , v. 41, p. 465 – 505, 1987.
- KREMER, S. M.; WOOD, P. M.: Evidence that cellobiose oxidase from *Phanerochaete chrysosporium* is primarily an Fe (III) reductase, **Eur. J. Biochem.**, v. 205, p. 133 – 138, 1992.
- KRISANA, A., RUTCHADAPORN, S., JARUPAN, G., LILY, E., SUTIPA, T., AND KANYAWIM, K.: Endo-1,4- $\beta$ -xylanase from *Aspergillus* sp. *niger* BCC14405 isolated in Thailand: purification, characterization and gene isolation, **J. Biochem. Mol. Biol.**, v. 38, p. 17 – 23, 2005.
- KRUEGER, N. A.; ADESOGAN, A. T. Effects of different mixtures of fibrolytic enzymes on digestion and fermentation of bahiagrass hay. **Animal Feed Science and Technology**, v. 145, p. 84 – 94, 2008.
- KRUEGER, N. A.; ADESOGAN, A. T.; STAPLES, C. R.; KRUEGER, W. K.; DEAN, D.B.; LITTELL, R. C. The potential to increase digestibility of tropical grasses with a fungal, ferulic acid esterase enzyme preparation. **Animal Feed Science and Technology**, v. 145, p. 95 – 108, 2008.
- KUMAR, A. A conceptual comparison of bioenergy options for using mountain pine beetle infested wood in Western Canada. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 387 - 399, 2009.
- KUO, C.H. e LEE, C.K.; Enhanced enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse by N-methylmorpholine-N-oxide pretreatment. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 866 - 871, 2009.
- LECHNER, B. E.; PAPINUTTI, V. L. Production of lignocellulosic enzymes during growth and fruiting of the edible fungus *Lentinus tigrinus* on wheat straw. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 594 - 598, 2006.
- LEE, C. C., WONG, D. W.; ROBERTSON, G. H.: Cloning and characterization of Xyn11A gene from *Lentinula edodes*, **Protein J.**, v. 24, p. 21 – 26, 2005.
- LEE, J. W.; GWAK, K. S.; PARK, J. Y.; PARK, M. J.; CHOI, D. H.; KWON, M.; CHOI, I. G. Biological pretreatment of softwood *Pinus densiflora* by three white rot fungi, **J. Microbiol.**, v. 45, n. 6, p. 485 – 491, 2007.
- LEE, J. W.; PARK, J. Y.; KWON, M.; CHOI, I. G. Purification and characterization of a thermostable xylanase from the brown-rot fungus *Laetiporus sulphureus*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 107, n. 1, p. 33 – 37, 2009.

- LEONOWICZ, A.; MATUSZEWSKA, A.; LUTEREK, J.; ZIEGENHAGEN, D.; WOJTAS-WASILEWSKA, M.; CHO, N. S.; HOFRICHTER, M.; ROGALSKI, J. Biodegradation of lignin by white rot fungi. **Fungal Genetics and Biology**, v. 27, p.115 - 185, 1999.
- LI, L.; ZHU, Y.; HUANG, Z.; JIANG, Z.; CHEN, W. Immobilization of the recombinant xylanase B (XynB) from the hyperthermophilic *Thermotoga maritima* on metal-chelate Eupergit C 250L. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 41, p. 278 – 285, 2007.
- LITTHAUER, D.; VAN VUUREN, M. J.; VAN TONDER, A.; WOLFAARDT, F. W. Purification and kinetics of a thermostable laccase from *Pycnoporus sanguineus* (SCC108). **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, p. 563 - 568, 2007.
- LONSANE, B. K., SAUCEDO-CASTANEDA, G., RAIMBAULT, M., ROUSSOS, S., VINIEGRA-GONZÁLEZ, G., GHILDYAL, N. P., RAMAKRISHNA, M., KRISHNAIAH, M. M. Scale-up strategies for solid state fermentation systems. **Process Biochemistry**, v.27, p. 259 - 273, 1992.
- MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. **Microbiologia de Brock**. 10. ed. São Paulo: Person Education, 2004.
- MAGALHÃES, P. O.; MILAGRES, A. M. F. Biochemical properties of a b-mannanase and a b-xylanase produced by *Ceriporiopsis subvermispora* during biopulping conditions. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 63, p. 191 – 195, 2009.
- MANDALARI, G.; BISIGNANO, G.; LO CURTO, R. B.; WALDRON, K. W.; FAULDS, C. B. Production of feruloyl esterases and xylanases by *Talaromyces stipitatus* and *Humicola grisea* var. *thermoidea* on industrial food processing by-products. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 5130 – 5133, 2008.
