

Rosangela Donizete Perpetua Buzon Pirola

**Produção de Enzimas Despolimerizantes de Material
Vegetal por Fungos Termofílicos usando Suplemento
Comercial como Substrato**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Microbiologia, junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Campus de São José do Rio Preto.

Rosangela Donizete Perpetua Buzon Pirola

**Produção de Enzimas Despolimerizantes de Material
Vegetal por Fungos Termofílicos usando Suplemento
Comercial como Substrato**

Orientadora: Prof^a. Dra. Érika Barbosa Neves Graminha
Co-orientadora: Prof^a. Dra. Eleni Gomes

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

Rosângela Donizete Perpetua Buzon Pirola

**Produção de Enzimas Despolimerizantes de Material
Vegetal por Fungos Termofílicos usando Suplemento
Comercial como Substrato**

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Dra. Érika Barbosa Neves Graminha
Professor Assistente Doutor
UNESP – São José do Rio Preto - SP
Orientadora

Prof^ª. Dra. Maria de Lourdes Teixeira de Moraes Polizeli
Professor Doutor
USP – Ribeirão Preto - SP

Prof^º. Dr. Hamilton Cabral
Professor Assistente Doutor
USP – Ribeirão Preto - SP

São José do Rio Preto, 05 de Março de 2009.

SEM MEDO DE BRILHAR

(Paulo Roberto Gaefke)

Não tenha medo de brilhar,
nem tema a inveja de uns e outros,
se é para estudar, estude um pouco mais,
se é para trabalhar, concentre-se na tarefa,
se é para ensinar, prepare a sua aula,
se é para limpar, não deixe nenhum cantinho,
não se esconda dos holofotes,
saber receber elogios merecidos é divino.

Muitos se escondem atrás de máscaras,
e por medo ou timidez, deixam de realizar,
o que gostariam ou poderiam realizar.
Pessoas capazes de levantar uma empresa,
de consertar um lar destruído,
de ensinar uma profissão para alguém,
e estão escondidas em si mesmas.

Bote para fora o seu talento,
cante, dance, ensine, trabalhe, pinte,
expresse-se com a alma, trabalhe com garra,
não importa a multidão, nem o que vão pensar,
importa sim, você ter o prazer,
ter a certeza de ter feito o seu 'melhor',
e quando a noite chegar, deitar e dormir,
dormir com aquele sorriso no rosto,
de mais um dia vencido, dever cumprido,
sem medo de brilhar...

Aos meus pais,

Na esperança de dar a chance de uma vida melhor, sacrifícios aconteceram e sonhos foram adiados e nem por isso faltou compreensão, dedicação e carinho. A vocês, por natureza, por vocação e por amor, resta dizer que esta grande vitória é o começo de muitas conquistas, a qual serei grata pelo resto de minha vida.

AMO VOCÊS!!!

AGRADECIMENTOS

À Deus pelos momentos que me envolve com sua presença e espírito, e por que não, pelos problemas e aflições que me concedeu para edificar o meu caráter.

Aos meus pais Adão e Maria, que trabalharam em dobro, sacrificando seus sonhos em favor dos meus; e não foram apenas pais, mais amigos e companheiros, mesmo nas horas em que meus ideais pareciam distantes e inatingíveis.

Ao meu namorado Alessandro por todo o amor, companheirismo, incentivo, paciência e por estar sempre presente nos momentos difíceis, me amparando, me aconselhando e trazendo sempre alegrias. Te amo!!!

À Prof^a. Dra. Eleni Gomes, pela oportunidade, pois abriu as portas do seu laboratório e me recebeu de braços abertos, se não fosse à confiança que ela depositou em mim não teria chegado até aqui; por poder contar contigo amparando minhas dúvidas e suscitando em mim a maturidade profissional.

Ao Prof. Dr. Roberto Da Silva e Prof^a. Dra. Daniela Alonso Bocchini, pela ajuda, colaboração e sugestões valiosas dadas na minha qualificação.

À Prof^a. Dra. Paula Rahal, pelo apoio e confiança durante o meu estágio de docência

À Prof^a. Dra. Érika Barbosa Neves Graminha pela orientação.

À minha amiga Priscila, que conheci no laboratório e acabamos construindo uma amizade que irá perdurar por toda a vida.

As minhas grandes amigas dentro e fora do laboratório, Ana Lúcia e Tássia. Vocês tornaram meus dias muito mais agradáveis nestes últimos anos e levarei ótimas lembranças de vocês.

Aos amigos de laboratório pela ajuda na realização deste trabalho: Andréia, Ana Flávia, Ana Lúcia, Carol, Caroline, Denise, Ellen, Ellen Lago, Fabiana, Gisele, Hamilton, Heloiza, Lílian, Máira, Marcelo, Marcia Moretti, Mila, Natália, Paula, Paula Freitas, Ricardo, Roberto, Rodrigo, Rodolfo e Tássia.

Aos funcionários da secretaria da Pós-graduação em Ciências Biológicas, pela ajuda constante, eficiência, atenção e disponibilidade.

A CAPES, pelo auxílio financeiro.

Ao Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas - IBILCE/UNESP - São José do Rio Preto, local onde foi desenvolvida esta pesquisa.

A todos aqueles que direta ou indiretamente colaboraram com a realização deste trabalho.

Muito Obrigada !!!

Índice

	Páginas
1. Introdução	1
2. Revisão Bibliográfica	3
2.1. Lignocelulose.....	3
2.2. Enzimas	4
2.3. Aplicação de enzimas na digestibilidade de ruminantes	9
2.4 Fementação em estado sólido	13
2.5 Resíduos industriais e agrícolas e seus potenciais	15
3. Objetivos	21
4. Material e Métodos	22
4.1. Microrganismos	22
4.2. Obtenção da enzima por fermentação em estado sólido (FES)	22
4.2.1. Substrato	22
4.2.2. Inóculo e condições de cultivo.....	23
4.2.3. Extração da solução enzimática	24
4.3. Determinação das atividades enzimáticas	24
4.3.1. Atividade de xilanase, Pectinase, CMCase, Avicelase e Amilase	24
4.3.2. Atividades de ligninases	25
4.3.2.1. Manganês peroxidase	25
4.3.2.2. Lignina peroxidase	25
4.3.2.3. Lacase	26
4.4. Outros métodos analíticos	26
4.4.1. Açúcares totais e redutores	26
4.5. Caracterização físico-química das enzimas	26
4.5.1. Efeito do pH e temperatura sobre a atividade das enzimas	26
4.5.2. Determinação da estabilidade das enzimas frente às variações de pH e temperatura....	27
4.5.3. Tempo de armazenamento dos extratos enzimáticos	27

4.5.4. Avaliação das enzimas quanto à estabilidade em fluido ruminal	28
4.6. Hidrólise enzimática do capim <i>Brachiaria decumbens</i>	28
5. Resultados e Discussão	30
5.1. Perfil enzimático produzido pelos fungos nos diferentes substratos	30
5.1.1. Perfil de teor de açúcar redutor total durante o período de cultivo dos fungos	38
5.1.2. Estudo da variação do pH ao longo das fermentações	39
5.2. Caracterização bioquímica da poligalacturonase produzida pelo fungo termofílico <i>Thermomucor indicae-seudaticae</i>	40
5.2.1. Estabilidade da PG nas temperaturas de 39°C e 60°C por 8 horas	43
5.3. Caracterização bioquímica das xilanases produzidas pelas duas linhagens de <i>Thermomyces lanuginosus</i>	43
5.3.1. Estabilidade das xilanases nas temperaturas de 39°C e 60°C por 8 horas	48
5.4. Estabilidade das enzimas frente às condições do rúmen.....	50
5.5. Estabilidade dos extratos enzimáticos por 10 semanas.....	52
5.6. Aplicação do preparado enzimático na hidrólise do capim.....	54
6. Conclusões	56
7. Referências Bibliográficas	57

Lista de Figuras

	Páginas
.....	
Figura 1: Representação da fibra de materiais lignocelulósicos e seus componentes: celulose, hemicelulose e lignina.....	3
Figura 2: Estrutura da molécula de pectina e a ação das enzimas pectinolíticas	6
Figura 3: Mecanismo de ação das enzimas xilanolíticas	7
Figura 4: Degradação da celulose.....	8
Figura 5: Produção Brasileira de laranja.....	19
Figura 6: Produção de poligalacturonase (PG) pelos fungos, <i>Thermomucor indicae-seudaticae</i> e <i>Rhizomucor pusillus</i> em FES em substrato A.....	30
Figura 7: Produção de poligalacturonase (PG) pelos fungos <i>Thermomucor indicae-seudaticae</i> e <i>Rhizomucor pusillus</i> , em FES, em substrato B.....	31
Figura 8: Produção de xilanase pelas linhagens de <i>Thermomyces lanuginosus</i> TO-03 e ROB, em FES, em substrato A.....	32
Figura 9: Produção de xilanase pelas linhagens de <i>Thermomyces lanuginosus</i> TO-03 e ROB, em FES, em substrato B	32
Figura 10: Produção de amilase pelos fungos <i>Rhizomucor pusillus</i> e <i>Thermomucor indicae-seudaticae</i> , por FES em substrato A.....	33
Figura 11: Produção de amilase pelos fungos <i>Thermomyces lanuginosus</i> TO-03 e ROB por FES em substrato A	34

Figura 12: Produção de amilase pelos fungos <i>Rhizomucor pusillus</i> e <i>Thermomucor indicae-seudaticae</i> , por FES em substrato B.....	34
Figura 13: Produção de amilase pelos fungos <i>Thermomyces lanuginosus</i> TO-03 e ROB por FES em substrato B.....	35
Figura 14: Produção de CMCase pelos fungos <i>Rhizomucor pusillus</i> e <i>Thermomyces lanuginosus</i> ROB por FES em substrato A.....	35
Figura 15: Produção de Avicelase pelos fungos <i>Rhizomucor pusillus</i> e <i>Thermomyces lanuginosus</i> ROB por FES em substrato A.....	36
Figura 16: Teor de açúcares redutores ao longo das fermentações...	38
Figura 17: Valores de pH mensurados ao longo das fermentações.....	39
Figura 18: Caracterização físico-química da Poligalacturonase produzida por <i>Thermomucor indicae-seudaticae</i> em FES, utilizando o substrato A	41
Figura 19: Caracterização físico-química da Poligalacturonase produzida por <i>Thermomucor indicae-seudaticae</i> em FES, utilizando o substrato B.....	42
Figura 20: Estabilidade da PG produzida por <i>Thermomucor indicae-seudaticae</i> no substrato A e B, nas temperaturas de 39 e 60°C, em períodos de 1 a 8 horas	43
Figura 21: Caracterização físico-química da xilanase produzida por <i>Thermomyces lanuginosus</i> TO-03 em FES, utilizando substrato A.....	45
Figura 22: Caracterização físico-química da xilanase produzida por <i>Thermomyces lanuginosus</i> TO-03 em FES, utilizando substrato B	46

Figura 23: Caracterização físico-química da xilanase produzida por <i>Thermomyces lanuginosus</i> ROB em FES, utilizando substrato A	47
Figura 24: Caracterização físico-química da xilanase produzida por <i>Thermomyces lanuginosus</i> ROB em FES, utilizando substrato B	48
Figura 25: Estabilidade da xilanase produzida por <i>Thermomyces lanuginosus</i> (TO-03) no substrato A e B, nas temperaturas de 39 e 60°C, em períodos de 1 a 8 horas	49
Figura 26: Estabilidade da xilanase produzida por <i>Thermomyces lanuginosus</i> (ROB) no substrato A e B, nas temperaturas de 39 e 60°C, em períodos de 1 a 8 horas	49
Figura 27: Estabilidade da PG produzida por <i>Thermomucor indicae-seudaticae</i> por FES em 168h, quando em presença de fluido ruminal, a 39°C	50
Figura 28: Estabilidade da xilanase produzida por <i>Thermomyces lanuginosus</i> (TO-03) por FES em 168h, quando em presença de fluido ruminal, a 39°C.....	51
Figura 29: Estabilidade da xilanase produzida por <i>Thermomyces lanuginosus</i> (ROB) por FES em 168h, quando em presença de fluido ruminal, a 39°C	51
Figura 30: Estabilidade da PG produzida por <i>Thermomucor indicae-seudaticae</i> por FES em substrato A e B, quando armazenada por 10 semanas a 25°C, 7°C e -20°C.....	53
Figura 31: Estabilidade da xilanase produzida por <i>T. lanuginosus</i> (TO-03) por FES em substrato A e B, quando armazenada por 10 semanas a 25°C, 7°C e -20°C.....	53
Figura 32: Estabilidade da xilanase produzida por <i>T. lanuginosus</i> (ROB) por FES em substrato A e B, quando armazenada por 10 semanas a 25°C, 7°C e -20°C.....	53
Figura 33: Hidrólise enzimática do capim, a partir do preparado enzimático obtido por FES em substrato A utilizando <i>T. indicae-seudaticae</i> (N31) em 168h	54

Figura 34: Hidrólise enzimática do capim, a partir do preparado enzimático obtido por FES em substrato A utilizando *T. lanuginosus* (TO-03) em 168h..... 55

Figura 35: Hidrólise enzimática do capim, a partir do preparado enzimático obtido por FES em substrato A utilizando *T. lanuginosus* (ROB) em 168h 55

Lista de Tabelas

	Páginas
Tabela 1: Dados da produção de diferentes tipos de grãos e estimativa de resíduos no Brasil (em 1000 toneladas) (2007/08-2008/09).....	16
Tabela 2: Quantidade das principais colheitas e o tipo de subprodutos produzidos no Brasil.....	17
Tabela 3: Dados da produção de laranja no Estado de São Paulo (safra 2004/05 – 2005/06) e no Brasil (safra 2008 e 2009) em toneladas.....	19
Tabela 4: Composição do Bellpeso SV com relação a suplementos minerais (g/Kg ou mg/Kg).....	23
Tabela 5: Produção máxima de Poligalacturonase (PG), amilase, xilanase (U/g) pelas 4 linhagens fúngicas.....	37
Tabela 6: Produção máxima de CMCase e Avicelase (U/g) pelos fungos <i>Rhizomucor pusillus</i> e <i>Thermomyces lanuginosus</i> (ROB).....	38

Lista de Abreviaturas

A – Substrato A

ABTS – azino-bis-etilbenthiazolina

ADNS – 3,5 -ácido ditritosalicílico

APTA – Agência Paulista de Tecnologia e Agronegócios

B – Substrato B

CMC - Carboximetilcelulase

Conab – Companhia Nacional de Abastecimento

CS- Centro-sul

EUA – Estados Unidos da América

FDA- Fibra em Detergente Ácido

FDN- Fibra em Detergente Neutro

FES- Fermentação em Estado Sólido

FSm- Fermentação Submersa

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IBILCE – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

LiP – Lignina Peroxidase

MnP – Manganês Peroxidase

MS- Matéria Seca

N- Norte

NO- Nordeste

N31 – *Thermomucor indicae-seudaticae* (N – Natália – nome da pessoa que isolou o respectivo fungo; 31 – número do isolado)

PDA – Potato Dextrose Agar

PG – Poligalacturonase

PGML – Polimetilgalacturonase liase

PMG - Polimetilgalacturonase

ROB – *Thermomyces lanuginosus* (ROB – Roberto - nome da pessoa que isolou o respectivo fungo)

S- Sul

SP- São Paulo

SU- Suldeste

TO-03- *Thermomyces lanuginosus* (TO – Tony - nome da pessoa que isolou o respectivo fungo; 03 – número do isolado)

U – Unidade de atividade da enzima

UNESP – Universidade Estadual Paulista

Resumo

Muitos fungos decompositores de materiais lignocelulósicos vêm sendo utilizados como produtores de enzimas em processos fermentativos nos quais são utilizados substratos de baixo valor comercial, como os resíduos agrícolas e agroindustriais. No entanto, apenas uma pequena parte destes resíduos são utilizados na alimentação de animais de produção. O presente trabalho visou: 1) a obtenção de preparado enzimático termoestável, com alta atividade de xilanase, pectinase e celulases, a partir do cultivo de fungos filamentosos termofílicos por fermentação em estado sólido; 2) uso de suplemento mineral comercial como meio de cultivo para os fungos na fermentação sólida; 3) avaliar a estabilidade das enzimas frente às características do rúmen; 4) hidrólise enzimática. Os fungos *Thermomyces lanuginosus*, *Thermomucor indicae-seudaticae* e *Rhizomucor pusillus* escolhidos para essa finalidade, foram cultivadas a 45°C por 360 horas em fermentação em estado sólido (FES), utilizando-se como substratos, suplemento comercial (B) (Bellpeso SV* - composto de sais minerais, farelo de algodão e polpa cítrica e para efeitos de comparação farelo de algodão e polpa cítrica (35% e 65%) (A). A amostra foi retirada em 24h e todas as outras de 48h em 48h. A produção máxima de pectinase produzida pelo fungo *T. indicae-seudaticae* foi obtida em 168h (421,31U/g) no substrato A, e a máxima atividade de xilanase produzida pelo *T. lanuginosus* TO-03 e ROB foram de 644,30Ug e 865,15 U/g em 168h, respectivamente. A amilase foi produzida por todos os fungos, porém CMCase e Avicelase tiveram uma baixa produção e ligninases não foram detectadas. A temperatura e pH ótimo de pectinase produzida pelo fungo *T. indicae-seudaticae* foi de 55°C e pH 4,5 e para xilanase produzida pelas duas linhagens de *T. lanuginosus*, em ambos os substratos foram 70°C e pH ótimo 6,5, com exceção do ROB no substrato B que apresentou temperatura ótima de 65°C. As xilanases produzidas pelas linhagens de *T. lanuginosus* foram mais estáveis ao fluido e a saliva artificial do que a poligalacturonase produzida pelo *T.indicae-seudaticae*. A hidrólise enzimática a partir da ação do preparado enzimático obtida pelos fungos estudados neste trabalho sobre o capim foi significativa, já que este não passou por nenhum pré- tratamento, apenas à lavagem com água, o que mostra que o uso destes extratos na hidrólise da fibra consumida pelo animal pode ser muito vantajoso.

Palavras-chaves: enzimas, fermentação em estado sólido, fungos termofílicos, ruminantes.

Abstract

Many rot fungi of lignocellulosics material are being utilized as producers of enzymes in fermentation processes, in which, substrates of very little commercial value such as agricultural and agroindustrial residues are used. However, only a small portion of these residues are utilized in the production of animal feed. The present project proposes: 1) the attainment of prepared enzymatic thermostable, with high activity of xylanase, pectinase and cellulases, from the cultivation of filamentous thermophylic fungi from solid state fermentation; 2) the use of commercial mineral supplementation as medium of cultivation for the fungi in solid fermentation; 3) to evaluate the enzymes stability when facing the characteristics of the rumen; 4) enzymatic hydrolysis. *Thermomyces lanuginosus*, *Thermomucor indicae-seudaticae* and *Rhizomucor pusillus* fungi chosen for this purpose, were cultivated at 45°C, for 360 hours in solid state fermentation (SSF), utilizing as substrates, commercial supplement (Bellpeso SV* - composed of mineral salt, cotton meal and citrus pulp) (B) and for comparison purpose cotton meal and citrus pulp at 35% and 65% (A). The first sample was taken in 24hrs and all the others every 48hrs. The maximum production of pectinase produced by the fungus *T. indicae-seudaticae* was obtained in 168hrs (421.31U/g) in the commercial substrate A, and to maximum activity of xylanase produced by the *T. lanuginosus* TO-03 and ROB was of 644.30 U/g and 865.15 U/g in 168hrs, respectively. Amylase was produced by all of the fungi, however CMCcase and Avyccelase had a low production and ligninases was not detected. The optimum temperature and pH of pectinase produced by the fungus *T. indicae-seudaticae* were of 55°C and pH 4.5 and for xylanase produced by the two lineages of *T. lanuginosus*, in both substrates were 70°C and optimum pH 6.5, with the exception to ROB in the substrate B that presented optimum temperature of 65°C. The xylanases produced by the lineages of *T. lanuginosus* were more stable in the fluid and in the artificial saliva than polygalacturonase produced by the *T.indicae-seudaticae*. The effect of enzymatic hydrolysis from the action of the enzymatic preparation obtained by the fungi on the grass studied in this project was significant, since it did not go through a pre- handling process, only washed with water, which shows that the use of these extracts in the hydrolysis of the fiber provided to the animal can be really advantageous.

Keywords: enzymes, thermophylic fungi, ruminants, solid state fermentation.

1. Introdução

Atualmente, tem-se destacado, o uso de enzimas despolimerizantes de material vegetal para utilização em nutrição animal, por meio da degradação parcial de resíduos agrícolas e agroindustriais que servem como matéria prima para alguns tipos de ração (PANDEY *et al.*, 2000). Estes resíduos, em sua maioria, demonstram grande potencial nutricional principalmente na formulação de dietas para bovinos, e muitas são as culturas das quais seu subproduto pode ser adequado à alimentação de ruminantes, como por exemplo, algodão, amendoim, soja, arroz e cereais de inverno, cana-de-açúcar, citros, mandioca, milho, sorgo, além de frutas e outros hortifrutigranjeiros (EUN *et al.*, 2006).

Estima-se que sejam gerados milhares de toneladas por ano de resíduos agrícolas e agroindustriais no Brasil. Grande parte desses resíduos fica disponível no campo tornando-se, muitas vezes, um problema de ocupação de espaço devido à lenta degradação natural. Apenas uma pequena parte desses materiais é utilizada na alimentação de animais de produção (YANG *et al.*, 2001).

Na região noroeste do estado de São Paulo há abundância de resíduos agro-industriais, tais como bagaço de cana-de-açúcar e de laranja, cascas de frutas e resíduos da fabricação de farinha de mandioca, os quais podem ser usados como fontes de carbono e nutrientes para a fermentação em estado sólido (FES), ou mesmo como suporte inerte de outros substratos. Tais resíduos têm mostrado bons resultados, na produção de enzimas como pectinases (MARTINS *et al.*, 2002), celulasas, xilanases (LEITE, 2004) e ligninases (XAVIER SANTOS, 2003).

Muitos microrganismos decompositores de materiais lignocelulósicos vêm sendo selecionados para serem utilizados como produtores de enzimas, com características adequadas, utilizando substratos de baixo valor comercial como resíduo agrícola e agroindustrial (SCHIMIDT *et al.*, 2001).