- MANSFIELD, S. D.; MOONEY, C.; SADDER, J. N. Substrate and enzyme characteristics that limit cellulose hydrolysis. **Biotechnol Progr**, v. 15, p. 804 – 816, 1999.
- MARTIN, N. **Isolamento de linhagens fúngicas termofílicas produtoras de pectinases termoestáveis: produção, caracterização e purificação parcial da poligalacturonase**. 2006. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas – Microbiologia Aplicada), Universidade Estadual Paulista Rio Claro.
- MARTINS, A. S.; VIEIRA, P. F.; BERCHIELLI, T. T.; PRADO, I. N.; GARCIA, J. A. S. Eficiência de síntese microbiana e atividade enzimática em bovinos submetidos à suplementação com enzimas fibrolíticas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, n. 3, p. 1194 – 1200, 2006.
- MARTINS, A. S.; VIEIRA, P. F.; BERCHIELLI, T. T.; PRADO, I. N.; LEMPP, B.; PAULA, M. C. Degradabilidade in situ e observações microscópicas de volumosos em bovinos suplementados com enzimas fibrolíticas exógenas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, n. 6, p. 1927 – 1936, 2007.
- MARTINS, E. S., SILVA, D., DA SILVA, R., GOMES, E. Solid state production of thermostable pectinases by thermophilic *Thermoascus aurantiacus*. **Process Biochemistry**, v. 37, p. 949 - 954, 2002.
- MARZ U. Relatório FOD020C, publicado em junho de 2009. Disponível em <http://www.bccresearch.com/report/FOD020C.html>
- MASTIHUBA, V., KREMNICŤ, L., MASTIHUBOVÁ, M., WILLETT, J.L., CÔTÉ, G.L. A spectrophotometric assay for feruloil esterases. **Anal. Biochem.** v. 309, p. 96 - 101, 2002.

- MATHEUS, D. R. **Biorremediação de solos contaminados com compostos organoclorados e biodegradação de hexaclorobenzeno por basidiomicetos brasileiros.** 1998. 161f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas - Microbiologia Aplicada) - Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 1998.
- MATHEUS, D. R. **Otimização da biodegradação de hexaclorobenzeno por fungos basidiomicetos em solos contaminados com resíduos industriais.** 2003. 129f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas, ênfase em Microbiologia Aplicada) - Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2003.
- MATHEUS, D. R.; BONONI, V. L. R.; MACHADO, K. M. G. Biodegradation of hexachlorobenzene by basidiomycetes in soils contaminated with industrial residues. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 16, p. 415-421. 2000.
- MATHEUS, D. R.; OKINO, L. K. Utilização de Basidiomicetos em processos biotecnológicos. In: BONONI, V.L.R. (org.) **Zigomicetos, Basidiomicetos e Deuteromicetos: noções básicas de taxonomia e aplicações biotecnológicas.** São Paulo: Instituto de Botânica, 1998. p. 106 - 139.
- MAURICIO, R. M.; MOULD, F. L.; DHANOA, M. S.; OWEN, E.; CHANNA, K. S.; THEODOROU M. K. A semi-automated in vitro gas production technique for ruminant feedstuff evaluation. **Animal Feed Science and Technology**, v. 79, p. 321-330, 1999.
- McDONALD, P.; HENDERSON, A.R.; HERONT, S.J.E. **The biochemistry of silage.** 2. ed. Marlow: Chalcome, 340 p, 1991.
- MCDUGALL, E. I. Studies on ruminant saliva 1. The composition and output of sheep saliva. **Journal of Biochemistry**, v. 43, p. 99, 1948.
- MENKE, K.H. e STEINGASS, H. Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and in vitro gas production using rumen fluid. **Anim Res Develop**, v. 28, p. 7 - 55, 1988.
- MESTER, T.; JONG, E.; FIELD, J. A. Manganese regulation of veratryl alcohol in white rot fungi and its indirect effect on lignin peroxidase. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n.5, p. 1881 - 1887, 1995.
- MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, p. 426 - 428, 1959.
- MITCHELL, D. A., VON MEIEN, O. F., LUZ JR, L. F. E., KRIEGER, N. Evaluation of productivity of zymotis solid-state bioreactor based on total reactor volume. **Food Technology and Biotechnology**, v. 40, p. 135 - 144, 2002.
- MORGAVI, D.P., BEAUCHEMIN, K.A., NSEREKO, V.L. Synergy between ruminal fibrolytic enzymes and enzymes from *Trichoderma longibrachiatum*. **Journal of Dairy Science**, v.83, p.1310 - 1321, 2000.
- MORGAVI, D.P., NEWBOLD, C.J., BEEVER, D.E., WALLACE, R.J. Stability and stabization of potential feed additive enzymes in rumen fluid. **Enzyme and Microbial Technology**, v.26, p.171 - 177, 2000.
- MOUGIN, C.; JOLIVALT, C.; BRIOZZO, P.; MADZAK, C. Fungal lacases: from structure-activity studies to environmental applications. **Environmental Chemistry Letters**, v.1, p. 145 - 148, 2003.

- NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger Princípios de Bioquímica** 4 ed. New York: Freeman and Company, 2006.
- NRC - NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient requeriments of dairy cattle**. 7.rev.ed. Washinton, D.C.: 2001.
- NSEREKO, V. L.; MORGAVI, D. P.; RODE, L. M.; BEAUCHEMIN, K. A.; MCALLISTER, T. A. Effects of fungal enzyme preparations on hydrolysis and subsequent degradation of alfalfa hay fiber by mixed rumen microorganisms *in vitro*. **Animal Feed Science and Technology**, v. 88, n. 3 - 4, p. 153 - 170, 2000.
- NSEREKO, V. L.; SMILEY, B. K.; RUTHERFORD, W. M.; SPIELBAUER, A.; FORRESTER, K. J.; HETTINGER, G. H.; HARMAN, E. K.; HARMAN, B. R. Influence of inoculating forage with lactic acid bacterial strains that produce ferulate esterase on ensilage and ruminal degradation of fiber **Animal Feed Science and Technology**, v. 145, p. 122 – 135, 2008.
- OBA, M., ALLEN, M.S. Evaluation of the importance of the digestibility of neutral detergent fiber from forage: effects on dry matter intake and milk yield of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 82, p. 589 - 596, 1999.
- OLIVEIRA, J. S.; ZANINE, A. M.; SANTOS, E. M. Diversidade microbiana no ecossistema ruminal REDVET. **Revista eletrônica de Veterinaria** v. 8, n° 6, p. 1695 – 7504, 2007.
- PANAGIOTOU, G., KEKOS, D., MACRIS, B.J., CHRISTAKOPOULOS, P. Production of cellulolytic and xylanolytic enzymes by *Fusarium oxysporum* grown on corn stover in solid state fermentation. **Industrial Crops and Products**, v.18, p. 37 - 45, 2003.
- PANAGIOTOU, G.; OLAVARRIA, R.; OLSSON, L. *Penicillium brasilianum* as na enzyme factory the essential role of feruloyl esterases for the hydrolysis of the plant cell wall. **Journal of Biotechnology**, v. 130, p. 219 – 228, 2007.
- PANDEY, A. Solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 3636, p. 1 - 4, 2002.
- PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; MITCHELL, D. New developments in solid state fermentation: I- bioprocesses and products. **Process Biochemistry**, v. 35, p. 1153 - 1169, 2000.
- PAPINUTTI, V. L.; FORCHIASSIN, F. Lignocellulolytic enzymes from *Fomes sclerodermeus* growing in solid state fermentation. **Journal of Food Engineering**, v. 81, p. 54 - 59, 2007.
- PEASE, E. A.; TIEN, M. Heterogeneity and Regulation of Manganese Peroxidases from *Phanerochaete chrysosporium* **Journal of Bacteriology**, , vol. 174, n°. 11, p. 3532 – 3540, 1992.
- PEIXOTO-NOGUEIRA, S.C.; SANDRIM, V.C.; GUIMARÃES, L.H.; JORGE, J.A.; TERENCEZI, H.F.; POLIZELI, M.L.T.M. Evidence of thermostable amylolytic activity from *Rhizopus microsporus* var. *rhizopodiformis* using wheat bran and corncob as alternative carbon source. **Bioprocess Biosys. Eng.**, v. 31, p. 329 - 340, 2008.
- PÉREZ, J.; MUÑOZ-DORADO, J.; de La RUBIA, T.; MARTÍNEZ, J. Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. **Introductory Microbiology**, v. 5, p. 53 - 63, 2002.

- POINTING, S. B. Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 57, p. 20 - 33, 2001.