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. Porém, estas enzimas precisam ser estáveis nas condições físico-químicas do rúmen, como pH em torno de 6,0 e em temperaturas de até 40°C. Além disso, as enzimas ainda precisam ter certa resistência à presença de sais e à ação de proteases. Essas características são coincidentes com aquelas descritas por VIEILLE & ZEIKUS (2001) para termoenzimas, as quais têm mostrado ampla tolerância às variações de pH, resistência a

agentes desnaturantes, além da atividade e preservação de sua estabilidade em temperaturas acima da mesofílica.

Considerando 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 para o processo fermentativo. Nesse aspecto, FES, é atrativa devido a muitas vantagens, principalmente, o uso de meio a base de resíduos sólidos agrícolas e agro-industriais para crescimento de microrganismos (GRAMINHA *et al.*, 2008).

Pelo exposto, pode-se inferir que a pesquisa da produção de enzimas despolimerizantes de material vegetal, a partir de fungos termofílicos, em FES utilizando resíduos agro-industriais, para utilização em dietas de ruminantes pode ser um processo vantajoso. O presente trabalho descreve os resultados obtidos na produção destas enzimas por meio da FES, utilizando diferentes substratos.

2. Revisão Bibliográfica

2.1. Lignocelulose

O material lignocelulósico consiste principalmente de três diferentes tipos de polímeros, isto é, celulose (34 - 50%), hemicelulose (19 - 34%) e lignina (11 - 30%), que se encontram associados uns aos outros (Fig. 1) (ROGALINSKI et al., 2008; CAGNON et al., 2009).

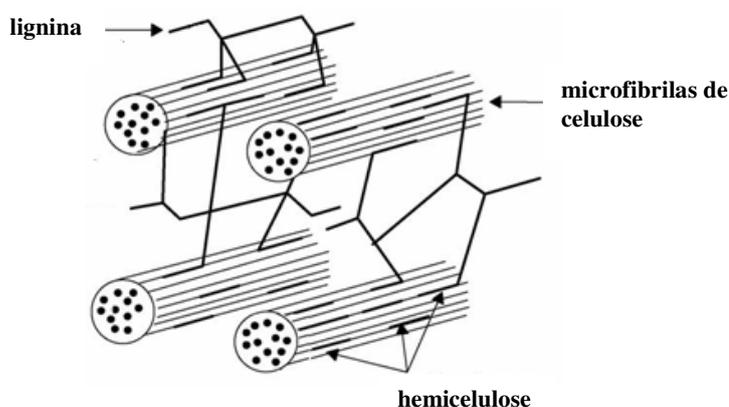


Figura 1- Representação da fibra de materiais lignocelulósicos e seus componentes: celulose, hemicelulose e lignina (Adaptado: Graminha et al., 2008).

A celulose consiste de subunidades de D-glicose unidas por ligações glicosídicas β -1,4, composta por regiões cristalinas (organizada), e por regiões amorfas (não organizadas). As microfibrilas de celulose são “empacotadas” juntas e formam assim as chamadas fibrilas de celulose. Estas fibrilas são principalmente independentes e fracamente unidas por pontes de hidrogênio (HENDRIKS & ZEEMAN, 2009).

As hemiceluloses são polissacarídeos heterogêneos que consistem de diferentes polímeros como pentoses (xilose e arabinose), hexoses (manose, glicose e galactose) e açúcares ácidos. As hemiceluloses têm massa molecular mais baixa do que a celulose e ramificações com cadeias laterais curtas o que consiste em polímeros mais fáceis de serem hidrolisados. As hemiceluloses são intimamente associadas com a lignina e celulose, além de interagir covalentemente com a pectina. O componente dominante da madeira dura e plantas

agrícolas, como o capim e a palha são a xilana, enquanto que a de madeira mole é a glucomanana (SINGH *et al.*, 2002; HENDRIKS & ZEEMAN, 2009).

A xilana é o maior componente de hemicelulose e o segundo polissacarídeo mais abundante (LI *et al.*, 2007; WU *et al.*, 2008a) da parede celular em cereais (BAE *et al.*, 2008; ZHOU *et al.*, 2008), constituindo de 20-40% da biomassa total da planta. Entre as plantas anuais, madeira dura (angiospermas) e mole (gimnospermas) contém 20-25% e 7-12% de xilana, respectivamente (SENTHILKUMAR *et al.*, 2008). Na madeira dura 60-70% dos resíduos de xilose são acetilados, em contraste, os resíduos de xilose de madeira mole não são acetilados (JUHÁSZ *et al.*, 2005).

A lignina é depois da celulose e hemicelulose uma das macromoléculas mais abundantes na natureza estando presente na parede celular (BURANOV & MAZZA, 2008) e compreendendo de 16 a 33% da biomassa das plantas (WU *et al.*, 2008b). É uma macromolécula amorfa insolúvel em água que consiste de três diferentes unidades de fenilpropano (*p*-coumaril, coniferil e álcool sinapil) que são unidas por diferentes tipos de ligações. O principal propósito da lignina é dar suporte estrutural, impermeabilidade e resistência contra o ataque de microrganismos e estresse oxidativo (BONINI *et al.*, 2008; HENDRIKS & ZEEMAN, 2009).

Existem três tipos principais de lignina: a lignina de madeira mole (gimnospermas), a lignina de madeira dura (angiospermas) e a lignina de gramíneas (não lenhosas ou herbáceas) (BURANOV & MAZZA, 2008).

2.2. Enzimas

As enzimas são catalisadores orgânicos produzidos pelas células vivas e, uma vez sintetizados por uma célula, poderá atuar independentemente da mesma, se condições apropriadas forem mantidas. Diferentemente de ácidos ou oxidantes, as enzimas são reativas apenas com seus substratos específicos e não reativas com outros substratos. Além disso, são inerentemente favoráveis ao meio ambiente (KAMEDA *et al.*, 2007).

As pectinases são um importante grupo de enzimas responsáveis pela degradação de moléculas longas e complexas denominadas pectinas, que ocorrem como polissacarídeos estruturais na lamela média e em paredes celulares primárias de plantas jovens (KASHYAP *et al.*, 2001).

As substâncias pécnicas são polissacarídeos coloidais ácidos e complexos, com resíduos de ácido galacturônico unidos por ligações $\alpha(1-4)$. As cadeias laterais consistem em L-ramanose, arabinose, galactose e xilose. No caso do ácido galacturônico, os grupos carboxila são parcialmente esterificados por grupos metil e parcial ou totalmente neutralizados por íons sódio, potássio e amônio (KASHYAP et al., 2001).

As pectinas são diferenciadas de acordo com a natureza da cadeia principal. Protopectinas são substâncias insolúveis encontradas em tecidos vegetais e que servem de base para a produção de compostos solúveis. Substâncias pécnicas, por outro lado são galacturonanas que contêm quantidades bastante reduzidas de grupos metoxil. Já os ácidos pectínicos são galacturonanas com quantidades variáveis de grupos metoxil. Pectina é um nome genérico utilizado para designar misturas cujo ácido pectínico é o principal componente. Quando na sua forma nativa, a pectina está presente na parede celular e geralmente apresenta-se interligada com outros polissacarídeos estruturais e proteínas, formando assim moléculas insolúveis de protopectina (KASHYAP et al., 2001).

As pectinases são classificadas de acordo com três critérios, sendo eles: o substrato preferencial de ação (pectina, ácido pectínico ou oligo-D-galacturonato), ação ou trans-eliminação ou hidrólise e padrão de clivagem randômico ou terminal. Pectina esterases (EC 3.1.11.1) catalisam a desesterificação de grupos metoxil de galacturonato formando ácido pectínico. Polimetilgalacturonases (PMG) catalisam a clivagem hidrolítica de ligações $\alpha-1,4$ -glicosídicas e a ação pode ser endo (preferencial em pectinas altamente esterificadas) ou exo (em terminações não-redutoras da cadeia de pectina) (KASHYAP et al., 2001). Poligalacturonases (PG) catalisam a hidrólise de ligações $\alpha-1,4$ -glicosídicas em ácido pectínico. As endo-poligalacturonases hidrolisam as ligações glicosídicas $\alpha(1\rightarrow4)$ internas, causando a despolimerização da molécula e liberando oligossacarídeos de ácido poligalacturônico, enquanto que as exo-poligalacturonases removem as moléculas de ácido D-galacturônico pela hidrólise das ligações glicosídicas $\alpha(1\rightarrow4)$ a partir da extremidade não redutora liberando ácidos di ou monogalacturônico (JAYANI et al., 2005). Por outro lado, há as polimetilgalacturonato liases (PGML), que catalisam a quebra da pectina por clivagem trans-eliminativa, com ação endo (catalisando a clivagem randômica de ligações $\alpha-1,4$ -glicosídicas) ou exo (com clivagem seqüencial das referidas ligações). Poligalacturonato liases clivam ligações $\alpha-1,4$ -glicosídicas no ácido pectínico por trans-eliminação, por ação endo (catalisando a clivagem randômica das ligações) ou exo (clivagem seqüencial das ligações) (Fig. 2). Protopectinases solubilizam protopectina formando moléculas de pectina altamente polimerizadas e solúveis (KASHYAP et al., 2001).

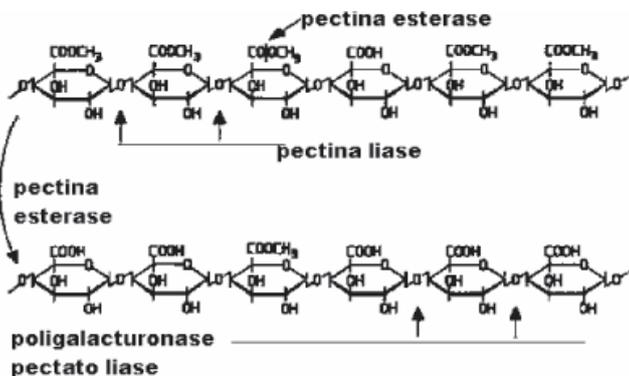


Figura 2- Estrutura da molécula de pectina e ação das enzimas pectinolíticas (Adaptado: Gomes et al., 2007).

Devido a complexidade estrutural da molécula de xilana (CHENG et al., 2008), a hidrólise completa desse polímero requer um complexo sistema xilanólítico incluindo as endo-1,4- β -D-xilanases (EC 3.2.1.8) que hidrolisam as ligações glicosídicas β -1,4 internas de xilana (o maior constituinte de hemicelulose) resultando em xilooligossacarídeos com diferentes comprimentos (YANG et al., 2008), exo-1,4- β -xilosidases (EC 3.2.1.37) que degradam pequenos oligossacarídeos liberando xilose (DELICHEVA et al., 2008), α -L-arabinofuranosidasas (3.2.1.55) que são capazes de hidrolisarem os grupos α -L-arabinofuranosil terminais (SPAGNA et al., 1997), acetil xilana esterase (EC 3.2.1.72) hidrolisam as ligações entre xilose e ácido acético, o ácido ferúlico esterase (EC 3.2.1.73) hidrolisam as ligações entre a arabinose e o ácido ferúlico presente em algumas formas de arabinoxilanas (MANDALARI et al., 2007) e α -glucuronidasas (EC 3.2.1.1) hidrolisam as ligações glicosídicas α -1,2 entre xilose e ácido glucurônico ou a ligação 4-O-metil-éster (Fig. 3) (DOBREV et al., 2007).

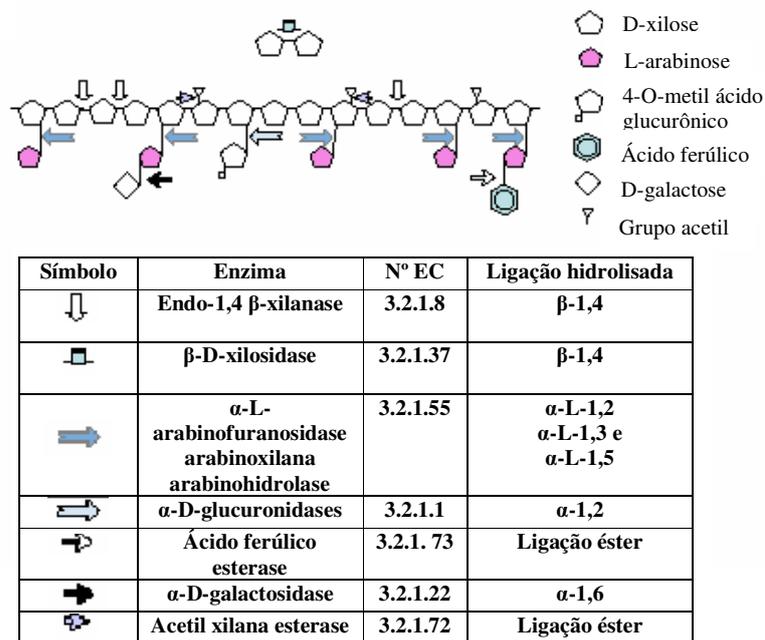


Figura 3- Mecanismo de ação das enzimas xilanolíticas. As enzimas ativas no substrato são listadas na tabela acima (Adaptado: Aro *et al.*, 2005).

As celulasas são enzimas produzidas por um grande número de fungos, principalmente Ascomicetos e Basidiomicetos. Embora existam diferenças no comportamento destas enzimas, as hidrólises enzimáticas de material celulósico até glicose envolvem a ação sinérgica de, no mínimo, três enzimas: (1) endoglucanase (EC 3.2.1.4), (2) exoglucanase ou celobiohidrolases (EC 3.2.1.91) e (3) β-glicosidase (EC 3.2.1.21) (ZHANG *et al.*, 2007). A endoglucanase (EG) hidrolisa ligações glicosídicas β-1,4 de cadeias de celulosas aleatoriamente e ataca a cadeia de carboidrato internamente, resultando em uma redução do grau de polimerização. Enquanto que as exoglucanases degradam celulose cristalina produzindo celobiose. Já a β-glicosidase hidrolisa celobioses e outros celooligossacarídeos curtos à glicose (Fig. 4) (THONGEKKAEW *et al.*, 2008).

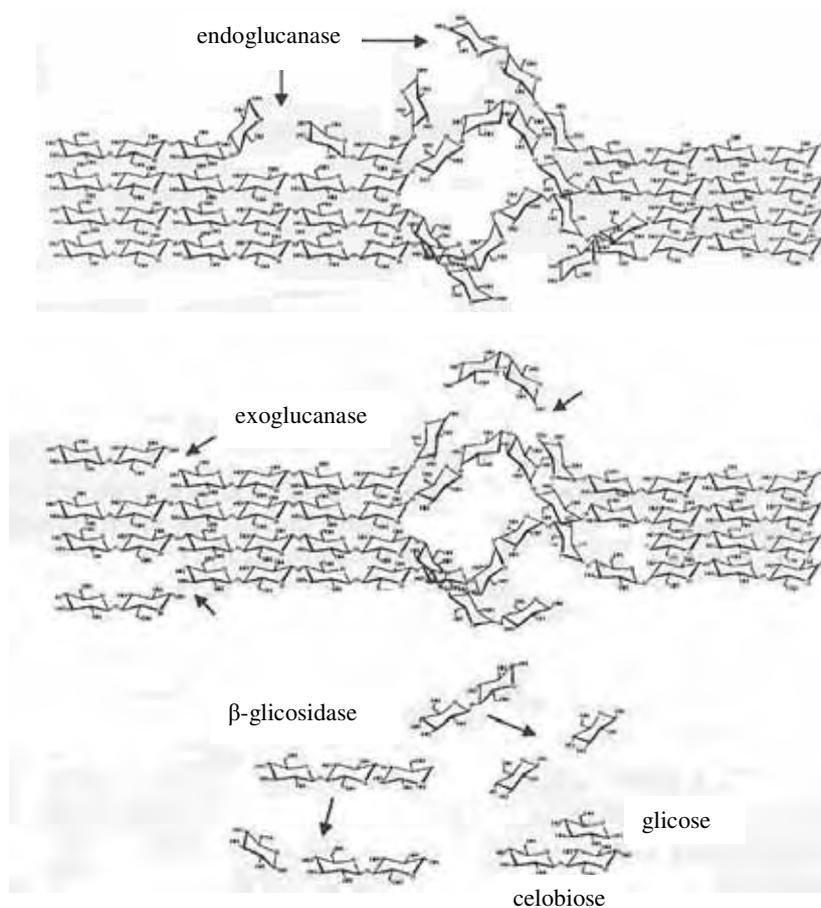


Figura 4- Degradação da celulose. Uma vista esquemática do sistema celulolítico (Said & Pietro, 2004).

As principais enzimas ligninolíticas fúngicas são manganês peroxidase (MnP; EC 1.11.1.13), lignina peroxidase (LiP; EC 1.11.1.14) que catalisam uma variedade de reações oxidativas que são dependentes de H_2O_2 , e lacases (EC 1.10.3.1) que oxidam compostos fenólicos e reduzem o oxigênio molecular da água (ARO et al., 2005). Alguns fungos produzem todas essas enzimas, outros produzem uma ou duas destas (DRITZA et al., 2007). Porém, mesmo com sua habilidade proficiente para degradar lignina, os fungos que decompõem a madeira são incapazes de utilizar a lignina como fonte de carbono e energia e a despolimerização da lignina fornecem acesso para a degradação da celulose e hemicelulose por outros microrganismos (LEVASSEUR et al., 2008).

Em contraste aos basidiomicetos, muito pouco estudo tem considerado o envolvimento e aplicação de ascomicetos ou fungos imperfeitos (deuteromicetos) em degradação de lignocelulose. Estes microrganismos representam um segundo grupo

importante de fungos que colonizam a madeira, depois dos basidiomicetos. No entanto, alguns estudos têm demonstrado extensa degradação de lignina por diferentes ascomicetos (LOPEZ *et al.*, 2007).

2.3. Aplicação de enzimas na digestibilidade de ruminantes

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

Nutricionistas de ruminantes e microbiologistas têm a tempo interesse na manipulação do ecossistema microbiano do rúmen para aumentar a utilização e qualidade do alimento, melhorar a eficiência de produção dos ruminantes e aliviar os problemas associados com práticas de alimentação decorrente (LEE *et al.*, 2000). Desde 1960, numerosos estudos focalizaram o assunto de adição de vários microrganismos e/ou aditivos alimentares químicos. Entre aditivos microbianos, há evidências de relacionamentos positivos definidos entre fungos anaeróbicos do rúmen e o aumento da ingestão voluntária de alimento fibroso de baixa digestibilidade (TRIPATHI *et al.*, 2007).

Muitos trabalhos utilizando enzimas fibrolíticas exógenas para melhorar a digestão de materiais vegetais, melhorar a eficiência de produção e diminuir a excreção de nutrientes vêm sendo conduzidos nas duas últimas décadas no campo da nutrição animal (YANG *et al.*, 1999; MORGAVI, *et al.*, 2000; BEAUCHEMIN *et al.*, 2003; COLOMBATTO & BEAUCHEMIN, 2003; THAREJA *et al.*, 2006; EUN & BEAUCHEMIN, 2007;

ELWAKEEL *et al.*, 2007; MUWALLA *et al.*, 2007; REDDISH & KUNG, 2007; TRICARICO *et al.*, 2007). No entanto, a maioria dos trabalhos relata a utilização de preparados enzimáticos comerciais constituídos por enzimas xilanases e celulases (endoglucanases) (EUN *et al.*, 2007; EUN & BEAUCHEMIN, 2007; COLOMBATTO *et al.*, 2007), outros relatam a utilização de enzimas como esterases (KRUEGER & ADESOGAN, 2007; KRUEGER *et al.*, 2007), amilases (TRICARICO *et al.*, 2007) e proteases (COLOMBATTO *et al.*, 2003a). Porém, o mecanismo de ação dessas enzimas em ruminantes ainda não é bem definido, mas há evidências de que seja uma combinação de efeitos pré e pós-alimentação. Com relação aos efeitos de pré-alimentação, o índice de aplicação da enzima e o tempo de interação de enzima-alimento, criam um complexo enzima-alimento estável, que protege as enzimas de proteólises no rúmen. Esta idéia foi sustentada pelo fato de que quando enzimas foram diretamente adicionadas no rúmen em vez de aplicadas ao alimento, nenhuma melhora foi observada em relação à degradação da fibra. Contudo, quando celulases e xilanases foram aplicadas ao alimento apresentaram-se resistentes a proteólises do rúmen durante um período significativo de tempo. Quanto aos efeitos da enzima pós-alimentação, o pH ruminal foi considerado o mais importante. É conhecido que práticas modernas de alimentação levam frequentemente o pH ruminal ao sub-ótimo para a degradação da fibra. Dado o pH ótimo como ácido, a adição de enzimas fibrolíticas exógenas podem aliviar os efeitos adversos sobre a degradação da fibra (COLOMBATTO *et al.*, 2007).

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

No entanto, 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 (NSEREKO *et al.*, 2000; WALLACE *et al.*, 2001; BEAUCHEMIN *et al.*, 2003), pois o aumento da digestão do alimento, devido à suplementação, pode levar a um aumento no risco de acidose ruminal

(EUN & BEAUCHEMIN, 2005). Outros argumentam o contrário, com base na hipótese de que nem todos os sítios do substrato disponíveis para atuação das enzimas microbianas estejam ocupados, e portanto, o aumento na concentração de enzimas fibrolíticas poderia incrementar a taxa de digestão da celulose e hemicelulose no rúmen, com auxílio da atividade microbiana (DEHORITY & TIRABASSO, 1998). Muito da variabilidade da atuação enzimática são atribuída a fatores tais como o tipo e atividade da enzima, as condições de cultura empregada (EUN & BEAUCHEMIN, 2007), nível de suplementação e enzima fornecida, estabilidade da enzima no aparelho digestivo (YANG *et al.*, 2001; GIRALDO *et al.*, 2008), composição da dieta, método de aplicação da enzima e o balanço energético dos animais teste. Respostas positivas têm sido obtidas com adição de preparados enzimáticos à ração, mas quais as enzimas chave envolvidas e o mecanismo de ação ainda não são bem definidos (BEAUCHEMIN *et al.*, 2003).

Beauchemin e colaboradores (1996) informaram que adicionando um produto enzimático contendo atividades de xilanase e celulase ao feno de alfafa, o ganho médio diário e o crescimento do gado de corte aumentaram por até 30%. Nsereko e colaboradores (2000) e Colombatto e colaboradores (2003b) relataram que produtos enzimáticos contendo xilanases, esterases e proteases tiveram efeitos estimulatórios na degradação do feno de alfafa *in vitro*. 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 continham pouca atividade de polissacaridase, e também que houve diferenças na eficácia entre os tipos de proteases.