- POLIZELI, M.L, RIZZATTI A.C, MONTI, R.; TERENCEI, H.F., JORGE, J.A, AMORIN, D.S. Review: Xylanases from fungi: properties and industrial applications. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 67, p. 577 - 591, 2005.
- RAJAGOPALAN, G.; KRISHNAN, C.  $\alpha$ -Amylase production from catabolite depressed *Bacillus subtilis* KCC103 utilizing sugarcane vavase hydrolysate. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 3044 – 3050, 2008.
- RANI, R.; KUMAR, A.; SOCCOL, C. R.; PANDEY, A. Recent advances in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 44, p. 13 – 18, 2009.
- RANILLA, M. J.; TEJIDO, M. L.; GIRALDO, L. A.; TRICARICO, J. M.; CARRO, M. D. Effects of an exogenous fibrolytic enzyme preparation on in vitro ruminal fermentation of three forages and their isolated cell walls. **Animal Feed Science and Technology**, v.145, p. 109 – 121, 2008.
- RAYNER, A. D. M. Fungi, a vital component of ecosystem function in woodland. In: ALLSOPP, D.; COLWELL, R. R.; HAWKSWORTH, D. L. (eds.). **Microbial Diversity and Ecosystem Function**. Cambridge: University Press, 1995. p. 231 - 251.
- REDDY, G.V.; RAVINDRA BABU, P.; KOMARAIHAH, P.; ROY, K.R.R.M.; KOTHARI, I.L. Utilization of banana waste for the production of lignolytic and cellulolytic enzymes by solid substrate fermentation using two *Pleurotus* species (*P. ostreatus* and *P. sajor-caju*). **Proc. Biochem.**, v. 38, p. 1457 - 1462, 2003.
- RIDIEL, K.; RITTER, J.; BRONNENMEIER, K. Synergistic interaction of the *Clostridium stercorarium* cellulases Avicelase I (Cel Z) and Avicelase II (Cel Y) in the degradation cellulose. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 147, p. 239 - 243, 1997.
- RITSCHKOFF, A. C.; BUCHERT, J.; VIKARI, L.: Purification and characterization of a thermophilic xylanase from the brown-rot fungus *Gloeophyllum trabeum*, **J. Biotechnol.**, v. 32, p. 67 – 74, 1994.
- RODRIGUES, M. A. M.; PINTO, P.; BEZERRA, R. M. F.; DIAS, A. A.; GUEDES, C. V. M.; CARDOSO, V. M. G.; CONE, J. W.; FERREIRA, L. M. M.; COLAÇO, J.; SEQUEIRA, C. A. Effect of enzyme extracts isolated from white-rot fungi on chemical composition and *in vitro* digestibility of wheat straw. **Animal Feed Science and Technology**, v. 141, p. 326 – 338, 2008.
- RODRIGUEZ COUTO, S., SANROMÁN, M. A. Application of solid-state fermentation to ligninolytic enzyme production. **Biochemical Engineering Journal**, v. 22, p. 211 - 219, 2005.
- RODRÍGUEZ, J.; DURÁN, N. Some new aspects of enzymatic lignin biodegradation. **Brazil. J. Med. Biol. Resear.**, v. 21, p. 411 - 422, 1988.
- RUBIN, E. M. Genomics of cellulosic biofuels. **Nature** vol. 454, nº14, p. 841 – 845, 2008.
- RYVARDEN, L. **Genera of Polypores. Nomenclature and Taxonomy**. Synopsis Fungorum, v. 5, p. 1 – 363, 1991.
- SAHA, B.C.; ZEIKUS, J. G. Microbial glucoamylases: biochemical and biotechnological features. **Starch/Starke**, v. 41, p. 57 - 64, 1989.

- SÁNCHEZ, C. Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. **Biotechnol. Adv.**, v. 27, p. 185 – 194, 2009.
- SANDGREN, M.; STÅHLBERG, J.; MITCHINSON, C. Structural and biochemical studies of GH family 12 cellulases: improved thermal stability, and ligand complexes. **Progres. Biophys. Mol. Biol.**, v. 89, p. 246 - 291, 2005.
- SANTOS, M.M.; ROSA, A.S.; DAL'BOIT, S.; MITCHELL, D.A.; KRIGER, N. Thermal denaturation: is solid-state fermentation really a good technology for the production of enzymes? **Bioresour. Technol.**, v. 93, p. 261 - 268, 2004.
- SENTHILKUMAR, S. R.; DEMPSEY, M.; KRISHNAN, C.; GUNASEKARAN, P. Optimization of biobleaching of paper pulp in an expanded bed bioreactor with immobilized alkali stable xylanase by using response surface methodology. **Bioresource Technology**, 2008.
- SHIN, H. D.; CHEN, R. R. Production and characterization of a type B feruloyl esterase from *Fusarium proliferatum* NRRL 26517. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 38, p. 478 - 485, 2006.
- SILVA, C. M. M. S.; MELO, I. S. M.; VIEIRA, R. F. Production of Phenol Oxidases and Peroxidases by fungi isolated from irrigated rice. **Brazilian journal of Microbiology**, v. 34, suplemento 1, p. 53 - 55, 2003.
- SILVA, D.; TOKUIOSHI, K.; MARTINS, E. S.; DA SILVA, R.; GOMES, E. Production of pectinase by solid-state fermentation with *Penicillium viridicatum* RFC3. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 2885–2889, 2005.
- SILVA, E. M.; MACHUCA, A.; MILAGRES, A. M. F. Evaluating the growth and enzymes production from *Lentinula edodes* strains. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 161-164, 2005.
- SILVA, R.; GOMES, E. Ligninases. In: SAID, S.; PIETRO, R. C. L. R. (Org.). **Enzimas como agentes biotecnológicos**. Ribeirão Preto: Legis Summa, 2004. 412 p., cap. 19, p. 349 – 379.
- SILVA, R.; HARAGUCHI, S. K.; MUNIZ, E. C.; RUBIRA, E. A. F. Aplicações de fibras lignocelulósicas na química de polímeros e em compósitos. **Química Nova**, v. 32, n° 3, p. 661 - 671, 2009.
- SINGH, S.; MADLALA A. M.; PRIOR B. A. *Thermomyces lanuginosus*: properties of strains and their hemicellulases. **FEMS Microbiology**, v. 27, p. 3 - 16, 2002.
- SOMOGY, N., 1952. Notes on sugar determination. **J. Biol. Chem.**, 195, 1952.
- SOUZA, O. Aproveitamento de resíduos e subprodutos agropecuários pelos ruminantes. **Rural Soft** (Embrapa Tabuleiros Costeiros. Artigo de Divulgação na Mídia), v. 20, 2008.
- STOLP, H. **Microbial ecology: organisms, habitats, activities**. Cambridge: Cambridge University Press, 1988. 280p.
- SUNNA, A., ANTRANIKIAN, G. Xylanolytic enzymes from fungi and bacteria. **Critical Rev. Biotechnol.**, v. 17, p. 39 - 67, 1997.
- SUTO, M.; TOMITA, F. Induction and Catabolite Repression Mechanisms of Cellulase in Fungi. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.92, n. 4, p. 305 – 311, 2001.

- TABKA, M. G.; HERPOËL-GIMBERT, I.; MONOD, F.; ASTHER, M.; SIGOILLO, J. C. Enzymatic saccharification of wheat straw for bioethanol production by a combined cellulose xylanase and feruloyl esterase treatment. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, p. 897 – 902, 2006.
- THAKORE, Y Relatório BIO030E publicado em janeiro de 2008. Disponível em <http://www.bccresearch.com/report/BIO030.html>. Acesso em dezembro de 2009.
- THEODOROU, M. K.; WILLIAMS, B. A.; DHANOA, M. S.; McALLAN, A. B.; FRANCE, J. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetic of ruminant feeds. **Animal Feed Science and Technology**, v. 48, p. 185 - 197, 1994.
- TIEN, M., KIRK, K.T. Lignin peroxidase of *Phanerochaetes chrysosporium*. In: Wood, K.; Kellogg, S. T. **Methods Enzymology**, v. 161, part B, p. 238 - 249, 1988.
- TOPAKAS, E.; VAFIADI, C.; CHRISTAKOPOULOS, P. Microbial production, characterization and applications of feruloyl esterases. **Process Biochemistry**, v. 42, p. 497 – 509, 2007.
- TUOR, U.; WINTERHALTER, K.; FIECHTER, A. Enzymes of white-rot fungi involved in lignin degradation and ecological determinants for wood decay. **J. Biotechnol.** v. 41, 1 - 17, 1995.
- VAN SOEST, P. J., ROBERTSON, J. B., LEWIS, B. A. Symposium: carbohydrate methodology, metabolism and nutritional implications in dairy cattle. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. **J. Dairy Sci.**, v. 74, p. 3583 – 3597, 1991.
- VAN SOEST, P.J. **Nutritional ecology of the ruminant**. 2.ed. Ithaca: Comstock Publication Association, 1994. 476p.