Estudos mostraram que a alimentação com enzimas fibrolíticas exógenas (xilanase e celulase) levou a efeitos positivos em vacas leiteiras lactantes e gado de corte (EUN *et al.*, 2007) melhorando a digestibilidade da fibra em detergente neutro (FDN), e da fibra em detergente ácido (FDA) (O'CONNOR-ROBISON *et al.*, 2007). A suplementação com enzimas fibrolíticas para bois ou novilhas em crescimento alimentados com forragens secas ou altas dietas concentradas aumentou o ganho de peso do corpo com efeitos menores em entrada de alimentos ou com relação à conversão de alimentos. No entanto, a mesma mistura de enzimas resultou em 11% de melhoramento na conversão alimentar do gado de corte em dietas baseadas em grãos (TITI & TABBAA, 2004). Adicionando as enzimas fibrolíticas exógenas na dieta destes animais aumenta a atividade enzimática fibrolítica do rúmen, reforçando a noção de que enzimas exógenas atuam sinergisticamente com a microbiota do rúmen resultando em um aumento muito superior na digestão do alimento, o que, para dietas de baixa forragem isto pode resultar em uma diminuição da eficiência do nitrogênio (EUN & BEAUCHEMIN, 2005).

Eun e colaboradores (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 FDN e FDA em ambas as forragens utilizadas. A dose ótima para este produto foi de 1,4 mg/g de MS (matéria seca), para ambas as forragens, com aumento da digestibilidade da 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).

As enzimas fibrolíticas também foram usadas durante a ensilagem para aumentar as características da fermentação de forragem, apresentando efeitos positivos (MURRAY *et al.*, 2007). Isso se deve ao fato de que a adição de celulasas ou inoculantes microbianos às forragens (principalmente nas silagens de gramíneas) antes do ensilamento, diminui o pH rapidamente levando à uma melhora nas características de ensilamento devido a liberação de açúcares fermentados pela hidrólise de celulose, aumentando a população de bactérias produtoras de ácido lático, portanto melhorando a conservação de uma silagem (MANDEBVU *et al.*, 1999). Além do mais, estudos também têm mostrado um aumento em digestibilidades *in vivo* das silagens resultantes quando servidas como alimento aos ruminantes. No entanto, embora estudos mostraram características melhoradas de fermentação em digestibilidade *in vivo* de silagens tratadas com enzimas em ruminantes, uma redução na estabilidade aeróbica destas silagens também foi informada (MURRAY *et al.*, 2007).

Segundo Colombatto e colaboradores (2004), enzimas derivadas de fontes termofílicas podem ser mais estáveis do que as de fontes mesofílicas e essa maior estabilidade das enzimas termofílicas faz com que sejam ativas por um período mais longo de tempo do que o esperado normalmente durante o processo de ensilamento, podendo resultar em degradação aumentada da fibra.

O uso de enzimas fibrolíticas (celulase e xilanase) também pode aumentar a digestibilidade dos grãos de cevada, apresentando efeitos positivo no desempenho animal. Aplicando uma mistura de enzimas sobre a cevada as concentrações de FDA e FDN diminuem, aumentando a digestibilidade de FDA em ruminantes. O acetato em relação ao propionato tendem a diminuir, o qual pode ser atribuído por aumentar a degradação do amido

no rúmen como um resultado do aumento da pré digestão da cevada (DEHGHAN-BABADAKY *et al.*, 2007).

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 foram 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 e método de aplicação.

A maioria dos trabalhos citados acima foram realizados em países como os Estados Unidos e Canadá, onde as temperaturas variam entre -30°C e 30°C e as enzimas utilizadas são as comerciais, além da forragem desses países serem mais digestíveis pelos ruminantes. Enquanto que no Brasil, a maior parte dos bovinos de melhor qualidade são alimentados principalmente com pastagens, e as forragens tropicais além de apresentarem qualidade nutricional inferior, em função de maiores proporções de parede celular e lignina, também apresentam menores teores de proteína. Por isso a busca por enzimas despolimerizantes de material vegetal, principalmente as enzimas do complexo lignocelulolítico, é de grande importância.

2.4. Fermentação em estado sólido

A fermentação em estado sólido (FES) pode ser definida como o crescimento de microrganismos sobre suportes sólidos úmidos na ausência ou próximo da ausência de água livre entre as partículas do material sólido. Este suporte pode ser qualquer substrato natural sendo usado como uma fonte de carbono e energia, ou ainda esse substrato pode servir como suporte inerte podendo ser enriquecido com uma solução nutriente (BHANU PRAKASH *et al.*, 2008; DIORIO *et al.*, 2008).

A FES é muito atrativa e vantajosa, primeiro, porque simula as condições de vida dos fungos filamentosos, ou seja, os meios sólidos se assemelham aos meios naturais como solos onde esses fungos se desenvolvem. Muitos destes microrganismos são capazes de fazer a bioconversão desses substratos em compostos de fácil assimilação para o seu metabolismo, onde as enzimas hidrolíticas têm papel fundamental nessa bioconversão, e agem conjunta e sinergisticamente na formação de um complexo com várias enzimas, destacando-se: celulasas e xilanasas (VALASKOVÁ & BALDRIAN, 2006; BHANU PRAKASH *et al.*, 2008; DIORIO *et al.*, 2008). E segundo, porque pode usar como substrato para a FES resíduos agrícolas (como farelo de trigo, bagaço de laranja, bagaço de cana-de-açúcar, farelo de mandioca e polpa de limão) (DE GREGORIO *et al.*, 2002; MARTINS *et al.*, 2002, SILVA *et al.*, 2002 e 2005; FREITAS *et al.*, 2006) e resíduos agroindustriais como suporte em FES, sendo este tipo de fermentação economicamente importante para minimizar problemas ambientais (KHORASVI-DARANI & ZOGHI, 2008).

Nos últimos anos, os processos de fermentação em estado sólido são relatados por vários pesquisadores como uma alternativa para fermentação submersa (FSm), devido a algumas vantagens, tais como: menor risco de contaminação bacteriana resultantes do baixo requerimento de água, menos resíduos na geração de água, menor problema ambiental quanto a disposição de resíduos sólidos, menores problemas de efluentes líquidos e estabilidade do produto devido a baixa diluição do meio, fácil aeração devido à porosidade do material e extração facilitada pela alta concentração de produtos (IMANDI *et al.*, 2008; LIA & JIA, 2008; MUKHERJEE *et al.*, 2008; SUN & XU, 2008), produtividade mais alta por volume de reator, capital e custos operacionais menores, equipamentos mais simples e processamentos mais fáceis quando comparados com os da fermentação submersa. Há também evidências que algumas enzimas são menos afetadas por repressão catabólica, quando obtidas por FES (MAMMA *et al.*, 2008).

Apesar de a FES apresentar várias vantagens, alguns problemas são apresentados durante a sua execução que dificultam a produção de substâncias de interesse em grande escala: risco de elevação excessiva de temperatura (problemas de transferência de calor e de perda de umidade para as fermentações mais longas); difícil regulação dos parâmetros de cultura (por exemplo: pH e umidade) e necessidade de pré-tratamento (umidificação, homogeneização, dispersão, tratamento térmico e enzimático) (RODRIGUEZ-COUTO & SANROMÁN, 2006).

A busca pela redução dos custos para produção de enzimas faz com que aumente as investigações sobre substratos e microrganismos usados na fermentação em estado sólido. A

produção de enzimas, por esta forma de cultivo, é um processo atraente, sob o ponto de vista econômico, devido, principalmente, à possibilidade de obtenção de uma maior concentração enzimática por unidade de volume (SOCCOL & VANDERBERGHE, 2003).

2.5. Resíduos industriais e agrícolas e seus potenciais

Os resíduos produzidos na indústria ou em unidades agrícolas no Brasil (Tabela 1) como, por exemplo, palha de cereais, palha de milho, serragem, polpa de madeira, resíduos de farelo de algodão, bagaço de cana-de-açúcar, bagaço cítrico, casca de fruta, sabugo de milho e muitos outros constituem um problema de disposição para as agroindústrias, pois na maior parte das vezes é deixado no campo se tornando um poluente ambiental. Estes resíduos são nutritivos, mas apenas uma pequena porção tem sido usada diretamente como alimento ou como componentes para dietas de gado industrialmente formuladas. As principais safras colhidas no Brasil e os tipos de subprodutos produzidos são apresentados na Tabela 2 (GRAMINHA *et al.*, 2008; JONATHAN *et al.*, 2008).

Tabela 1- Dados da produção de diferentes tipos de grãos e estimativa de resíduos produzidos no Brasil (em 1000 toneladas) (2007/08 – 2008/09).

Região	Cultura			Trigo			Soja		
	Algodão (produção total)	2008/2009	Resíduos	2007/2008	2008/2009	Resíduos	2007/2008	2008/2009	Resíduos
N	-	-	-	-	-	-	1472,3	1445,8	1084,4
NO	1369,5	1273,2	674,8	-	-	-	4829,7	4383,2	3287,4
CO	2579,5	1858,2	948,8	82,3	166,8	59,2	29114,0	27692,4	20769,3
SU	134,6	100,6	53,3	155,1	265,1	99,8	3983,4	4047,4	3035,6
S	17,3	11,7	6,2	3586,6	5435,6	2245,3	20618,0	21252,1	15939,1
N/NO ^a	1375,5	1279,2	678,0	-	-	-	6302,0	5828,9	4371,8
CS ^b	2731,4	1970,5	1008,3	3824,0	5867,5	2404,3	53715,4	52991,9	39744,0
Brasil ^c	4106,9	3249,7	1686,3	3824,0	5867,5	2404,3	60017,4	58820,9	44115,8

Região	Cultura			Amendoim (1ª e 2ª safra)			Cana-de-açúcar		
	Milho (1ª e 2ª safra)	2008/2009	Resíduos	2007/2008	2008/2009	Resíduos	2008	Resíduos	Resíduos
N	1372,9	1250,1	625,0	6,3	6,3	4,7	1348,6	134,9	-
NO	4407,4	3912,3	1956,2	11,8	11,6	8,6	67868,0	6786,8	-
CO	16686,3	14916,9	7458,5	12,6	12,6	9,3	66510,1	6651,1	-
SU	11417,8	10685,4	5342,7	248,4	235,5	174,3	392605,7	39260,6	-
S	24780,0	23679,8	11839,9	24,0	25,2	18,6	43038,3	4303,8	-
N/NO ^a	5780,3	5162,4	2581,2	18,1	17,9	13,3	69216,6	6921,7	-
CS ^b	52884,1	49282,1	24641,1	285,0	273,4	202,2	502154,1	50215,5	-
Brasil ^c	58664,4	54444,5	27222,3	303,1	291,3	215,5	571370,65	57137,2	-

Fonte: CONAB – Dados coletados: Janeiro 2009

^a soma da produção de diferentes tipos de grãos das regiões norte e nordeste.^b soma da produção de diferentes tipos de grãos das regiões centro-oeste, suldeste e sul.^c soma da produção de diferentes tipos de grãos das regiões norte, nordeste e centro-sul.

Tabela 2- Quantidade das principais colheitas e o tipo de subprodutos produzidos no Brasil.

Espécies	Safras	Quantidades (Kg matéria seca/toneladas)	Subprodutos produzidos
<i>Gossypium</i> spp.	Algodão	530	Caroço, farelo e cera
<i>Arachis hypogaea</i>	Amendoim	740	Casca e cera
<i>Glycine Max</i>	Soja	750	Casca e cera
<i>Oryza sativa</i>	Arroz	557	Palha e farelo
<i>Triticum</i> spp.	Trigo	475	Palha e farelo
<i>Hordeum vulgare</i>	Cevada	492	Palha e farelo
<i>Zea mays</i>	Milho	550	Talo, folha e sabugo
<i>Saccharum</i> spp.	Cana-de-açúcar	150	Bagaço de cana-de-açúcar

Fonte: Graminha et al., 2008.

As atividades agrícolas e agroindustriais produzem milhões de toneladas de subprodutos por ano, como exemplo pode citar o bagaço de cana-de-açúcar, bagaço de laranja, casca de frutas, palha de milho e sabugo de milho. Nutricionalmente a agroindústria produz dois tipos de resíduos: os resíduos fibrosos (com elevada e baixa digestibilidade) e os farelos. Os resíduos fibrosos com alta digestibilidade, por exemplo, são a polpa cítrica, o farelo de milho (glúten), casca de soja e resíduos de cevada, e os resíduos com baixa digestibilidade, por exemplo, são o bagaço de cana-de-açúcar, cereais, milho, soja, farelo de algodão, casca de algodão, casca de amendoim e restos da colheita de grãos de forragem de gramíneas. Os farelos incluem o arroz, amendoim, soja e algodão (GRAMINHA et al., 2008).

Nos últimos anos, houve uma grande pressão política e social para reduzir a poluição que surge das atividades industriais. Quase todos os países desenvolvidos e subdesenvolvidos estão tentando adaptar esta realidade modificando seus processos, desde que seus resíduos possam ser reciclados. Conseqüentemente, muitas companhias de grande porte há muito tempo consideram os resíduos como um material bruto para vários processos (MUSSATTO et al., 2006).

A cevada é um resíduo abundante no Brasil e proveniente do processo de fabricação da cerveja e podem ser facilmente reciclados e reutilizados. O Brasil é o quarto maior país do mundo na produção de cerveja, produzindo aproximadamente 8,5 bilhões de litros por ano, perdendo apenas para o EUA (23 bilhões), China (18 bilhões), e Alemanha (10,5 bilhões). Em

2002 o Brasil gerou por volta de 1,7 bilhões de toneladas de resíduos sólidos resultantes do processo de fabricação da cerveja (MUSSATTO *et al.*, 2006).

O bagaço de cana-de-açúcar ou "bagaço" (composto aproximadamente por 32–40% celulose, 19–24% hemicelulose, 23–32% lignina e 1,5–5,0% de cinza) pode ser utilizado como fonte direta e indireta de produção de energia e como insumo ou matéria-prima. No primeiro caso refere-se ao seu uso como combustível em caldeiras para a geração de calor e energia elétrica, e no segundo, à produção de etanol celulósico ou de segunda geração. O bagaço pode ser utilizado como fonte de obtenção de fibra para polpa de celulose, papel e papelão, e ainda para fabricar componentes compensados, alimento animal, e produtos químicos (SILVA *et al.*, 2007; GOLDBERG *et al.*, 2008). Apesar das varias possibilidades de aproveitamento do bagaço, na maioria das vezes, parte dele não é aproveitado, sendo deixado em pilhas nos pátios das usinas. O desenvolvimento de tecnologia que permita utilizar o bagaço de cana-de-açúcar diminuirá o problema de descarte na indústria tornando o resíduo comercial (MARTÍN *et al.*, 2006).

Outro resíduo importante no Brasil, em termos do volume e composição, é o bagaço cítrico que consiste em casca, polpa e sementes de frutas, que correspondem à metade do peso fresco das mesmas. O Brasil processa aproximadamente 80 milhões de toneladas de laranja e limões anualmente e produzem 30–40 milhões de toneladas destes resíduos sólidos (GRAMINHA *et al.*, 2008), sendo o maior produtor e exportador mundial de suco de laranja e seus subprodutos, atendendo hoje 50% da demanda e 75% das transações internacionais, disputando com os Estados Unidos a hegemonia nesse mercado. O Estado de São Paulo concentra 80% da produção de frutas e 90% da capacidade de processamento (Fig. 5; Tabela 3) (ABECITRUS, 2008).

Apesar de o suco ser o principal produto da laranja, vários subprodutos com valor comercial é obtidos durante o seu processo de fabricação. Entre estes estão os óleos essenciais (óleos voláteis que são retirados da casca da laranja), limoneno (fração oleosa obtida da destilação dos resíduos úmidos da laranja) e o farelo de polpa cítrica (obtido por meio do tratamento de resíduos sólidos e líquidos remanescentes da extração do suco) (RODRIGUES, 2006). A casca da laranja é um dos resíduos mais valiosos de biomassa (LI *et al.*, 2008), porém sua disposição no ambiente está se tornando um grande problema econômico e ambiental para muitas fábricas, porque, além da falta de área para disposição destes resíduos, a presença de biomateriais na casca, tais como óleo, pectina e açúcar estimula as bactérias aeróbicas a decompor a matéria orgânica biodegradável em produtos como o dióxido de

carbono, nitrato, sulfatos e fosfatos, aumentando a poluição orgânica (PLESSAS *et al.*, 2007; YEOH *et al.*, 2008; EL NEMR *et al.*, 2009; LUGO-LUGO *et al.*, 2009).

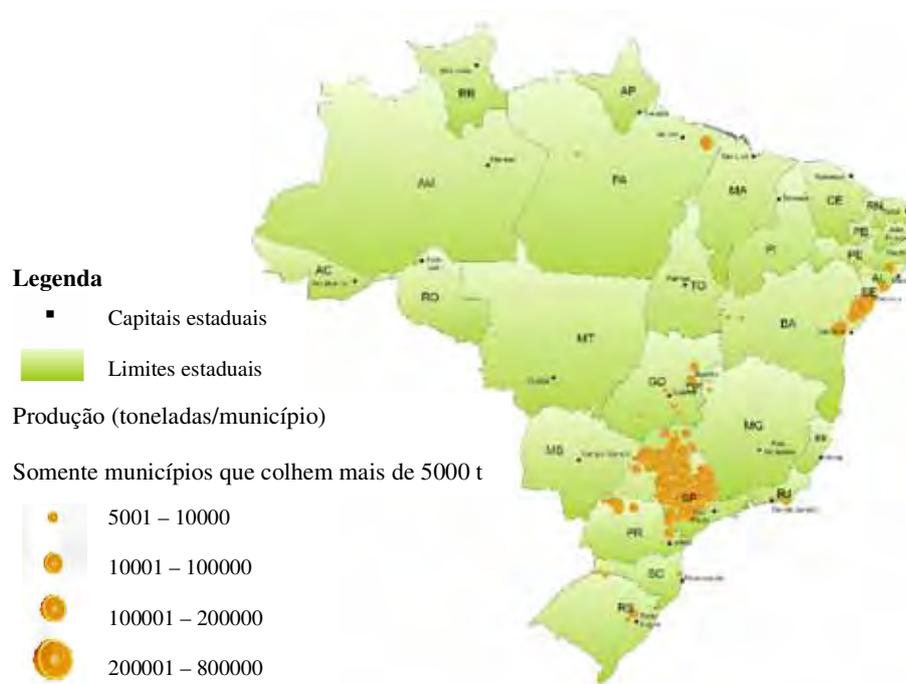


Figura 5- Produção Brasileira de laranja. O Estado de São Paulo concentra a maior produção de laranja do país (Fonte: Conab).

Tabela 3- Dados da produção de laranja no Estado de São Paulo (safra 2004/05 – 2005/06) e no Brasil (safra 2008 e 2009) em toneladas.

Região	Cultura		
	Laranja		
	2004/05	2005/06	Resíduos
SP	14716580,00	14365680,00	7270565,00

Região	Cultura		
	Laranja		
	2008	2009*	Resíduos
Brasil	18675805,00	18479518,00	9288830,50

Fonte: Abecitrus e IBGE. Dados coletados: março 2009.

*estimativa da produção de laranja para 2009.

Geralmente, as indústrias de sucos cítricos secam o resíduo e este é vendido como material bruto para a extração de pectina ou é peletizado para a alimentação animal, porém nenhuns destes processos são muito vantajosos, já que apenas uma pequena parte é destinada a alimentação animal. Deste modo, nas duas últimas décadas têm se aumentado o interesse pela pesquisa, com foco em desenvolver caminhos alternativos para utilizar os resíduos agrícolas e agroindustriais, para a produção de produtos com alto valor agregado como biogás, etanol, ácido cítrico, enzimas, compostos flavorizantes voláteis, ácidos graxos, vitaminas, biomassa microbiana, fertilizantes orgânicos, recuperação de constituintes fenólicos, recuperação e avaliação de hidrólise enzimática, etc (AGUIAR et al., 2008; MAMMA et al., 2008; PLESSAS et al., 2007; YEOH et al., 2008; WIKINS, 2008).

3. Objetivos

- Obtenção de preparado enzimático termoestável, com alta atividade de xilanase, pectinase e celulasas, a partir do cultivo de fungos filamentosos termofílicos por fermentação em estado sólido;

- uso de suplemento mineral comercial como meio de cultivo para os fungos na fermentação sólida;

- avaliar a estabilidade das enzimas frente às características do rúmen;

- hidrólise enzimática.

4. Material e Métodos

4.1. Microrganismos

Foram avaliadas quatro linhagens de fungos termofílicos sendo duas linhagens de zigomicetos *Rhizomucor pusillus* (13.36) e *Thermomucor indicae-seudaticae* (N31), e as outras duas linhagens de deuteromicetos *Thermomyces lanuginosus* TO-03 e ROB pertencentes ao Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada, UNESP/IBILCE. O *Thermomucor indicae-seudaticae* foi isolado de bagaço de cana, *R. pusillus* de solo de plantação de mandioca, *Thermomyces lanuginosus* TO-03 isolado de silagem de milho e *Thermomyces lanuginosus* ROB de madeira em decomposição. Os fungos são mantidos em meio Sabouraud, em temperatura ambiente, sob água e fina camada de óleo mineral e em tubos criogênicos a -20°C , em meio contendo glicerol a 20%.

4.2. Obtenção da enzima por fermentação em estado sólido (FES)

4.2.1. Substrato

Os substratos utilizados na fermentação foram:

1) Suplemento comercial (Bellpeso SV[®]) (B) que corresponde à mistura de 35% de farelo de algodão, 65% de polpa cítrica e suplementos minerais (Tabela 4) e 2) farelo de algodão e polpa cítrica (35% e 65%^{**}, respectivamente) (A), não contendo os sais minerais existentes no substrato B, para efeito de comparação dos resultados. O material foi seco a 60 °C até peso constante e posteriormente esterilizado em autoclave a 120 °C, por 20 minutos.

* Bellman Nutrição Animal Ltda.

** Mistura proporcional ao total de componentes do suplemento comercial em relação ao farelo e à polpa.

Tabela 4 – Composição do Bellpeso SV com relação a suplementos minerais (g/Kg ou mg/Kg).

Elemento	Quantidade (g/kg)
Cálcio	23
Fósforo	6
Magnésio	1
Enxofre	3
Sódio	13
	Quantidade (mg/Kg)
Cobre	39,83
Manganês	30
Zinco	148
Iodo	3
cobalto	2,4
Selênio	0,8
Flúor	60

4.2.2. Inóculo e condições de cultivo

A FES foi conduzida em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 5 g do substrato. O material foi inoculado com 5 mL de suspensão micelial, obtida a partir do cultivo dos fungos *Thermomucor indicae-seudaticae* e *Rhizomucor pusillus* por 4 dias em meio Sabouraud. Para as duas linhagens de *Thermomyces lanuginosus* a inoculação foi realizada com dois cortes de 1 cm² cada de cultura miceliada por 7 dias em meio PDA (Potato-Dextrose-Agar). Após a inoculação, 10 a 11 mL de solução nutriente (0,2% (NH₄)H₂PO₄ + (NH₄)₂HPO₄; 0,01% MgSO₄ x 7H₂O; 0,2% peptona; 0,05% solução micronutriente esterelizada (0,1% FeSO₄.7H₂O; 0,005% MnSO₄.H₂O; 0,02% ZnSO₄.7H₂O; 0,005% CaCl₂; 0,025% CuSO₄.5H₂O)) foram adicionados aos frascos até a obtenção de uma umidade de 70% em ambos os substratos. Essa umidade foi obtida a partir da análise de peso seco do farelo de algodão e polpa cítrica.

4.2.3. Extração da solução enzimática

A incubação foi feita a 45°C, durante 15 dias, e a 1ª amostra foi retirada em 24h e todas as outras a cada 48 horas, em duplicata. Após o período correspondente a cada amostra, foram adicionados 40 mL de água destilada ao material fermentado, sendo homogeneizado e posteriormente agitado por 30 minutos em shaker, a 100 rpm. O material foi então filtrado e centrifugado a 10000g durante 20 minutos, a 4°C, e o sobrenadante foi utilizado como solução enzimática bruta.

4.3. Determinação das atividades enzimáticas

4.3.1. Atividade de xilanase, Pectinase, CMCase, Avicelase e Amilase

A atividade da xilanase foi medida em mistura de reação contendo 0,1 mL do extrato enzimático bruto e 0,9 ml de uma solução de 0,5% de xilana em tampão acetato de sódio 0,1 M e pH 5,0. Após a incubação, feita em temperatura de 60 °C por 10 minutos, os açúcares redutores foram quantificados pelo método ADNS (3,5- ácido dinitrosalicílico) (MILLER, 1959). Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar um μmol de substância redutora por minuto nas condições de ensaio, utilizando curva padrão de xilose.

As atividades de CMCase, Avicelase, Amilase e Poligalacturonase foram determinadas pelo mesmo procedimento descrito para xilanase, exceto que os substratos utilizados foram carboximetilcelulose (CMC), avicel, amido solúvel e pectina de citros (contendo 79% de ácido galacturônico e 8% de metoxilação), respectivamente, e os açúcares redutores foram quantificados a partir da curva padrão de glicose (CMCase, avicelase e amilase) e de ácido D-galacturônico (poligalacturonase).

4.3.2. Atividades de ligninases

4.3.2.1. Manganês peroxidase

A atividade de Manganês peroxidase (Mn-P) na solução enzimática bruta foi determinada a 60°C numa mistura de reação composta de 0,8 mL de tampão lactato de sódio a 50mM (pH 4,5), 0,1 mL de solução de MnSO_4 a 0,4M e 0,1 mL da solução de enzima bruta. A reação foi iniciada com a adição de peróxido de hidrogênio (0,1mM) e a absorbância medida a 270nm e para zerar o espectrofotômetro foi utilizada água destilada (branco). Uma unidade de atividade de enzima (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para formar um μmol de Mn^{+3} por minuto, utilizando o coeficiente de extinção molar de $8,1 \times 10^3/\text{mol}/\text{cm}$ (GLENN *et al.*, 1986; AITKEN & IRVINE, 1990).

4.3.2.2. Lignina peroxidase

A atividade de Lignina peroxidase (LiP) na solução enzimática bruta foi determinada a 60°C numa mistura de reação composta de 0,8 mL de tampão tartarato de sódio a 0,05M (pH 3,0), 0,1 mL de solução de solução de álcool veratrílico a 40 mM e 0,1 mL da solução de enzima bruta. A reação foi iniciada com a adição de 20 μl de peróxido de hidrogênio (0,1 mM) e o aumento da absorbância, devido à oxidação do álcool veratrílico, medido a 310nm e para zerar o espectrofotômetro foi utilizada água destilada (branco). Uma unidade de atividade de enzima (U) é definida como a quantidade de enzima necessária para formar um μmol de veratraldeído por minuto, utilizando o coeficiente de extinção molar de $9,3 \times 10^3/\text{mol}/\text{cm}$ (TIEN & KIRK, 1988).

4.3.2.3. Lacase

A atividade de lacase foi determinada a 60°C usando 2,2'-azino-bis-etilbentiazolina (ABTS) como substrato, em mistura contendo 0,1 mL de tampão acetato de sódio 0,1M (pH 5,0), 0,8 mL de solução de ABTS a 0,03% (p/v) e 0,1 mL da solução enzimática bruta, a reação foi interrompida com 10µl de azida (BUSWELL *et al.*, 1995). A oxidação do ABTS foi medida pelo monitoramento do aumento da absorbância a 420 nm e para zerar o espectrofotômetro foi utilizada água destilada (branco). Uma unidade de atividade de enzima foi definida como a quantidade de enzima necessária para oxidar 1 µmol de ABTS por minuto, utilizando o coeficiente de extinção molar de $3,6 \times 10^4$ /mol/cm para o ABTS oxidado (BOURBONNAIS; & PAICE, 1988).

4.4. Outros métodos analíticos

4.4.1. Açúcares redutores totais

A determinação de açúcares redutores totais foi feita seguindo a metodologia de ADNS de MILLER (1959).

4.5. Caracterização físico-química das enzimas

4.5.1. Efeito do pH e temperatura sobre a atividade das enzimas

O comportamento da atividade das enzimas em função do pH foi estudado incubando-se a solução enzimática e substrato em tampões acetato 0,1M (pH 3,5 a 5,5), citrato-NaOH 0,1M (pH 5,5 a 7,0), tris-HCl 0,1M (pH 7,0 a 8,5) e glicina-NaOH 0,1M (pH 8,5 a 10,5), sendo dosada a atividade a 60 °C.

O tampão Tris tem um Δ de -0,028, o que significa que quando a temperatura de incubação aumenta o pH diminui e quando a temperatura diminui o pH aumenta, devido a isto, deve-se somar ou subtrair 0,028 ao pH desejado a cada grau aumentado ou diminuído na temperatura, respectivamente ($1^{\circ}\text{C} = 0,028$).

O efeito da temperatura sobre a atividade enzimática foi avaliado incubando-se a mistura de reação em temperaturas de 40 a 80°C, no pH determinado como ótimo.

4.5.2. Determinação da estabilidade das enzimas frente às variações de pH e temperatura

A enzima foi mantida por uma hora, em ausência de substrato, em temperaturas de 10 a 90°C. Após esse período, foram tomadas amostras para ensaiar a atividade enzimática, nas condições de pH e temperatura ótima. Foi também avaliada a estabilidade da enzima na temperatura de 39°C que é a temperatura do rúmen e a 60°C devido às enzimas estudadas serem termofílicas, em períodos de 1 a 8 horas.

A estabilidade em diferentes valores de pH foi avaliada incubando-as em tampões 0,1M com pH variando de 2,5 a 10,5, em ausência de substrato, a 25°C, por 24 horas. Após esse período, foram tomadas amostras para ensaiar a atividade enzimática, nas condições de pH e temperatura determinados como ótimos para a atividade das enzimas.

4.5.3. Tempo de armazenamento dos extratos enzimáticos

As soluções enzimáticas obtidas pelo cultivo dos fungos em FES foram armazenadas durante 10 semanas a 25°C, 7°C e -20°C. As soluções enzimáticas foram colocadas em tubos com rosca e vedados com parafilm para evitar qualquer tipo de contaminação. A cada semana foram realizadas reações enzimáticas para determinar a estabilidade da enzima durante a estocagem.

4.5.4. Avaliação da estabilidade das enzimas em fluido ruminal

Os extratos enzimáticos produzidos pelos fungos *Thermomyces lanuginosus* TO-03 e ROB e *Thermomucor indiciae-seudaticae*, apresentando alta atividade de xilanase e pectinase, foram avaliados quanto à sua estabilidade frente ao fluido ruminal, em pH 6,5 e temperatura de 39°C. As amostras foram retiradas em 0 minuto, 1, 2, 4, 6, 8, 12 e 24 horas, para que as atividades enzimáticas pudessem ser avaliadas. A coleta da ingesta (fluido ruminal) foi realizada em um garrote cruzado fistulado pertencente ao grupo de pesquisa que está alocado 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 (1:1mL) da seguinte forma:

- 1) fluido ruminal + extrato enzimático;
- 2) fluido ruminal + água destilada;
- 3) extrato enzimático + solução de saliva artificial (McDougall, 1948).

O tampão McDougall é composto por 9,8g/l NaHCO₃, 7g/l Na₂HPO₄.7H₂O, 0,57g/l KCl, 0,47g/l NaCl, 0,12g/l MgSO₄.7H₂O, 0,04g/l CaCl₂ e uma solução de 55g/l de uréia e glicose.

4.6. Hidrólise enzimática do capim *Brachiaria decumbens*

A capacidade da solução enzimática de hidrolisar o capim *Brachiaria decumbens* foi avaliada. Foi utilizada solução enzimática bruta obtida por FES utilizando os fungos *Thermomyces lanuginosus* TO-03 e ROB e *Thermomucor indiciae-seudaticae* após 168 horas de cultivo. Este tempo foi escolhido, pois os extratos apresentaram boa atividade enzimática de xilanase e pectinase respectivamente.

A hidrólise enzimática foi realizada em mini-tubos de ensaio (50 mm X 30 mm) vedados com rolha de borracha. Foram utilizados 0,2g de capim e 3 mL de extrato enzimático bruto para envolver completamente a superfície do capim. Os tubos foram mantidos em banho-maria a 40°C, sob leve agitação e foram retiradas amostras nos tempos de 0 minuto

(controle), 1, 3, 6 e 8 horas. Os mini-tubos de hidrólise foram enumerados de 1 a 3, consistindo em:

- 1) Capim+água destilada (controle – tempo 0)
- 2) Capim+solução enzimática bruta
- 3) Solução enzimática

O capim não foi submetido a nenhum pré-tratamento, este foi apenas lavado com água corrente e seco a 50°C.

5. Resultados e Discussão

5.1. Perfil enzimático produzido pelos fungos nos diferentes substratos

Como mostra a Figura 6 a maior produção de poligalacturonase (PG) pelo fungo *Thermomucor indicae-seudaticae* (N31) (421,31 U/g) foi observada pelo cultivo em substrato A, em 168h. A produção da enzima por esta linhagem, pelo cultivo em substrato B, foi consideravelmente menor (78,75 U/g em 168h) (Fig. 7). Em relação à *Rhizomucor pusillus* a produção de PG no substrato A (98,39 U/g), em 216h foi significativamente maior do que a obtida no substrato B (4,74 U/g). As duas linhagens de *Thermomyces lanuginosus* não foram boas produtoras de poligalacturonase, quando comparadas com os dois fungos citados acima, produzindo o TO-03 e ROB no substrato A 1,72 U/g (168h) e 12,82 U/g (264h) e, no substrato B 3,52 U/g (216h) e 5,02 U/g (264h), respectivamente (Tabela 5).

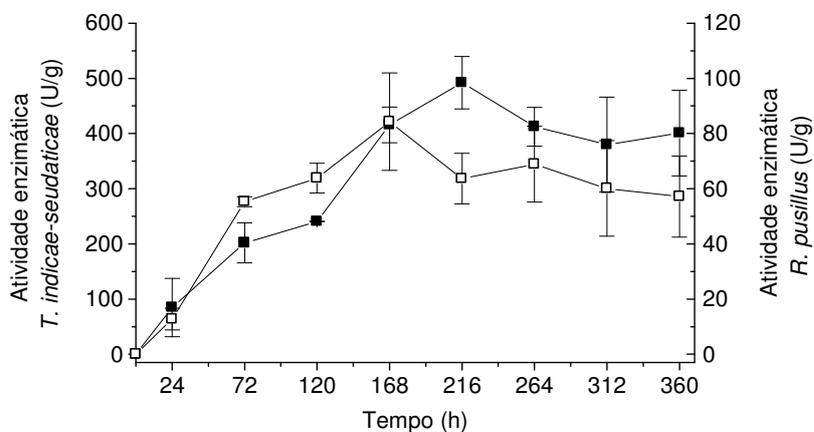


Figura 6- Produção de poligalacturonase (PG) pelos fungos *Thermomucor indicae-seudaticae* -□- e *Rhizomucor pusillus* -■-, em FES, em substrato A.

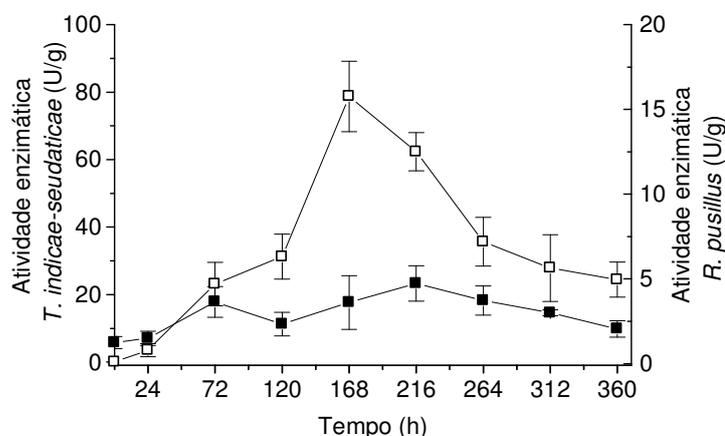


Figura 7- Produção de poligalacturonase (PG) pelos fungos *Thermomucor indicae-seudaticae*-□- e *Rhizomucor pusillus* -■-, em FES, em substrato B.

Martin (2006) avaliou algumas espécies quanto à produção de pectinase e observou que a linhagem que mais produziu foi a do presente trabalho, o *T. indicae-seudaticae*, 82 U/g em 24h de fermentação, porém o meio era composto por 50% farelo de trigo e 50% casca de laranja lavada. Barros (2007) utilizando o mesmo fungo obteve dois picos de produção de pectinase um em 120h (228,96 U/g) e outro em 312h (218,40 U/g), utilizando farelo de trigo e pellet de laranja (2:1) como substrato para FES. Com o exposto, pode-se observar que o *T. indicae-seudaticae* é ótimo produtor de pectinase.

Sonia e colaboradores (2005) obtiveram uma produção máxima de pectinase por *Thermomyces lanuginosus* em palha de sorgo de 68 U/g, enquanto que a produção máxima de pectinase por este mesmo fungo em farelo de algodão e polpa cítrica estudados nesse trabalho foi de 12,82 U/g, o que implica em uma baixa produção quando comparado com os resultados do autor citado acima.

Os fungos *T. indicae seudaticae* e *R. pusillus* estudados neste trabalho não produziram xilanase em ambos os substratos. Porém, as linhagens de *T. lanuginosus* (TO-03 e ROB) apresentaram elevada produção de xilanase, com picos de produção de 644,30 U/g (168h) e 865,15 U/g (168h) para TO-03 e ROB, respectivamente no substrato A (Fig. 8). Em relação ao substrato B, TO-03 apresentou o máximo de sua produção de 477,99 U/g (168h) e ROB de 296,25 U/g (216h) (Fig. 9; Tab. 5), subentende-se o substrato A como sendo o melhor para a produção de xilanase, por ambos os fungos. Esses dados são bastante animadores se comparados com outros descritos na literatura (MAMMA et al., 2008; YANG et al., 2001), embora quantidades muito maiores de xilanase tenham sido obtidas por alguns autores (BADHAN, et al., 2007; KANG et al., 2004; KHANDEPARKAR & BHOSLE, 2006).

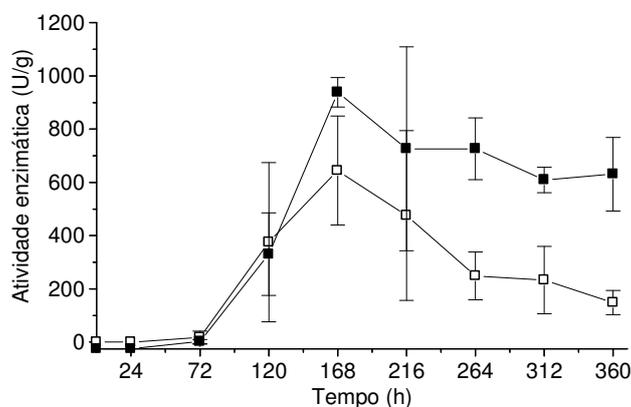


Figura 8- Produção de xilanase pelas linhagens de *Thermomyces lanuginosus* TO-03 -□- e ROB -■-, por FES, em substrato A.

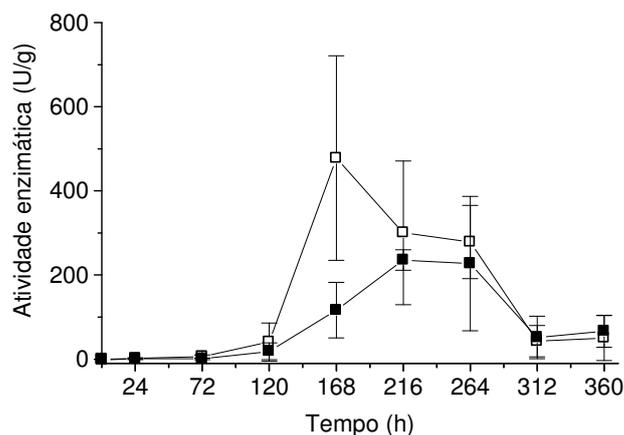


Figura 9- Produção de xilanase pelas linhagens de *Thermomyces lanuginosus* TO-03 -□- e ROB -■-, por FES, em substrato B.

Resultados inferiores aos apresentados neste trabalho foram encontrados por Purchat e colaboradores (1999) que avaliaram 17 linhagens de *T. lanuginosus* em diferentes meios, sendo a melhor produção (8,0-12 U/g) em sabugo de milho como substrato. Sonia e colaboradores (2005) obtiveram 48 U/g com palha de sorgo com o mesmo fungo. Barros (2007) obteve 36U/g em 24h de fermentação utilizando como substrato a cevada não lavada.

Christopher e colaboradores (2005) testaram oito linhagens de *T. lanuginosus* e observaram habilidades diferentes para a produção de xilanase em FES. A maior atividade foi detectada pela cepa ATCC 46882, que foi de 5098,0 U/g, em bagaço de cana, o que mostra o grande potencial deste fungo para produção de enzimas xilanolíticas.

Os resultados do presente estudo sugerem a viabilidade da utilização de *T. lanuginosus* (ambas as linhagens) para a produção de enzimas fibrolíticas para uso em nutrição animal. Estas e outras aplicações de compostos enzimáticos na agroindústria de forma geral poderão maximizar a produção dos mais variados produtos a serem comercializados.

Existem poucos trabalhos disponíveis que relatam a produção de pectinases e xilanases termoestáveis por fungos termofílicos (ADAMS & DEPLOYEY, 1978; HENRIKSSON *et al.*, 1999; PURCHAT *et al.*, 1999; SATHISH KUMAR & PALANIVELU, 1999; TUNCER *et al.*, 1999; NARANG *et al.*, 2000; SINGH *et al.*, 2000; MARTINS *et al.*, 2002; KAUR *et al.*, 2004; MILAGRES *et al.*, 2004; PHUTELA *et al.*, 2005; SONIA *et al.*, 2005; YANG *et al.*, 2006; AZIN *et al.*, 2007; ; KATAPODIS *et al.*, 2007; GUERFALI *et al.*, 2008; KATAPODIS & CHRISTAKOPOULOS, 2008; KOULI *et al.*, 2008; MANDALARI *et al.*, 2008; MESHAN *et al.*, 2008).

As quatro linhagens de fungos estudadas neste trabalho mostraram ser boas produtoras de amilase em ambos os substratos, porém no substrato A, a produção foi consideravelmente maior. O *Rhizomucor pusillus* apresentou pico de produção de 140,98 U/g em 72h, e o *T. indicae-seudaticae* de 55,48 U/g em 168h, no substrato A (Fig. 10).

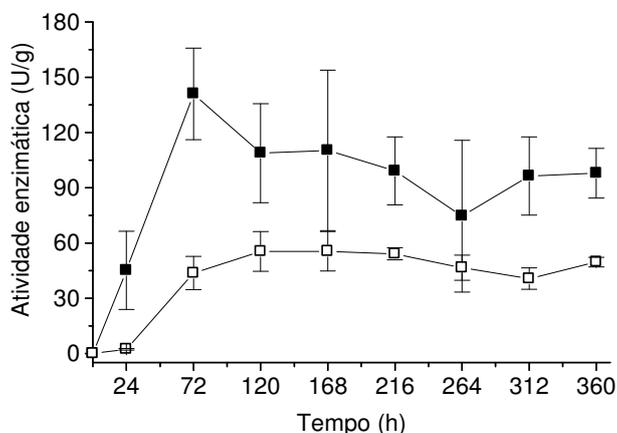


Figura 10- Produção de amilase pelos fungos *Rhizomucor pusillus* -■- e *Thermomucor indicae-seudaticae* -□-, por FES, em substrato A.

No entanto, as linhagens de *T. lanuginosus* apresentaram produções mais elevadas de amilase em relação aos fungos citados acima. O TO-03 obteve uma produção de 338,62 U/g, em 168h e ROB 422,18 U/g em 312h (Fig. 11). Kunamneni e colaboradores (2006) trabalharam com o mesmo fungo e obtiveram uma produção máxima de 534 U/g em farelo de

trigo sob condições ótimas de incubação no período de 120h. Com isso podemos inferir que as linhagens de *T. lanuginosus* são boas produtoras de amilase em diversos substratos.

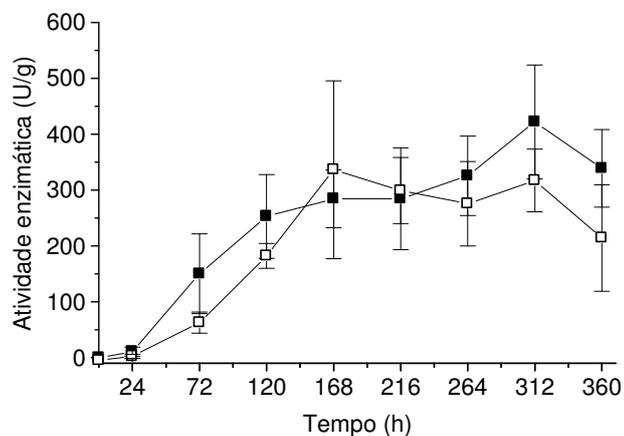


Figura 11- Produção de amilase pelos fungos *Thermomyces lanuginosus* TO-03 -□- e ROB -■-, por FES, em substrato A.