- VINIEGRA-GONZÁLEZ, G.; FAVELA-TORRES, E.; AGUILAR, C. N.; RÓMERO-GOMES, S. J.; DÍAZ-GODÍNEZ, G.; AUGUR, C. Advantages of fungal enzyme production in solid state over liquid fermentation systems. **Biochemical Engineering Journal**, v. 3643, p. 1 - 11, 2002.
- VRIES, R.P.; VISSER, J. Aspergillus enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, p. 497 – 522, 2001.
- VYVER, W. F. J. van de; DAWSON, K. A.; CASEY, N. H.; TRICARICO, J. M. Effect of glycosylation on the stability of fungal xylanase exposed to proteases or rumen fluid in vitro. **Animal Feed Science and Technology**, v. 116, p. 259 - 269, 2004.
- WALLACE, R.J., WALLACE, S.J.A., McKAIN, N., NSEREKO, V.L., HARTENELL, G.F. Influence of supplementary fibrolytic enzymes on the fermentation of corn and grass silages by mixed ruminal microorganisms in vitro. **Journal of Animal Science**, v.79, p. 1905 - 1916, 2001.
- WONG, D. Feruloyl esterase. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v. 133 p. 87 – 112, 2006.
- WONG, D. W. S. Structure and Action Mechanism of Ligninolytic Enzymes. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 157, p. 174 – 209, 2009.
- WONG, K. K.; TAN, L.U.; SADDLER, J.N. Multiplicity of beta-1, 4- xylanase in microorganisms: functions and applications. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 52, p. 305 - 317, 1988.

- WU, H.; PEI, J.; WU, G.; SHAO, W. Overexpression of GH10 endoxylanase XynB from *Thermotoga maritima* in *Escherichia coli* by a novel vector with potential for industrial application. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 48, p. 230 - 234, 2008.
- XAVIER-SANTOS, S.; CARVALHO, C. C.; DA-SILVA, R.; CAPELARI, M.; GOMES, E. Screening for Pectinolytic Activity of Wood Rotting Basidiomycetes and Characterization of the Enzymes. **Folia Microbiologica**, Bulgária, v. 49, n. 1, p. 46 - 52, 2004.
- XAVIER-SANTOS, S. **Diversidade, isolamento em cultura e perfil enzimático de fungos decompositores de madeira da Estação Ecológica do Noroeste Paulista – São José do Rio Preto/Mirassol, SP.** 2003. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas - Microbiologia Aplicada). Universidade Estadual Paulista, Rio Claro.
- XIROS, C. ; MOUKOULI, M.; TOPAKAS, E.; CHRISTAKOPOULOS, P. Factors affecting ferulic acid release from Brewer's spent grain by *Fusarium oxysporum* enzymatic system. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 5917 – 5921, 2009.
- YOUN, H.D.; HAH, Y. C.; KANG, S. O. Role of laccase in lignin degradation by white-rot fungi. **FEMS Microbiology Letters**, v. 132, p. 183 - 188, 1995.
- YU J.; ZHANG, J.; HE, J.; LIU, Z.; YU, Z. Combinations of mild physical or chemical pretreatment with biological pretreatment for enzymatic hydrolysis of rice hull. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 903 – 908, 2009.
- ZADRAZIL, F. Screening of fungi for lignin decomposition and conversion of straw into feed. **Angew. Bot.**, v. 59, p. 433, 1985.
- ZADRAZIL, F., PUNIYA, A.K. Studies on the effect of particle size on solid-state fermentation of sugarcane bagasse into animal feed using white-rot fungi. **Bioresource Technology**, v.54, p. 85 - 87, 1995. (Short communication).
- ZHANG, Q.; LO, C.-M.; JU, L.-K. Factors affecting foaming behavior in cellulose fermentation by *Trichoderma reesei* Rut C-30. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 753 - 760, 2007.
- ZHOU, C.; BAI, J.; DENG, S.; WANG, J.; ZHU, J.; WU, M.; WANG, W. Cloning of a xylanase gene from *Aspergillus usamii* and its expression in *Escherichia coli*. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 831 - 838, 2008.
- ZOUARI-MECHICHI, H.; MECHICHI, T.; DHOUB, A.; SAYADI, S.; MARTÍNEZ, A. T.; MARTÍNEZ, M. J. Laccase purification and characterization from *Trametes trogii* isolated in Tunisia: decolorization of textile dyes by the purified enzyme. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, p. 141 – 148, 2006.