Com relação ao substrato B, a produção de amilase pelos fungos estudados neste trabalho foi menor, porém bastante significativas. A produção máxima de amilase pelo fungo *R. pusillus* foi de 86,72 U/g, em 216h, o *T. indicae-seudaticae* 44,07 U/g, em 120h, o TO-03 188,56 U/g, em 216h e o ROB 207,76 U/g em 168h de incubação (Fig. 12 e 13).

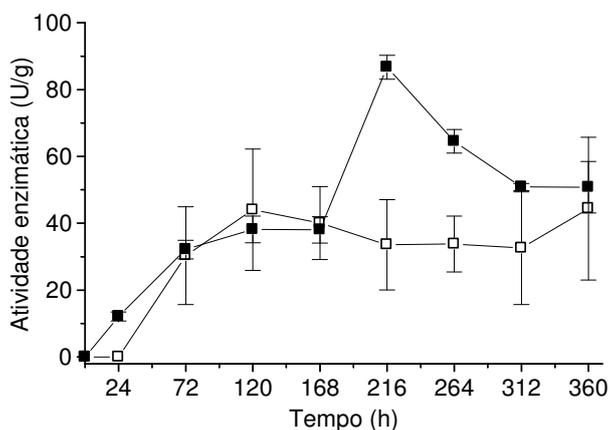


Figura 12- Produção de amilase pelos fungos *Rhizomucor pusillus* -■- e *Thermomucor indicae-seudaticae* -□-, por FES, em substrato B.

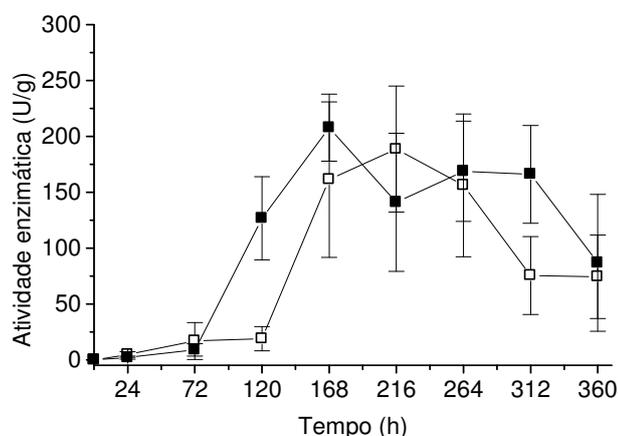


Figura 13 - Produção de amilase pelos fungos *Thermomyces lanuginosus* TO-03 -□- e ROB -■-, por FES, em substrato B.

As enzimas CMCCase e avicelase foram produzidas somente no substrato A e pelos fungos *R. pusillus* e *T. lanuginosus* (ROB). A produção máxima de CMCCase e avicelase pelo *R.pusillus* foi de 6,44 U/g em 264h e 5,21 U/g em 312h, respectivamente (Fig. 14 e 15, Tab. 6). Barros (2007) utilizando o fungo *R. pusillus* obteve uma produção ainda menor de CMCCase 3,76 U/g em 168h de cultivo, utilizando cevada não lavada como substrato para FES.

O fungo *T. lanuginosus* (ROB) apresentou pico de produção de CMCCase de 7,40 U/g em 312h e de avicelase de 5,61 U/g em 216h.

Comparando os resultados do presente trabalho pode-se dizer que ambos os fungos apresentaram baixa produção de celulasas e que a produção máxima de avicelase por eles foi praticamente à mesma (Fig. 14 e 15; Tab. 6).

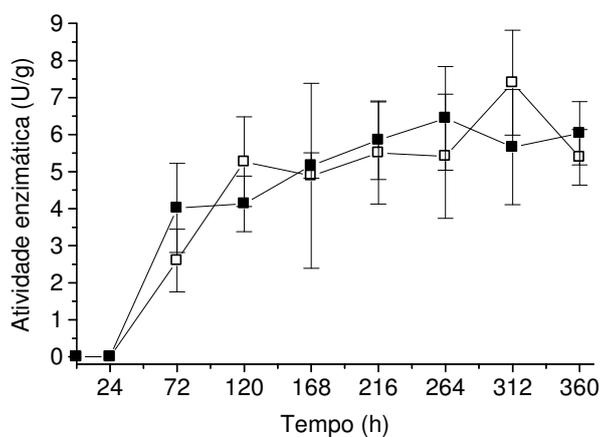


Figura 14- Produção de CMCCase pelos fungos *Rhizomucor pusillus* -■- , *Thermomyces lanuginosus* ROB -□-, por FES, em substrato A.

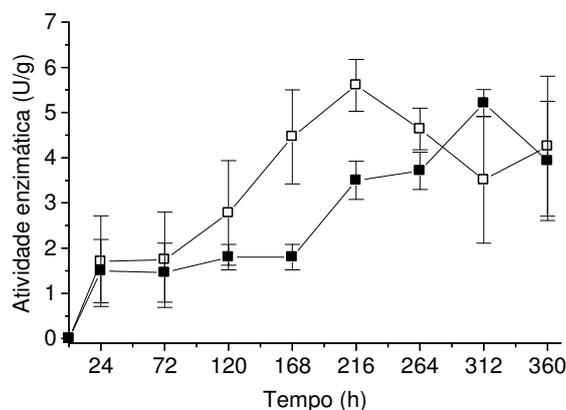


Figura 15- Produção de Avicelase pelos fungos *Rhizomucor pusillus* -■-, *Thermomyces lanuginosus* ROB-□-, por FES, em substrato A.

As Tabelas 5 e 6 ilustram resumidamente os picos de produção das enzimas poligalacturonase (PG), xilanase, amilase, CMCase e avicelase, obtidas da FES pelas quatro linhagens de fungos avaliados (*Rhizomucor pusillus* (13.36); *Thermomucor indiciae-seudaticae* (N31) e *Thermomyces lanuginosus* (TO-03 e ROB)), nos diferentes substratos e tempos de fermentação.

Observa-se nos resultados obtidos neste trabalho que os maiores picos de produção das enzimas se deram no substrato A, o que implica que algum elemento da composição do substrato B (pág. 23) está reprimindo a ação das enzimas (Tabela 5 e 6). Porém, quais dos elementos estariam envolvidos nesta repressão não foram estudados neste experimento, mas há indícios de que os íons iodo e flúor sejam os principais inibidores, já que estes não fazem parte da solução nutriente adicionada ao substrato A e, portanto não estão presentes na sua composição.

A produção e secreção das enzimas dependem de muitos fatores que estejam relacionados principalmente ao papel fisiológico do microrganismo. Em geral, as enzimas extracelulares 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).

Tabela 5- Produção máxima de Poligalacturonase (PG), amilase, xilanase (U/g) pelas 4 linhagens de fungos testadas.

Linhagens	Substratos	Enzimas	Tempo (h)	U/g (média)
<i>R. pusillus</i>	A	PG	216	98,39
		Amilase	72	140,98
		Xilanase	ND*	ND
	B	PG	216	4,74
		Amilase	216	86,72
		Xilanase	ND	ND
<i>T. indicae-seudaticae</i>	A	PG	168	421,31
		Amilase	168	55,48
		Xilanase	ND	ND
	B	PG	168	78,75
		Amilase	120	44,07
		Xilanase	ND	ND
<i>T. lanuginosus</i> (TO-03)	A	PG	168	1,72
		Amilase	168	338,62
		Xilanase	168	644,30
	B	PG	216	3,52
		Amilase	216	188,56
		Xilanase	168	477,99
<i>T. lanuginosus</i> (ROB)	A	PG	264	12,82
		Amilase	312	422,18
		Xilanase	168	865,15
	B	PG	264	5,02
		Amilase	168	207,76
		Xilanase	216	296,25

*ND – nada determinado

Tabela 6 - Produção máxima de CMCase e Avicelase (U/g) pelos fungos *Rhizomucor pusillus* e *Thermomyces lanuginosus* (ROB) testadas.

Linhagens	Substrato	Enzimas	Tempo(h)	U/g (média)
<i>R. pusillus</i>	A	CMCase	264	6,44
		Avicelase	312	5,21
<i>T. lanuginosus</i> (ROB)	A	CMCase	312	7,40
		Avicelase	216	5,61

5.1.1. Perfil de teor de açúcar redutor total durante o período de cultivo dos fungos

Os açúcares redutores totais foram quantificados ao longo do período de cultivo com o intuito de observar, se as linhagens fúngicas estudadas neste trabalho estavam utilizando além da glicose outras fontes de carbono e energia.

Os resultados mostraram que a quantidade de açúcar redutor total do meio permaneceu estável ao longo do período de cultivo em ambos os substratos (Fig.16), o que significa que este açúcar foi imediatamente consumido e que outras fontes de carbono e energia foram utilizadas para que as enzimas dos respectivos fungos fossem sintetizadas.

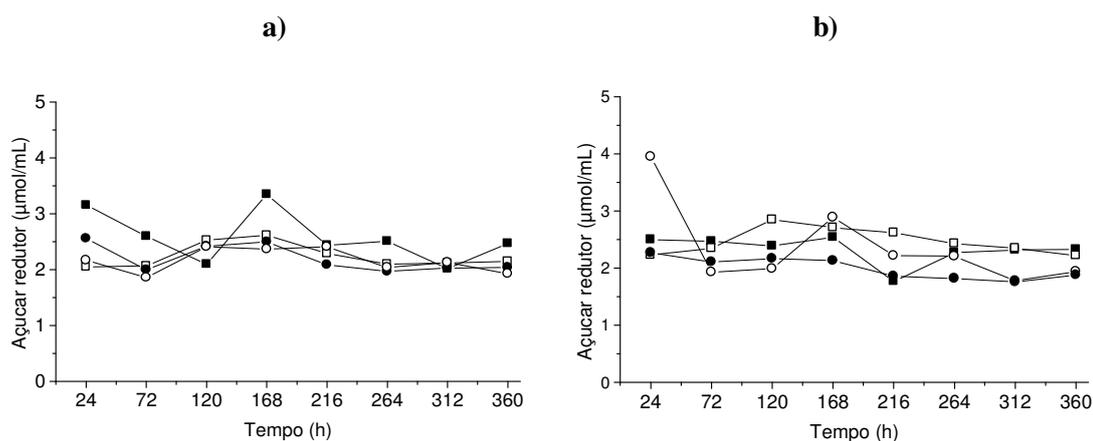


Figura 16– Teor de açúcares redutores ($\mu\text{mol/mL}$ de extrato bruto) ao longo das fermentações. *R. pusillus* -■-; *T. indicae-seudaticae* -□-; *T. lanuginosus* TO-03 -○-; *T. lanuginosus* ROB -●-; a) substrato A e b) substrato B.

5.1.2. Estudo da variação do pH ao longo das fermentações

O pH das fermentações foi mensurado em todos os tempos de extração enzimática, até 360 horas, para cada linhagem fúngica.

A Figura 17 mostra que durante o processo de fermentação houve uma variação de pH dos extratos enzimáticos obtidos entre os fungos ao longo do período fermentativo em ambos os substratos, começando com pH 5,0 em seguida aumentando para 6,5 ou 6,8 (a partir de 120h), e por fim decaindo para 6,0 e 5,5 (360h).

Comparando-se o gráfico de pH (Fig. 17) com os de produção das enzimas (tópico 5.1), pode-se observar que a medida que o pH aumentou ou diminuiu a produção das enzimas pelos fungos estudados neste trabalho também aumentou ou diminuiu. Isso é ocasionado devido o pH afetar os processos de fermentação, uma vez que ele pode alterar as substâncias químicas do meio de cultivo, ionizar moléculas polares, afetar reações enzimáticas e afetar o processamento pós traducional de enzimas. O pH do meio de cultivo pode influenciar o crescimento microbiano, e induzir expressões de genes que resultam em mudanças de fenótipo, tais como, mudanças morfológicas, fisiológicas ou como expressão de enzimas. A limitação do crescimento tem sido associada com a redução da produção e/ou atividade de enzimas extracelulares (MADIGAN *et al.*, 2004).

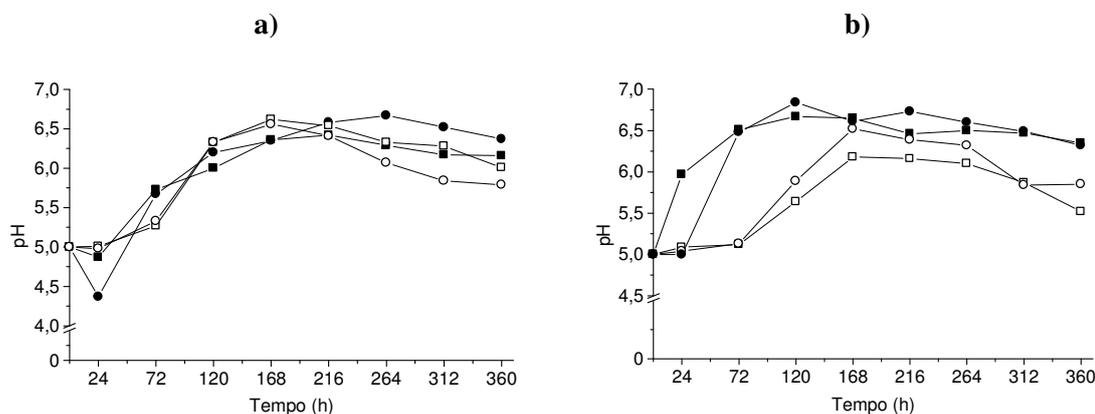


Figura 17 - Valores de pH do meio de cultivo ao longo das fermentações dos fungos avaliados *R. pusillus* -■-; *T. indicae-seudaticae* -●-; *T. lanuginosus* TO-03 -○-; *T. lanuginosus* ROB -□-; a) substrato A e b) substrato B.

5.2. Caracterização bioquímica da poligalacturonase produzida pelo fungo termofílico *Thermomucor indicae-seudaticae*

Os testes para a caracterização bioquímica da PG foram realizados utilizando-se solução enzimática bruta obtida pelo cultivo do fungo *Thermomucor indicae-seudaticae* nos substratos A e B, em 168 horas de fermentação. Foi utilizado este tempo de fermentação, devido à enzima ter apresentado maior atividade enzimática em relação aos outros tempos fermentativos.

Com relação à influência de pH e temperatura na atividade da PG do *T. indicae-seudaticae* (N31) em diferentes tampões, nota-se que houve uma melhor atividade em pH 4,5 (Fig. 18a e 19a) e temperatura ótima de 55°C (Fig. 18b e 19b) em ambos os substratos.

Após a determinação do pH e temperatura ótima de atividade da PG, foram feitos testes para se determinar a estabilidade frente as variações de pH e temperatura, quando em ausência de substrato.

A PG produzida pelo microrganismo *T. indicae-seudaticae* em ambos os substratos, mostrou-se 100% estável entre o pH 6,5 a 7,5 (Fig. 18c e 19c) e manteve 70% de sua estabilidade após 1 hora a temperatura de 40°C (Fig. 18d e 19d).

Resultados muito semelhantes aos encontrados neste trabalho foram obtidos por Martin (2006) que utilizando o mesmo fungo (*T. indicae-seudaticae*) obteve pH 4,0 e temperatura ótima entre 55 e 60°C. A PG manteve 100% da sua atividade original após ser mantida por 1 hora nas temperaturas de 25 e 30°C.

Martins e colaboradores (2002) produziram poligalacturonase (PG) por *T. aurantiacus* 179-5 utilizando fermentação em estado sólido com bagaço de laranja, bagaço de cana de açúcar e farelo de trigo como fonte de carbono a qual mostrou atividade máxima em pH 5,0 e temperatura de 65°C. Esta foi estável na faixa de pH ácida a neutra e a 60°C por 1 h.

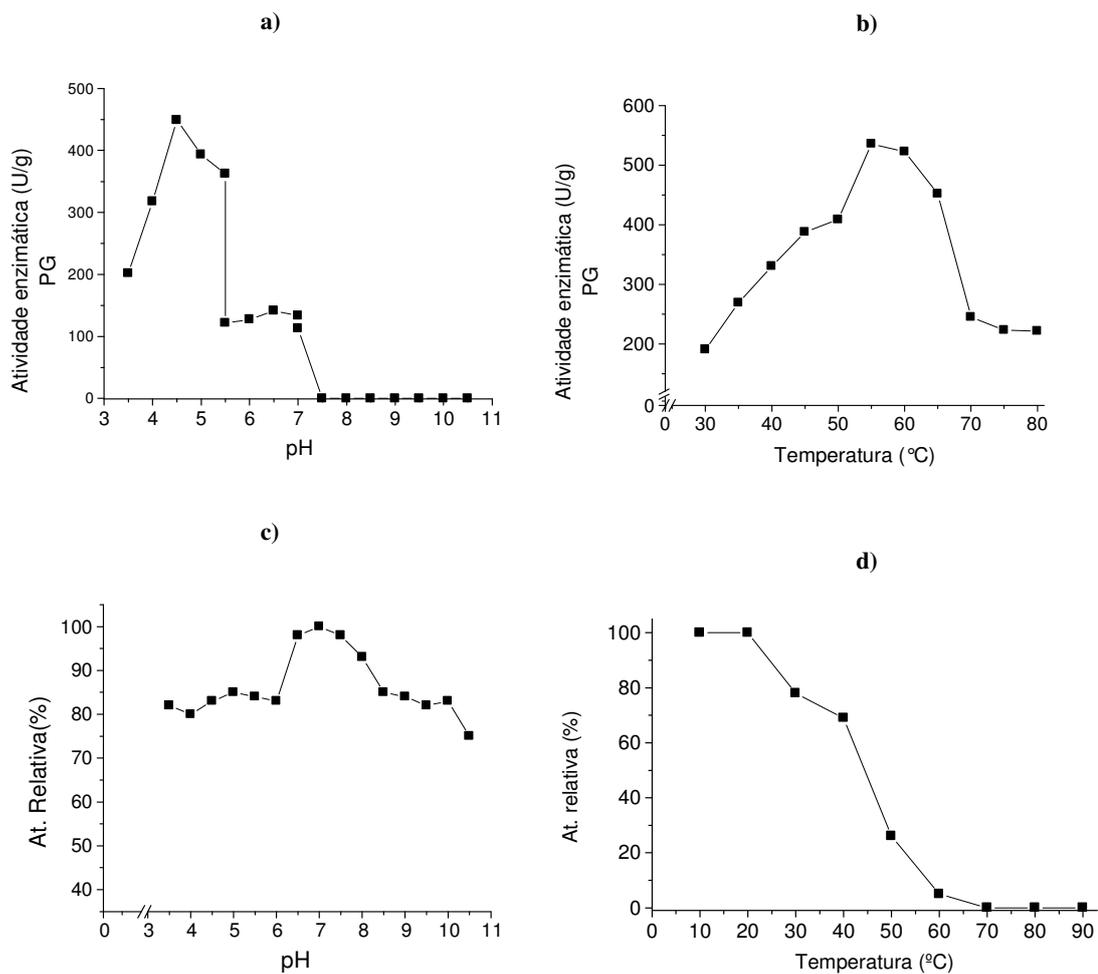


Figura 18- Caracterização físico-química da poligalacturonase (PG) produzida pelo *Thermomucor indicae-seudaticae* (N31) em FES, utilizando substrato A. Tampões: acetato-NaOH 3,5 a 5,5; citrato-NaOH 5,5 a 7,0; Tris- HCl 7,0 a 8,5; Glicina-NaOH 8,5 a 10,5. **a)** efeito do pH sobre a atividade de PG; **b)** efeito da temperatura sobre a atividade enzimática; **c)** estabilidade da PG em ausência de substrato, frente à variação de pH; **d)** estabilidade da mesma, em ausência de substrato, frente à variação de temperatura. -■- PG

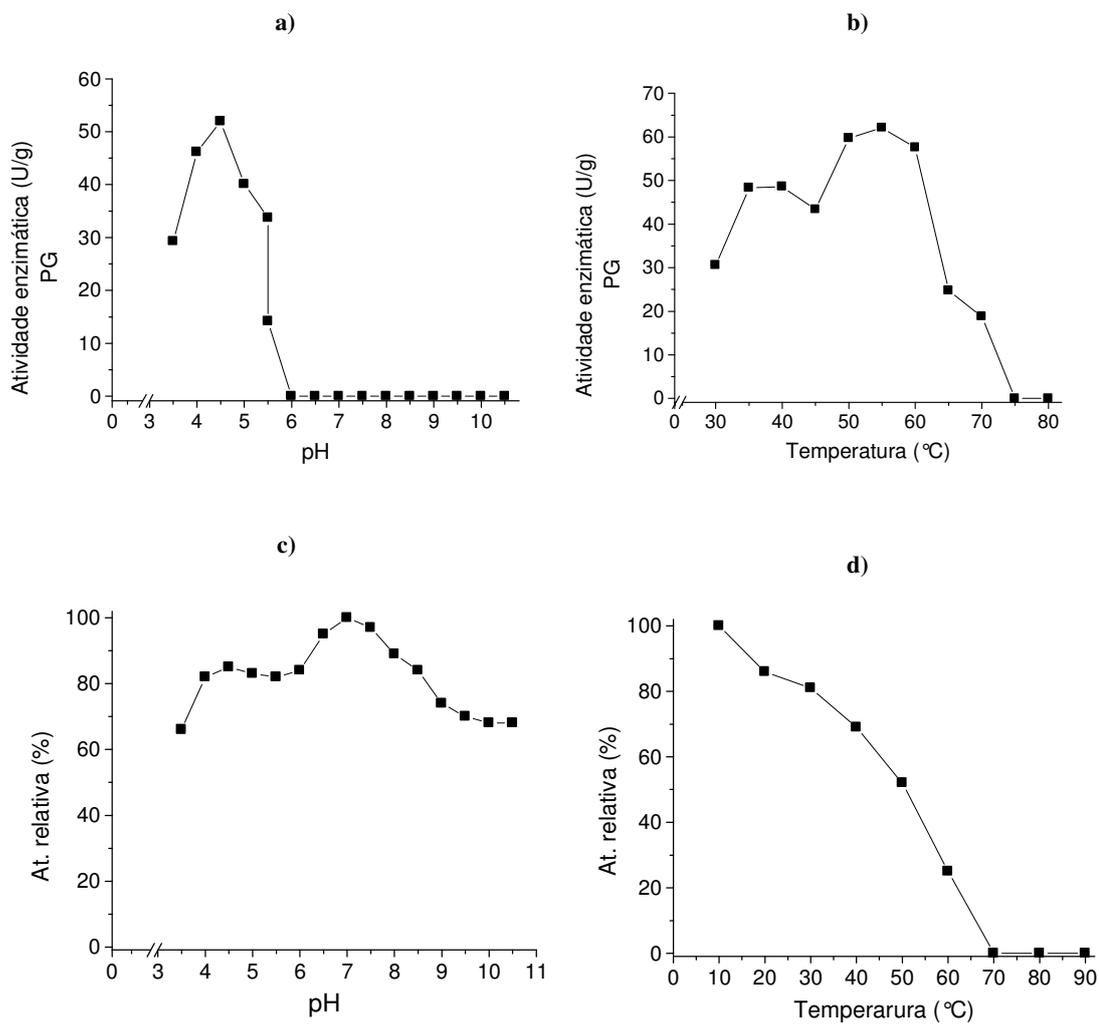


Figura 19- Caracterização físico-química da poligalacturonase (PG) produzida pelo *Thermomucor indicae-seudaticae* (N31) em FES, utilizando substrato B. Tampões: acetato-NaOH 3,5 a 5,5; citrato-NaOH 5,5 a 7,0; Tris- HCl 7,0 a 8,5; Glicina-NaOH 8,5 a 10,5. **a)** efeito do pH sobre a atividade de PG; **b)** efeito da temperatura sobre a atividade enzimática; **c)** estabilidade da PG em ausência de substrato, frente à variação de pH; **d)** estabilidade da mesma, em ausência de substrato, frente à variação de temperatura. -■- PG

5.2.1. Estabilidade da PG nas temperaturas de 39°C e 60°C por 8 horas

Foi avaliada a estabilidade da PG produzida pelo *T. indicae-seudaticae* na temperatura de 39°C (temperatura do rúmen) e a 60°C, em períodos de 1 a 8 horas, em ambos os substratos.

Quando mantida a 39°C por 4h a atividade original de PG foi preservada em 65%, enquanto que a 60°C foi significativamente baixa (6%), isso se tratando do substrato A (Fig. 20a). Com relação ao substrato B, a 39°C a PG manteve 57% da sua atividade após 4h de incubação e a 60°C a atividade foi nula (Fig. 20b). Estes resultados mostram que a PG produzida pelo *T. indicae-seudaticae* mesmo sendo termofílica é mais estável por um período maior de tempo a temperaturas menores (39°C) do que a temperaturas elevadas (60°C).

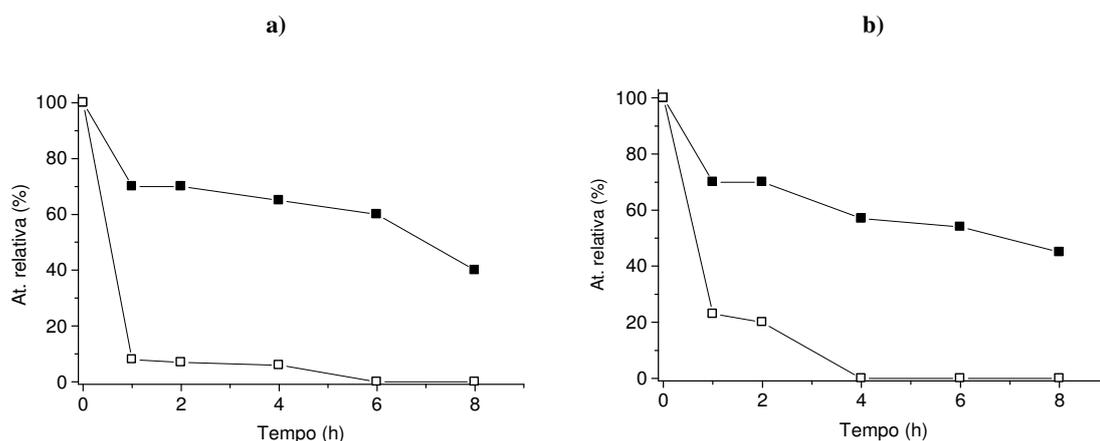


Figura 20- Estabilidade de PG produzida por *Thermomucor indicae-seudaticae* (N31) nas temperaturas de 39 e 60°C, em períodos de 1 a 8 horas; 39°C -■- e 60°C -□-; a) substrato A e b) substrato B.

5.3. Caracterização bioquímica das xilanases produzidas pelas duas linhagens de *Thermomyces lanuginosus*

Foram caracterizadas físico-quimicamente as xilanases provenientes dos fungos termofílicos *T. lanuginosus* (TO-03 e ROB).

Os testes para a caracterização bioquímica das xilanases foram realizados utilizando-se solução enzimática bruta obtida pelo cultivo dos fungos nos substratos A e B, em 168 horas

de fermentação, com exceção da linhagem de *T. lanuginosus* (ROB) cultivada no substrato B que teve pico de produção em 216h. Foram utilizados estes tempos de fermentação, devido às enzimas terem apresentado maior atividade enzimática em relação aos outros tempos fermentativos.

A xilanase produzida pelos fungos *T. lanuginosus* TO-03 e ROB, por FES em ambos os substratos, apresentaram pH de 6,5 e temperatura ótima de 70°C, exceto ROB que apresentou temperatura ótima de 65°C no substrato B (Fig. 21a, 21b, 22a, 22b, 23a, 23b, 24a e 24b).

Após a determinação do pH e temperatura ótima de atividade da xilanase, foram feitos testes para se determinar a estabilidade frente as variações de pH e temperatura, quando em ausência de substrato.

As xilanases das duas linhagens de *T. lanuginosus* tiveram uma pequena variação quanto a estabilidade de pH em ambos os substratos. As enzimas do TO-03 e ROB proveniente do substrato A, manteve-se estável do pH 4,5 a 9,5 e do pH 4,0 a 8,0, respectivamente (Fig. 21c e 23c). Em relação ao substrato B, a xilanase do TO-03 manteve-se estável do pH 5,0 a 9,5 e ROB manteve-se 100% estável do pH 7,0 a 9,5 (Fig. 22c e 24c).

Quanto à temperatura de estabilidade, os fungos apresentaram comportamento semelhante. As enzimas do TO-03 e ROB proveniente do substrato A e B, manteve-se 100% estável após 1h a temperatura de 40°C, com exceção da xilanase produzida pelo ROB no substrato A, que foi 100% estável após 1h a 60°C (Fig. 21d, 22d, 23d e 24d).

Resultados semelhantes a estes foram descritos por Ziaie-Shirkolae e colaboradores (2008), que obtiveram pelo mesmo fungo, o *T. lanuginosus* pH de 6,5 e temperatura ótima de 70°C, com uma produção de xilanase de 1600U/mL, esta enzima ainda manteve-se estável em uma ampla faixa de pH de 6,5 a 12.

Topakas e colaboradores (2003), descreveram uma xilanase produzida por *Sporotrichum thermophile* com pH ótimo de 5,0 e temperatura ótima de 70°C, esta enzima manteve-se estável entre o pH 6,0 e 9,0 a 4°C por uma hora, mas nas mesmas condições, a estabilidade acima de pH 10,0 – 11,0 foi de apenas 75%-64%. Em pH 5,0, a enzima foi estável a 40-50°C por pelo menos uma hora, e perdeu 33% de sua atividade original em 60 minutos a 60°C.

Comparando-se o pH ótimo da xilanase (6,5) estudada neste trabalho com o pH do rúmen que é por volta de 6,0 e 6,5 dependendo da dieta, pode-se dizer que estas enzimas teriam sua atividade aumentada frente as condições do rúmen, o que melhoraria ainda mais a digestibilidade da fibra.

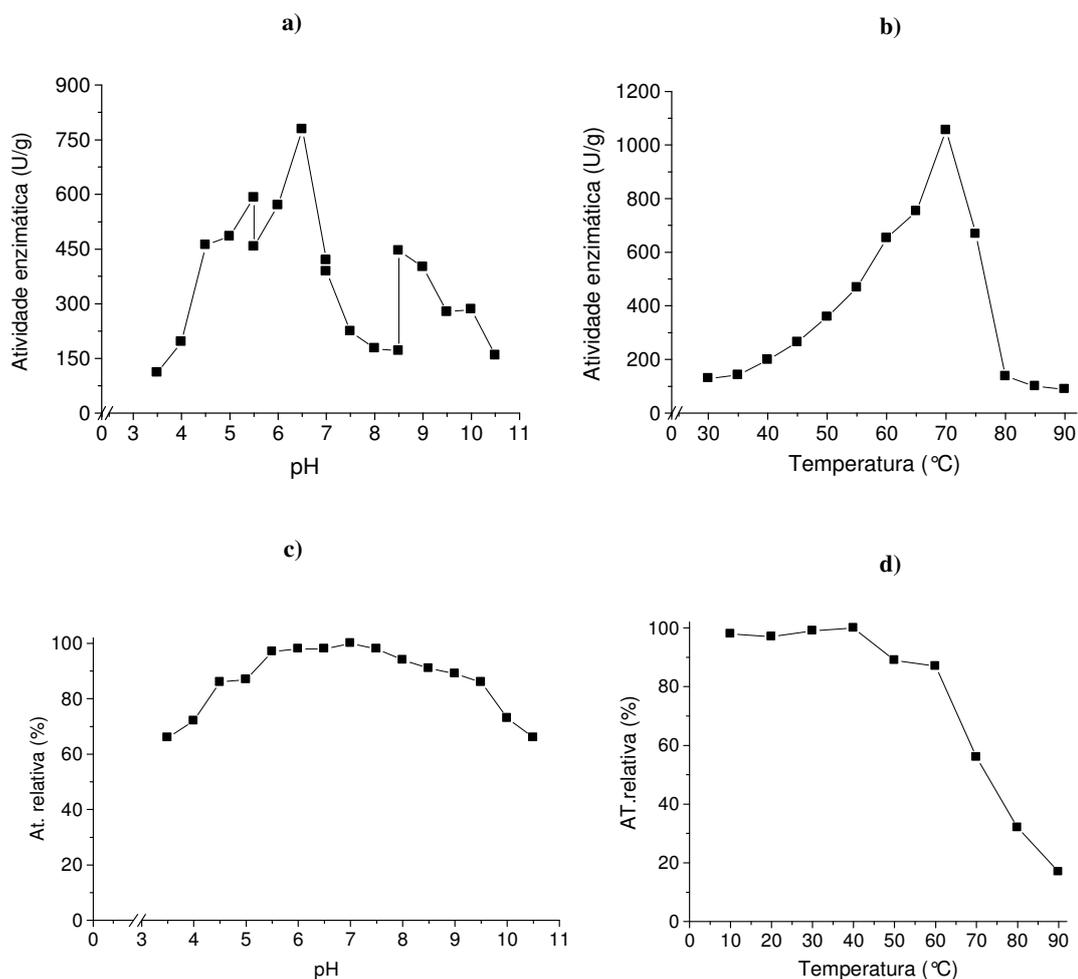


Figura 21 - Caracterização físico-química da xilanase produzida pelo *Thermomyces lanuginosus* (TO-03) em FES, utilizando substrato A. Tampões: acetato-NaOH 3,5 a 5,5; citrato-NaOH 5,5 a 7,0; Tris- HCl 7,0 a 8,5; Glicina-NaOH 8,5 a 10,5. **a)** efeito do pH sobre a atividade de xilanase; **b)** efeito da temperatura sobre a atividade de xilanase; **c)** estabilidade da enzima em ausência de substrato, frente à variação de pH; **d)** estabilidade da mesma, em ausência de substrato, frente à variação de temperatura. -■- xilanase

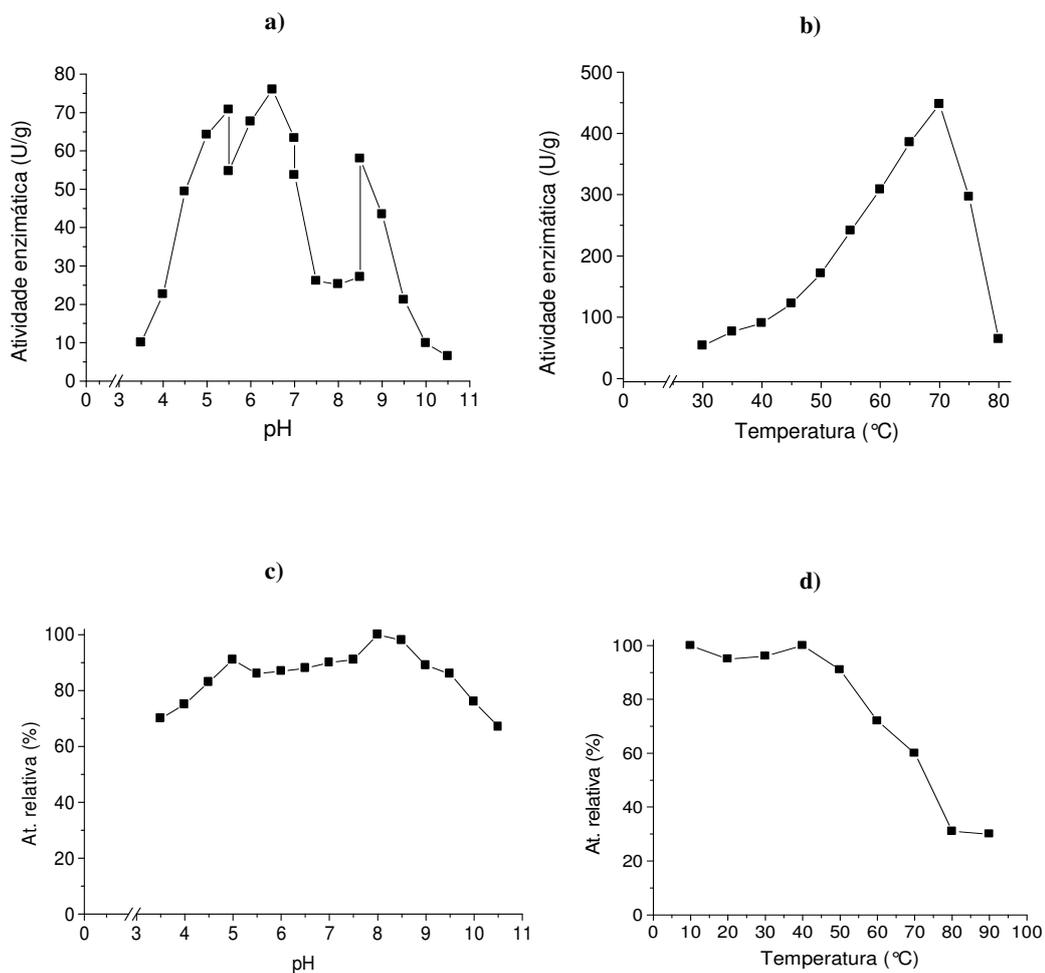


Figura 22 - Caracterização físico-química da xilanase produzida pelo *Thermomyces lanuginosus* (TO-03) em FES, utilizando substrato B. Tampões: acetato-NaOH 3,5 a 5,5; citrato-NaOH 5,5 a 7,0; Tris- HCl 7,0 a 8,5; Glicina-NaOH 8,5 a 10,5. **a)** efeito do pH sobre a atividade de xilanase; **b)** efeito da temperatura sobre a atividade de xilanase; **c)** estabilidade da enzima em ausência de substrato, frente à variação de pH; **d)** estabilidade da mesma, em ausência de substrato, frente à variação de temperatura. -■- xilanase

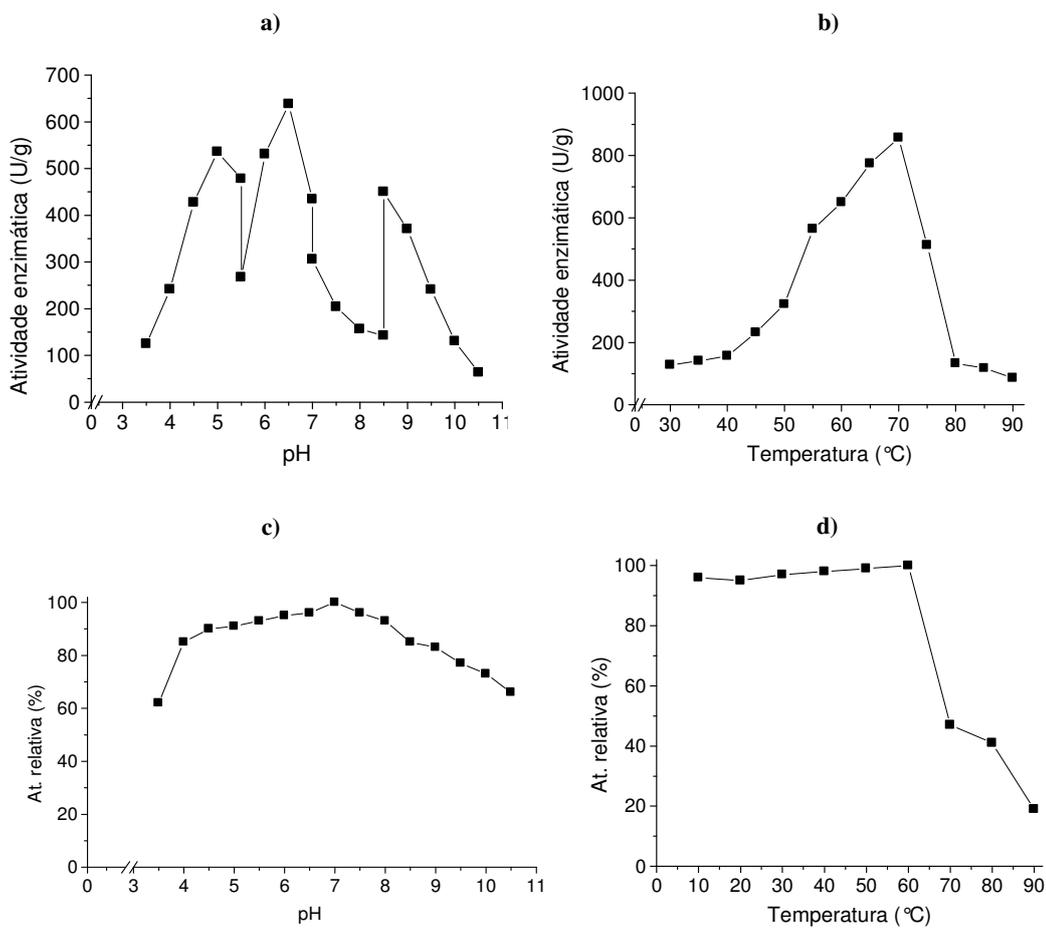


Figura 23 - Caracterização físico-química da xilanase produzida pelo *Thermomyces lanuginosus* (ROB) em FES, utilizando substrato A. Tampões: acetato-NaOH 3,5 a 5,5; citrato-NaOH 5,5 a 7,0; Tris- HCl 7,0 a 8,5; Glicina-NaOH 8,5 a 10,5. **a-**) efeito do pH sobre a atividade de xilanase; **b-**) efeito da temperatura sobre a atividade de xilanase; **c)** estabilidade da enzima em ausência de substrato, frente à variação de pH. **d)** estabilidade da mesma, em ausência de substrato, frente à variação de temperatura. ■- xilanase

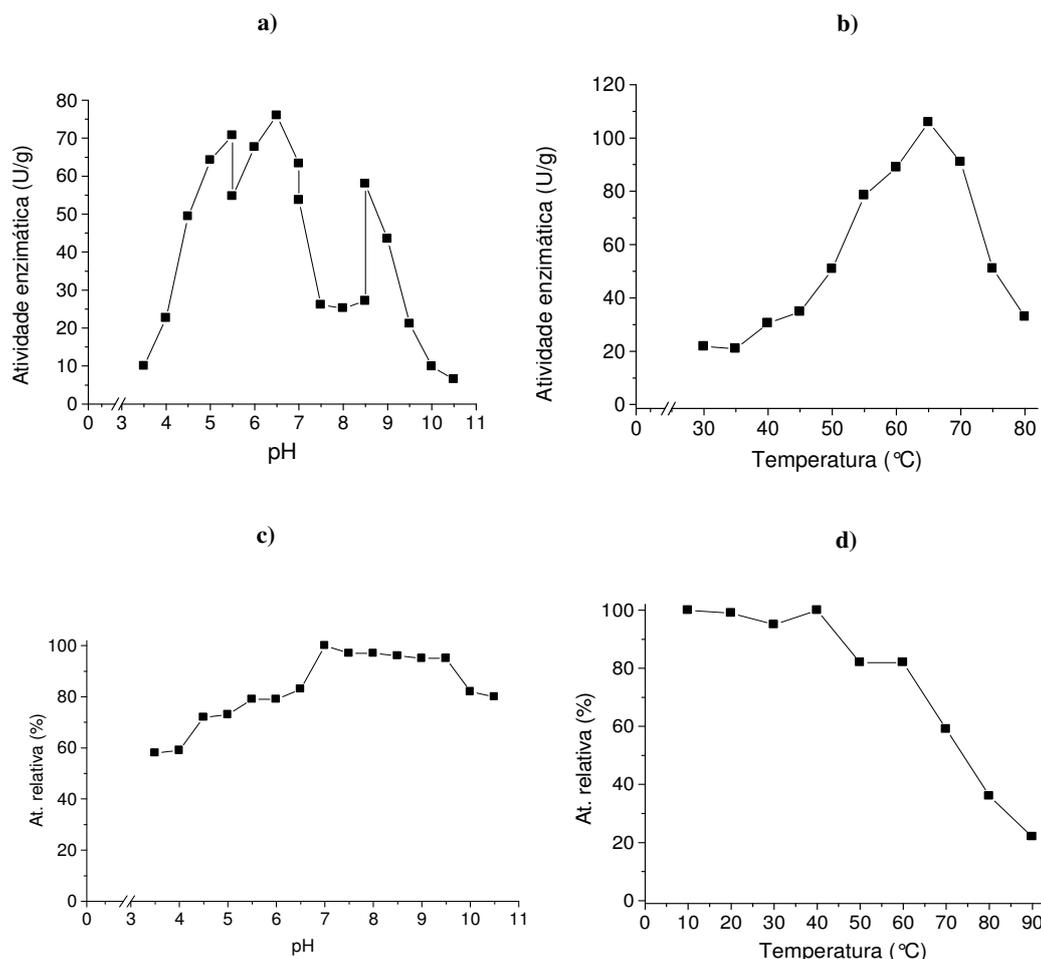


Figura 24 - Caracterização físico-química da xilanase produzida pelo *Thermomyces lanuginosus* (ROB) em FES, utilizando substrato B. Tampões: acetato-NaOH 3,5 a 5,5; citrato-NaOH 5,5 a 7,0; Tris- HCl 7,0 a 8,5; Glicina-NaOH 8,5 a 10,5. **a)** efeito do pH sobre a atividade de xilanase; **b)** efeito da temperatura sobre a atividade de xilanase; **c)** estabilidade da enzima em ausência de substrato, frente à variação de pH; **d)** estabilidade da mesma, em ausência de substrato, frente à variação de temperatura. -■- xilanase

5.3.1. Estabilidade das xilanases nas temperaturas de 39°C e 60°C por 8 horas

A xilanase produzida pelo *T. lanuginosus* (TO-03) provenientes do substrato A, manteve-se 82% estável após 8h de incubação a 39°C, porém essa estabilidade diminuiu para 49% quando a enzima foi incubada a 60°C (Fig.25a). Já as xilanases do *T. lanuginosus* (ROB) em ambos os substratos, manteve-se 100% estável após 8h de incubação a 39°C (Fig. 26a e 26b), o que demonstra que esta linhagem é um pouco mais estável a 39°C do que a linhagem de TO-03.

Em relação ao substrato B, a enzima produzida pelo TO-03 e incubada a 39 e 60°C apresentou praticamente os mesmos resultados descritos para o substrato A e a xilanase produzida pelo ROB apresentou 77% de estabilidade após 4h de incubação a 60°C (Fig. 25b e 26b).

Os resultados obtidos mostram que tanto as xilanases produzidas pelos respectivos fungos, quanto à pectinase produzida pelo *T. indiciae-seudaticae* (pág. 43), são mais estáveis por um período maior de tempo a temperatura menores (39°C), o que pode favorecer o uso dessas enzimas como aditivos alimentares para ruminantes, já que a temperatura do rúmen é em torno de 39°C permanecendo estas enzimas por mais tempo no rúmen facilitando a digestão do alimento pelo animal.

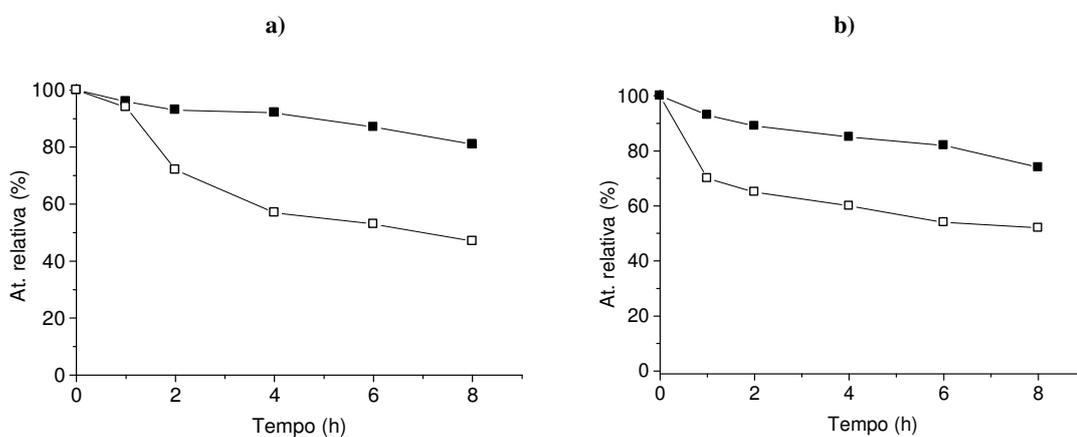


Figura 25- Estabilidade da xilanase produzida por *Thermomyces lanuginosus* (TO-03) nas temperaturas de 39 e 60°C, em períodos de 1 a 8 horas; 39°C -■-e 60°C -□-; **a)** substrato A e **b)** substrato B.

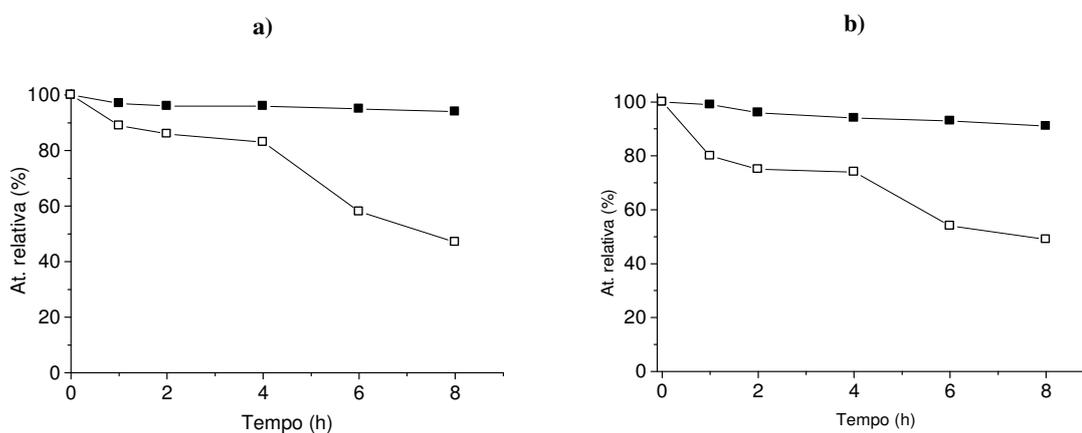


Figura 26- Estabilidade da xilanase produzida por *Thermomyces lanuginosus* (ROB) nas temperaturas de 39 e 60°C, em períodos de 1 a 8 horas; 39°C -■-e 60°C -□-; **a)** substrato A e **b)** substrato B.

5.4. Estabilidade das enzimas frente às condições do rúmen

As figuras de 27 a 29 ilustram os resultados obtidos da estabilidade das enzimas PG (*T. indiciae-seudaticae*) e xilanase (*T. lanuginosus*) em presença do líquido ruminal a 39°C.

A PG produzida pelo fungo *T. indiciae-seudaticae* proveniente do substrato A quando em presença de fluido ruminal, manteve-se 45% estável após 1h de incubação e a partir de 8h esta estabilidade foi nula. Porém, em presença da saliva artificial pH 6,9 (tampão McDougall), manteve-se 39% estável após 12h de incubação (Fig. 27a).

Com relação à estabilidade da enzima proveniente do substrato B, quando em presença de fluido ruminal e saliva artificial foram de 47% e 70% estáveis após 1 h de incubação, respectivamente. No entanto, após 8h de incubação a estabilidade da PG foi nula tanto no fluido ruminal quanto na saliva artificial (Fig. 27b).

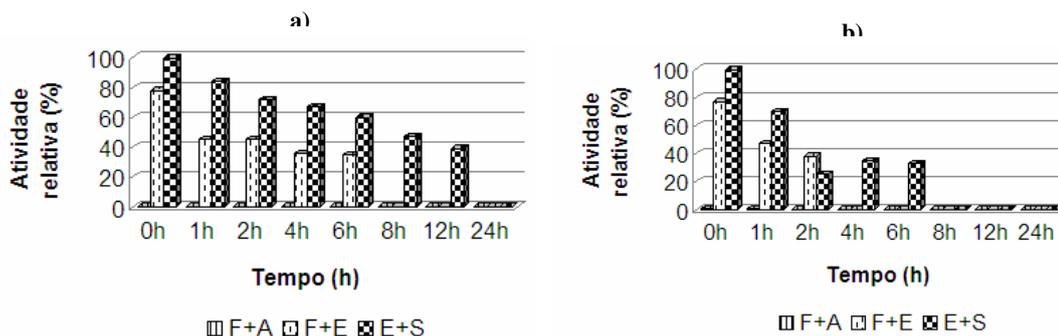


Figura 27- Estabilidade da PG produzida por *Thermomucor indiciae-seudaticae* (N31) por FES em 168h, quando em presença de fluido ruminal a 39°C; **a)** substrato A e **b)** substrato B. F= fluido ruminal; A= água; E= preparado enzimático e S= saliva artificial.

A xilanase produzida pelo fungo *T. lanuginosus* TO-03 proveniente do substrato A, quando em presença do fluido ruminal, mostrou-se 82% estável após 1h de incubação, porém à medida que o tempo de incubação da enzima foi aumentando a estabilidade foi diminuindo, chegando à enzima ao final de 24h de incubação com uma estabilidade de quase 50% (Fig. 28a).

Com relação à xilanase proveniente do substrato B, quando em presença de fluido ruminal, apresentou 63% estável após 1h de incubação e após 24h esta estabilidade foi nula. Porém, em presença de saliva artificial, a xilanase apresentou 49% estável após 24h de incubação (Fig. 28b).

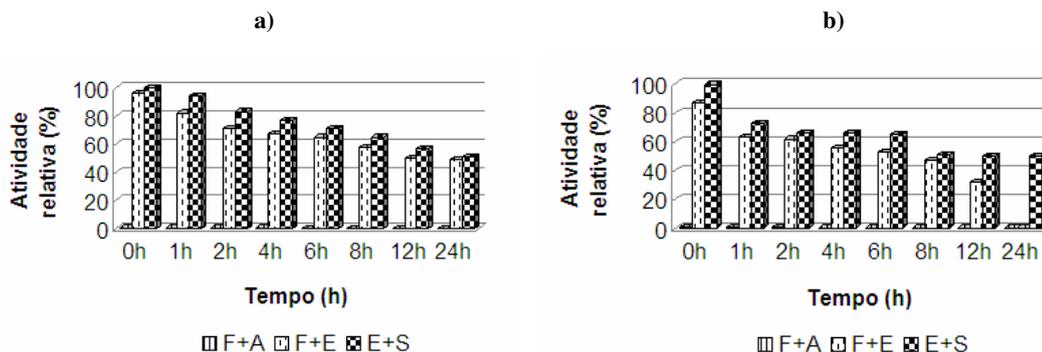


Figura 28- Estabilidade da xilanase produzida por *Thermomyces lanuginosus* (TO-03) por FES em 168h, quando em presença de fluido ruminal a 39°C; **a)** substrato A e **b)** substrato B. F= fluido ruminal; A= água; E= preparado enzimático e S= saliva artificial.

Por fim, a xilanase produzida pela outra linhagem de fungo *T. lanuginosus* (ROB) proveniente do substrato A e B apresentaram 79 e 45% estável após 1 h de incubação, respectivamente. Porém, em presença de saliva artificial a enzima proveniente de ambos os substratos (A e B) mostraram-se cerca de 80% estável após 1h de incubação. No entanto, com o passar das horas a estabilidade da xilanase proveniente do substrato A e B foi diminuindo tornando-se constante a partir de 4h e 6h de incubação da enzima, respectivamente (Fig.29a e 29b).

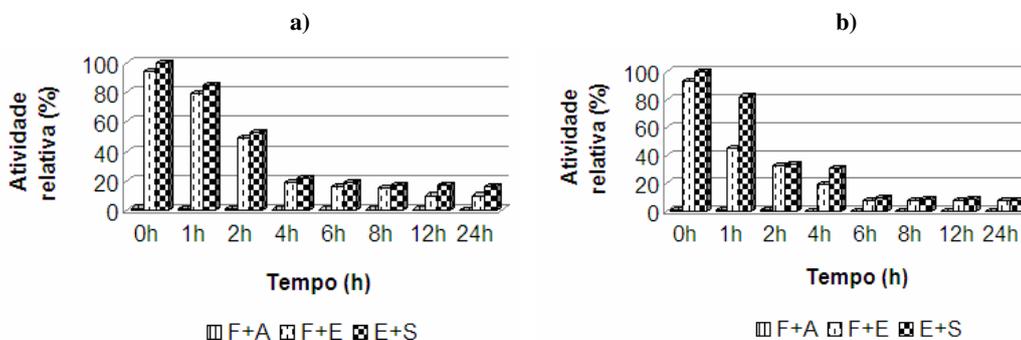


Figura 29- Estabilidade da xilanase produzida por *Thermomyces lanuginosus* (ROB) por FES em 168h, quando em presença de fluido ruminal, a 39°C **a)** substrato A e **b)** substrato B. F= fluido ruminal; A= água; E= preparado enzimático e S= saliva artificial.

No presente experimento a xilanase proveniente das linhagens de *T. lanuginosus* (TO-03 e ROB) incubada a 39°C, no tampão Mc Dougall apresentou resultados semelhantes aos encontrados por Kutasi e colaboradores (2001) que caracterizaram um extrato enzimático contendo xilanase produzida pelo mesmo fungo deste trabalho, o *Thermomyces lanuginosus*, onde foi verificado que a enzima preservou mais de 70% de sua atividade por duas horas

quando incubada a 60°C e, diminuiu para menos de 50%, depois de seis horas de incubação em tampão.

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.

Os resultados aqui encontrados permitem inferir que as xilanases são mais estáveis ao fluido e a saliva artificial do que as pectinases, porém ambas as enzimas provavelmente não serão um fator limitante, para aplicação em nutrição de ruminantes.

5.5. Estabilidade dos extratos enzimáticos armazenados por 10 semanas

As soluções enzimáticas obtidas pelo cultivo dos fungos *T. indicae-seudaticae* (N31) e *T. lanuginosus* (TO-03 e ROB) foram armazenadas por 10 semanas a 25°C, 7°C e -20°C. A cada semana foram realizadas reações enzimáticas para determinar a estabilidade da enzima durante a estocagem.

As figuras 30 a 32 ilustram o grau de estabilidade das enzimas (PG e xilanase) armazenadas nas temperaturas citadas acima. As enzimas produzidas pelo N31 e TO-03 de ambos os substratos, quando armazenadas no freezer (-20°C) foram menos estáveis do que as armazenadas na geladeira (7°C) que por sua vez foram mais estáveis do que as deixadas à temperatura ambiente (25°C) (Fig. 30 e 31). Porém, a xilanase produzida pelo ROB foi menos estável a -20°C do que a temperaturas de 25 e 7°C (Fig. 32). No entanto, no final da 10ª semana, tanto as PGs quanto as xilanases produzidas pelos respectivos fungos apresentaram mais de 50% de estabilidade em todas as temperaturas armazenadas, com exceção da xilanase produzida pelo ROB que apresentou cerca de 40% estável a -20°C (Fig. 30 a 32).

Os resultados obtidos neste trabalho favorecem o uso dessas enzimas como aditivos comerciais destinados a alimentação animal, já que estas não perdem a atividade quando estocadas por mais de um mês.

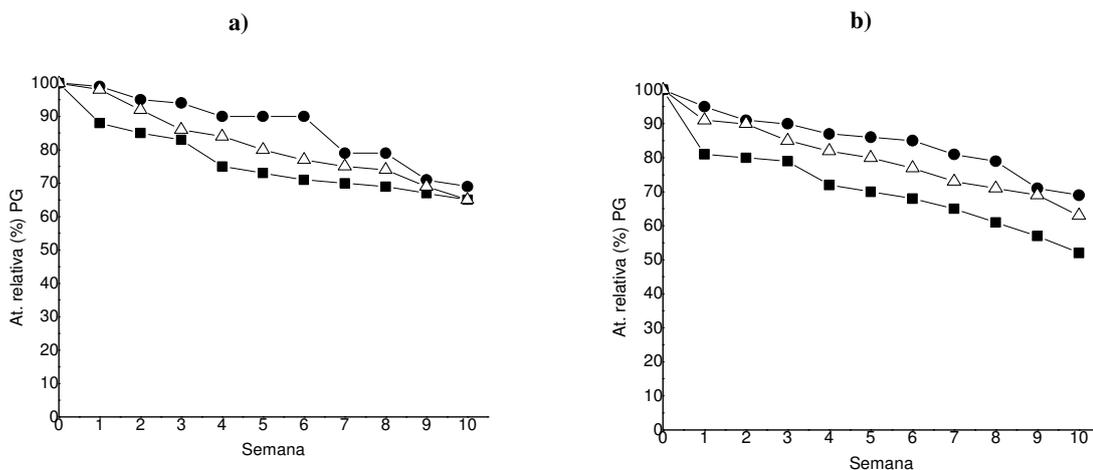


Figura 30- Estabilidade da PG produzida por *Thermomucor indiciae-seudaticae* (N31) por FES, quando armazenada por 10 semanas a 25°C -■-, 7°C -●- e -20°C - △-; a) substrato A e b) substrato B.

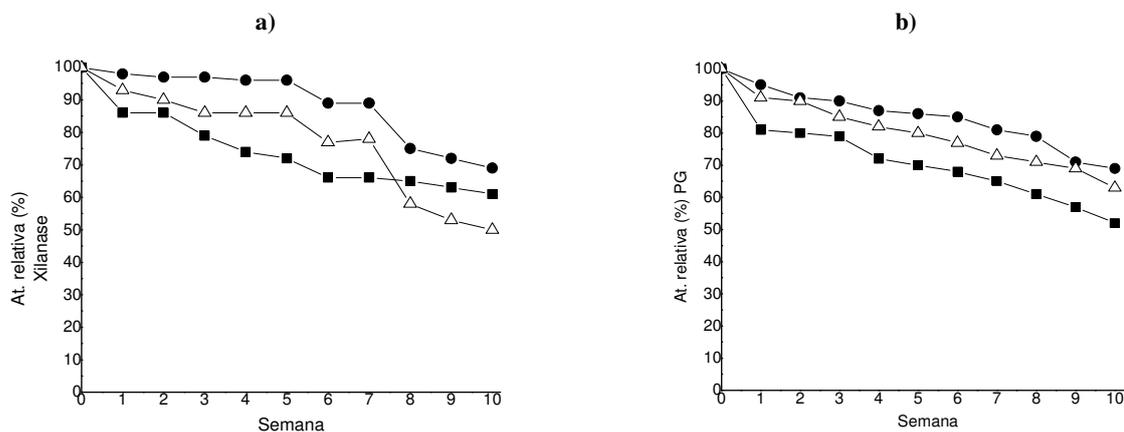


Figura 31- Estabilidade da xilanase produzida por *Thermomyces lanuginosus* (TO-03) por FES, quando armazenada por 10 semanas a 25°C -■-, 7°C -●- e -20°C - △-; a) substrato A e b) substrato B.

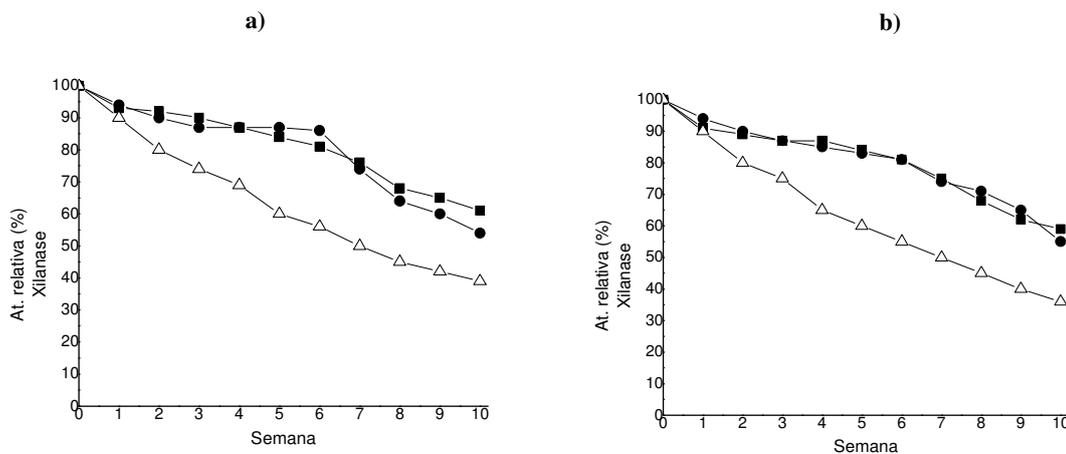


Figura 32- Estabilidade da xilanase produzida por *Thermomyces lanuginosus* (ROB) por FES, quando armazenada por 10 semanas a 25°C -■-, 7°C -●- e -20°C - △-; a) substrato A e b) substrato B.

5.6. Aplicação do preparado enzimático na hidrólise do capim *Brachiaria decumbens*

A hidrólise enzimática foi realizada a 40°C a partir de solução enzimática bruta obtida por FES utilizando *T. indicae-seudaticae* e *T. lanuginosus* (TO-03 e ROB) e substrato A (composto de 35% de farelo de algodão e 65% de polpa cítrica) em 168h. Este foi escolhido, devido os extratos ter apresentado uma melhor atividade enzimática em relação ao substrato B.

A liberação de açúcares redutores a partir da ação do preparado enzimático obtido pelos fungos estudados neste trabalho sobre o capim *Brachiaria decumbens* foi relativamente boa, já que o capim não passou por nenhum pré- tratamento, apenas à lavagem com água. O pico de hidrólise obtido pelo fungo *T. indicae-seudaticae* ocorreu após 3h de reação (16,35 μ M) (Fig. 33).

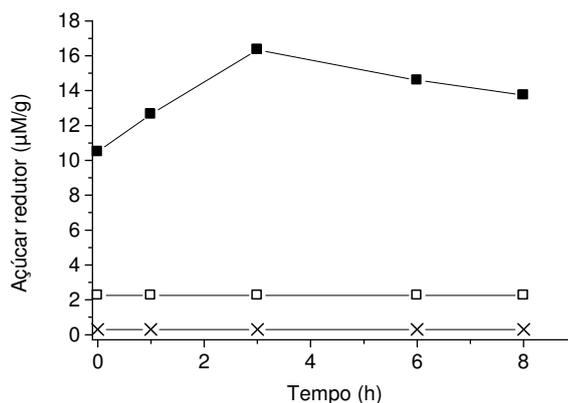


Figura 33 - Hidrólise enzimática do capim, a partir do preparado enzimática obtido por FES em substrato A utilizando *T.indicae-seudaticae* em 168 horas. 0,2 g de capim e 3mL de preparado enzimático. -■- solução enzimática+ capim; -□- solução enzimática; -x- apenas capim.

Com relação às linhagens de *T. lanuginosus* TO-03 e ROB os picos de hidrólise foram em 6 (18,07 μ M) e 8h (11,15 μ M), respectivamente (Fig. 34 e 35). A liberação de açúcar redutor pelo fungo *T. lanuginosus* ROB foi o menor quando comparado com o *T. indicae-seudaticae* e *T. lanuginosus* TO-03.

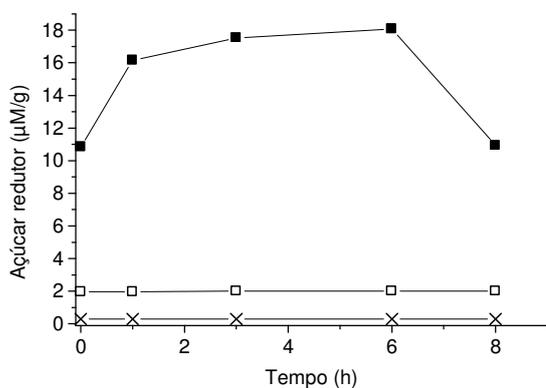


Figura 34 - Hidrólise enzimática do capim, a partir do preparado enzimática obtido por FES em substrato A utilizando *T.lanuginosus* (TO-03) em 168 horas. 0,2 g de capim e 3mL de preparado enzimático. -■- solução enzimática+ capim; -□- solução enzimática; -x- apenas capim

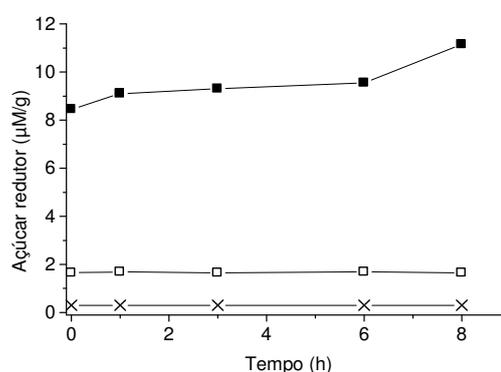


Figura 35 - Hidrólise enzimática do capim, a partir do preparado enzimática obtido por FES em substrato A utilizando *T.lanuginosus* (ROB) em 168 horas. 0,2 g de capim e 3mL de preparado enzimático. -■- solução enzimática+ capim; -□- solução enzimática; -x- apenas capim.

Os resultados aqui encontrados mostram que os extratos enzimáticos obtidos neste trabalho podem aumentar a hidrólise total da fibra consumida pelos ruminantes, sem a necessidade de ser submetido a um pré-tratamento.

Embora o pré-tratamento tenha como propósito separar a lignina e hemicelulose da celulose, reduzir a cristalinidade da celulose e aumentar a porosidade do material lignocelulósico, favorecendo a hidrólise enzimática (KUO; LEE, 2009) este não é viável, quando o material vegetal é utilizado na alimentação de ruminantes, pois os pré-tratamentos a base de peróxido de hidrogênio (CHEN et al., 2008b; MARTÍN et al., 2006), ácido sulfúrico (GUO et al., 2008; KUMAR, 2009), ácido fosfórico (JEIHANIPOUR; TAHERZADEH, 2009), HCl (SUN; CHENG, 2002), amônia e hidróxido de sódio (SUBRAMANIAN et al., 2008) entre outros, geram resíduos tóxicos que podem prejudicar a saúde do animal em questão. Por isso a busca por enzimas que apresentem altos índices de hidrólise, sem que haja a necessidade de um pré-tratamento pode ser um caminho promissor e vantajoso na área de nutrição animal.

6. Conclusões

Os resultados obtidos permitem inferir:

- meio composto de farelo de algodão e polpa cítrica sem os sais minerais foi o melhor substrato para a produção de xilanase e pectinase.
- O fungo *Thermomucor indicae-seudaticae* (N31) secretou enzimas tipicamente termofílicas.
- As linhagens de *Rhizomucor pusillus* e *Thermomyces lanuginosus* (ROB) foram as únicas a produzir celulasas juntamente com pectinase e xilanase no substrato A.
- As enzimas xilanase e pectinase apresentaram estabilidade frente às condições do rúmen.
- Os extratos enzimáticos provenientes dos fungos *T. indicae-seudaticae* e *T. lanuginosus* (TO-03 e ROB) hidrolisaram a forragem avaliada.

Dessa forma espera-se otimizar o processo de FES, para as duas linhagens de *T. lanuginosus* e pela linhagem de *T. indicae-seudaticae* e, a utilização de resíduos agrícolas e agroindustriais como substrato alternativo para conseguir um produto rico em enzimas despolimerizantes de material vegetal que possa ser adicionado a ração animal, melhorando a digestibilidade da forragem consumida pelos ruminantes.

Os resultados alcançados durante o desenvolvimento do presente trabalho serão transferidos ao setor produtivo, onde poderá ser produzido em escala industrial. Assim, espera-se contribuir para a utilização de resíduos da agroindústria brasileira como produto de valor comercial e minimizar os problemas ambientais causados pela deposição destes resíduos na natureza.

7. Referência Bibliográfica

- ABECITRUS, 2008 – Disponível em: http://www.abecitrus.com.br/industria_br.html acessado em Dez. 2008.
- ADAMS, P. R.; DEPLOEY, J. J. Enzymes produced by thermophilic fungi. **Mycologia**, v. 70, p. 906 – 910, 1978.
- AGUIAR, L.; MÁRQUEZ-MONTESINOS, F.; GONZALO, A.; SÁNCHEZ, J.L.; ARAUZO, J. Influence of temperature and particle size on the fixed bed pyrolysis of orange peel residues. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**. v. 83, p. 124–130, 2008.
- 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.; PENTTILÄ, M. Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, p. 719-739, 2005.
- AZIN, M.; MORAVEJ, R.; ZAREH, D. Production of xylanase by *Trichoderma longibrachiatum* on a mixture of wheat bran and wheat straw: Optimization of culture condition by Taguchi method. **Enzyme and Microbial Technology**, v.40, p. 801–805, 2007.
- 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. **Bioresource Technology**, v. 98, 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.
- BARROS, L.F. Sacarificação Enzimática e Fermentação Alcoólica em Bagaço de cana-de-açúcar para Produção de Etanol. **São José do Rio Preto, Ibilce/Unesp**, 58, 2007. Monografia.
- 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.
- 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.

- BHANU PRAKASH, G.V.S.; PADMAJA, V.; SIVA KIRAN, R. R. Statistical optimization of process variables for the large-scale production of *Metarhizium anisopliae* conidiospores in solid-state fermentation. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 1530-1537, 2008.
- BONINI, C.; D'AURIA, M.; DI MAGGIO, P.; FERRI, R. Characterization and degradation of lignin from steam explosion of pine and corn stalk of lignin: The role of superoxide ion and ozone. **Industrial Crops and Products**, v. 27, p. 182-188, 2008.
- BOURBONNAIS, R.; PAICE, M.G. Veratryl alcohol oxidases from the lignin-degrading basidiomycete *Pleurotus sajor-caju*. **Biochemistry Journal**, v.255, p.445-450, 1988.
- 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 lacase production by *Lentinula (Lentinus) edodes*. **FEMS Microbiology Letters**, v.128, p.81-88, 1995.
- CAGNON, B.; PY, X.; GUILLOT, A.; STOECKLI, F.; CHAMBAT, G. Contributions of hemicellulose, cellulose and lignin to the mass and the porous properties of chars and steam activated carbons from various lignocellulosic precursors, **Bioresource Technology**, v. 100, p. 292-298, 2009.
- 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 Science and Technology**, v.141,p.1-14,2008a.
- CHEN, H.; HAN, Y.; XU, J. Simultaneous saccharification and fermentation of steam exploded wheat straw pretreated with alkaline peroxide. **Process Biochemistry**, v. 43, p. 1462-1466, 2008b.
- CHENG, K.-K.; CAI, B.-Y.; ZHANG, J.-A.; LING, H.-Z.; ZHOU, Y.-J.; GE, J.-P.; XU, J.-M. Sugarcane bagasse hemicellulose hydrolysate for ethanol production by acid recovery process. **Biochemical Engineering Journal**, v. 38, p. 105-109, 2008.
- CHRISTOPHER, L.; BISSOON, S., SINGH, S.; SZENDEFY, J.; SZAKACS, G. Bleach-enhancing abilities of *Thermomyces lanuginosus* xylanases produced by solid state fermentation. **Process Biochemistry**, v.40, p.3230-3235, 2005.
- COLOMBATTO, D.; MOULD F. L.; BHAT, M. K.; OWEN, E. Influence of exogenous fibrolytic enzyme level and incubation pH on the *in vitro* ruminal fermentation of alfalfa stems. **Animal Feed Science and Technology**, v.137, p. 150 - 162, 2007.

- 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.
- 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, 2003a.
- COLOMBATTO, D.; MOULD, F.L.; BHAT, M.K.; OWEN, E. Use of fibrolytic to improve the nutritive value of ruminant diets. A biochemical and in vitro rumen degradation assessment. **Animal Feed Science and Technology**, v.107, p.201-209, 2003b.
- 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 2009, Companhia Nacional de Abastecimento. <http://www.conab.gov.br/conabweb> Acessado em 5/01/2009.
- DE GREGORIO, A.; MANDALARI, G.; ARENA, N.; NUCITA, F.; TRIPODO, M. M.; LO CURTO, R. B. SCP and crude pectinase by slurry – state fermentation of lemon pulps. **Bioresource Technology**, v. 83, p. 89 – 94, 2002.
- DE HAAN, R.; ROSE, S. H.; LYND, L. R.; VAN ZYL, W. H. Hydrolysis and fermentation of amorphous cellulose by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. **Metabolic Engineering**, v. 9, p. 87-94, 2007.
- DEGHAN-BANADAKY, M., CORBETT, R., OBA, M. Effects of barley grain processing on productivity of cattle. **Animal Feed Science and Technology**, v.137, p. 1–24, 2007.
- DEHORITY, B. A.; TIRABASSO, P. A. Effect of ruminal cellulolytic bacterial concentrations on in situ digestion of forage cellulose **Journal Of Animal Science** v. 76, n. 11, p. 2905-2911, 1998.
- DELCHEVA, G.; DOBREV, G.; PISHTIYSKI, I. Performance of *Aspergillus niger* B 03 β -xylosidase immobilized on polyamide membrane support. **Journal of Molecular Catalysis**, v. 54, p. 109-115, 2008.
- DIORIO, L. A.; MERCURI, A. A.; NAHABEDIAN, D.E.; FORCHIASSIN, F. Development of a bioreactor system for the decolorization of dyes by *Coriolus versicolor* f. antarcticus. **Chemosphere**, *in press*, 2008.

- DOBREV, G. T.; PISHTIYSKI, I. G.; STANCHEV, V. S.; MIRCHEVA, R. Optimization of nutrient medium containing agricultural wastes for xylanase production by *Aspergillus niger* B03 using optimal composite experimental design. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 2671-2678, 2007.
- DRITZA, V.; RIGAS, F.; NATSIS, K.; MARCHANT, R. Characterization of a fungal strain isolated from a polyphenol polluted site. **Bioresource Technology**, v.98, p. 1741-1747, 2007.
- EL NEMR, A.; ABDELWAHAB, O.; EL-SIKAILY, A.; KHALED, A. Removal of direct blue-86 from aqueous solution by new activated carbon developed from orange peel. **Journal of Hazardous Materials**, v.161, p.102–110, 2009.
- 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.
- EUN, J. S.; BEAUCHEMIN, K. A. Assesment of the efficacy of varying experimental exogenous fibrolytic enzymes using in vitro fermentation characteristics. **Animal Feed Scienc and Technology**, v. 132, p. 298-315, 2007.
- EUN, J. S.; BEAUCHEMIN, K. A. Effects of a proteolytic feed enzyme on intake, digestion, ruminal fermentation, and milk production **Journal Of Dairy Science** v. 88, n 6, p. 2140-2153, 2005.
- EUN, J. S.; BEAUCHEMIN, K. A.; SCHULZE, H. Use of exogenous fibrolytic enzymes to enhance in vitro fermentation of alfafa 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**. In Press, available in www.scienceirect.com, 2006.
- FREITAS, P. M.; MARTIN, N.; SILVA, D.; DA SILVA, R.; GOMES, E. Production and characterization of polygalacturonases from newly isolated thermophilics *Monascus* sp N8 and *Aspergillus* sp N12 by Solid state fermentation. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, 302-306, 2006.
- GIRALDO, L.A, TIJIDO, M.L., RANILLA, M.J, CARRO, M.D. Effects of exogenous fibrolytic enzymes on *in vitro* ruminal fermentation of substrates with different forage:concentrate ratio. **Animal Feed Science and 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.
- GOLDBERG, R. N.; LANGB. E, LO, C.; ROSS, D.J, YADU, B. Thermodynamics of the hydrolysis reactions of α -D-galactose 1-phosphate, snlycerol 3-phosphate, 4nitrophenyl phosphate, phosphocreatine, and 3-phospho-D-glycerate. **The journal of chemical thermodynamics**, accepted manuscript, 2008.
- GOMES, E.; GUES, M.A.U.; MARTIN, N.; SILVA, R. Enzimas termoestáveis: Fontes, produção e aplicação industrial. *Química Nova*, v. 30, nº1, p. 136-145, 2007.
- GRAMINHA, É. B. N.; GONÇALVES, A. Z. L; PIROTA, R. D. P. B.; BALSALOBRE, M. A. A.; DA SILVA, R.; GOMES, E. Enzyme production by solid-state fermentation: Application to animal nutrition. **Animal Feed Science and Technology**, v.144, p. 1-22, 2008.
- GUERFALI, M.; MAALEJ, I.; GARGOURI, A.; BELGHITH, H. Catalytic properties of the immobilized *Talaromyces thermophilus* -xylosidase and its use for xylose and xylooligosaccharides production. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, in press, 2008.
- GUO, G-L.; CHEN, W-H.; MEN, L-C.; HWANG, W-S. Characterization of dilute acid pretreatment of silvergrass for ethanol production. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 6046–6053, 2008.
- HAINZE, M.T.M; MUNTIFERING, R.B.; Mc CALL, C. A. Fiber Digestion in Horses Fed Typical Diets With and Without Exogenous Fibrolytic Enzymes. **Scientific papers**, v. 23, p. 111-115, 2003.
- HENDRIS, A.T.W.M.; ZEEMAN, G. Review: Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass, **Bioresource Technology**, v.100, p. 10–18, 2009.
- HENRIKSSON, G.; AKIN, D. E.; SLOMCZYNSKI, D.; ERIKSSON, K-E. L. Production of highly efficient enzymes for flax retting by *Rhizomucor pusillus*. **Journal of Biotechnology**, v. 68, 115–123, 1999.
- IBGE, 2009 - Disponível em: http://www.ibge.gov.br/banco_html acessado em Mar. 2009.
- IMANDI, S. B.; BANDARU, V.V.R.; SOMALANKA, S. R.; BANDARU, S.R.; GARAPATI, H. R. Application of statistical experimental designs for the optimization of medium constituents for the production of citric acid from pineapple waste. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 4445-4450, 2008.

- JEIHANIPOUR, A.; TAHERZADEH, M. J. Ethanol production from cotton-based waste textiles. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 1007–1010, 2009.
- JAYANI, R.S.; SAXENA, S.; GUPTA, R. Microbial pectinolytic enzymes: A review. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 2931- 2944, 2005.
- JONATHAN, S. G.; FASIDI, I. O.; AJAYI, A. O.; ADEGEYE, O. Biodegradation of Nigerian wood wastes by *Pleurotus tuber-regium* (Fries) Singer. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 807–811, 2008.
- JUHÁSZ, T.; SZENGYEL, Z.; RÉCZEY, K.; SIKA- AHO, M.; VIKARI, L. Characterization of cellulases and hemicellulases produced by *Trichoderma reesei* on various carbon sources. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 3519-3525, 2005.
- KAMEDA, E.; QUEIROZ NETO, J. C.; LANGONE, M. A. P.; COELHO, M. A.Z.; Removal of polymeric filter cake in petroleum wells: A study of commercial amylase stability. **Journal of Petroleum Science & Engineering**, v. 59, p. 263-270, 2007.
- KANG, S.W.; PARK, Y.S.; LEE, J. S.; HONG, S. I.; KIN, S. W. Production of cellulases and hemicellulases by *Aspergillus niger* KK2 from lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 91, p. 153-156, 2004.
- KASHYAP, D. R.; VOHRA, P. K.; CHOPRA, S.; TEWARI, R. Applications of pectinases in the commercial sector: a review. **Bioresource technology**, v.77, p.215-227, 2001.
- KHANDEPARKAR, R.D.S.; BHOSLE, N. B. Isolation, purification and characterization of the xylanase produced by *Arthrobacter* sp. MTCC 5214 when grown in solid-state fermentation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, p. 732–742, 2006.
- KATAPODIS, P.; CHRISTAKOPOULOU, V.; KEKOS, D.; CHRISTAKOPOULOS, P. Optimization of xylanase production by *Chaetomium thermophilum* in wheat straw using response surface methodology. **Biochemical Engineering Journal**, v. 35, p.136–141, 2007.
- KATAPODIS, P.; CHRISTAKOPOULOS, P. Enzymic production of feruloyl xylo oligosaccharides from corn cobs by a family 10 xylanase from *Thermoascus aurantiacus*. **LWT**, v. 41, p. 1239–1243, 2008.
- KAUR, G.; KUMAR, S.; SATYANARAYANA, T. Production, characterization and application of a thermostable polygalacturonase of a thermophilic mould *Sporotrichum thermophile* Apinis. **Bioresource Technology**, v. 94, p. 239–243, 2004.
- KOHLI, U.; NIGAM, P.; SINGH, D.; CLAUDHARY, K. Thermostable, alkalophilic and cellulase free xylanase production by *Thermoactinomyces thalophilus* subgroup C. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 28, p.606–610, 2001.

- KHORASVI-DARANI, K.; ZOGHI, A. Comparison of pretreatment strategies of sugarcane bagasse: Experimental design for citric acid production. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 6986–6993, 2008.
- 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**, 2007.
- 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**, 2007.
- 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.
- KUNAMNENI, A.; SINGH, S. Improved high thermal stability of pullulanase from a newly isolated thermophilic *Bacillus* sp. AN-7. **Enzyme and Microbial Technology**, v.39, p. 1399-1404, 2006.
- KUO, C-H.; LEE, C-K. Enhanced enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse by N-methylmorpholine-N-oxide pretreatment. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 866–871, 2009.
- KUTASI, J., BATA, Á., BRYDL, E., RAFAI, P., JURKOVICH, V. Characterisation and effects of a xylanase enzyme preparation extracted from *Thermomyces lanuginosus* cultures. **Acta Veterinaria Hungarica**, v.49, p.175-184, 2001.
- LEE, S.S; HA, J.K; CHENG, K-J. Influence of an anaerobic fungal culture administration on in vivo ruminal fermentation and nutrient digestion. **Animal Feed Science and Technology**, v. 88, p. 201-217, 2000.
- LEITE; R. S. R. **Produção, propriedades e purificação de β -Glicosidase dos Microrganismos *Aureobasidium pullulans* e *Thermoascus auranticus*: Comparação das características térmicas das duas enzimas brutas**, 2004. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas), Universidade Estadual Paulista, Rio Claro.
- LEVASSEUR, A.; PIUMI, F.; COUTINHO, P.M.; RANCUREL, C.; ASTHER, M.; DELATTRE, M.; HENRISSAT, B.; PONTAROTTI, P.; ASTHER, M.; RECORD, E. FOLy: An integrated database for the classification and functional annotation of fungal oxidoreductases potentially involved in the degradation of lignin and related aromatic compounds. **Fungal Genetics and Biology**, v. 45, p. 638–645, 2008.
- 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.

- LIA, X.; JIA, R. Decolorization and biosorption for Congo red by system rice hull-Schizophyllum sp. F17 under solid-state condition in a continuous flow packed-bed bioreactor. **Bioresource Technology**, *in press*, 2008.
- LOPEZ, M. J.; VARGAS-GARCÍA, M. DEL C.; SUÁREZ-ESTRELLA, F.; NICHOLS, N. N.; DIEN, B. S.; MORENO, J. Lignocellulose-degrading enzymes produced by the ascomycete *Coniochaeta ligniaria* and related species: Application for a lignocellulosic substrate treatment. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, p. 794–800, 2007.
- LUGO-LUGO, V., HERNÁNDEZ-LÓPEZ, S., BARRERA-DÍAZ, C., UREÑA-NÚÑEZ, F., BILYEU, B. A comparative study of natural, formaldehyde-treated and copolymer-grafted orange peel for Pb(II) adsorption under batch and continuous mode. **Journal of Hazardous Materials**, v. 161, p. 1255–1264, 2009.
- MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. **Microbiologia de Brock**. 10. ed. São Paulo: Person Education, 2004.
- MAMMA, D.; KOURTOGLOU, E.; CHRISTAKOPOULOS, P. Fungal multienzyme production on industrial by-products of the citrus-processing industry. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 2373-2383, 2008.
- 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.
- MANDEBVU, P.; WEST, J.W.; FROETSCHER, M.A.; HATFIELD, R.D.; GATES, R.N.; HILL, G.M. Effect of enzyme or microbial treatment of bermudagrass forages before ensiling on cell wall composition, end products of silage fermentation and in situ digestion kinetics. **Animal Feed Science and Technology**, v. 77, p. 317-329, 1999.
- 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.
- MARTIN, N. **Isolamento de linhagens fúngicas termofílicas produtoras de pectinases termoestáveis: produção, caracterização e purificação parcial da poligalacturonase**. 2006. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas), Universidade Estadual Paulista Rio Claro.
- MARTÍN, C.; KLINKE, H. B.; THOMSEN, A. B. Wet oxidation as a pretreatment method form enhancing the enzymatic convertibility of sugarcane bagasse. **Enz. Microbiol. Technol.**, v. 40, p. 426-432, 2006.

- 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.
- MESHARAM, M.; KULKARNI, A.; JAYARAMAN, V. K.; LELE, S. S. Optimal xylanase production using *Penicilium janthinellum* NCIM 1169: A model based approach. **Biochemical Engineering Journal**, v. 40, p. 348–356, 2008.
- MILAGRES, A.M.F.; SANTOS, E.; PIOVAN, T.; ROBERTO, I.C. Optimal xylanase production using *Penicilium janthinellum* NCIM 1169: A model based approach. **Biochemical Engineering Journal**, v. 40, p. 348–356, 2008.
- MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, p. 426-428, 1959.
- MORGAVI, D.P., NEWBOLD, C.J., BEEVER, D.E., WALLACE, R.J. Stability and stabization of potencial feed additive enzymes in rumen fluid. **Enzyme and Microbial Technology**, v.26, p.171-177, 2000.
- MUKHERJEE, A. K.; ADHIKARI, H.; RAI, S. K. Production of alkaline protease by a thermophilic *Bacillus subtilis* under solid-state fermentation (SSF) condition using *Imperata cylindrica* grass and potato peel as low-cost medium: Characterization and application of enzyme in detergent formulation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 39, p. 253-261, 2008.
- MURRAY, T.; ROUGH, S.L.; WILSON, D.I. The Effect of Drying Technique on Tablets Formed from Extrusion-spheronization Granules. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 85, p. 996-1004, 2007.
- MUSSATO, S. I.; DRAGONE, G.; ROBERTO, I. C. Brewers' spent grain: generation, characteristics and potential applications. **Journal of CEREAL SCIENCE**, v. 43, p. 1-14, 2006.
- MUWALLA, M. M.; HADDAD, S. G.; HIJAZEEN, M. A. Effect of fibrolytic enzyme inclusion in high concentrate fattening diets on nutrient digestibility and growth performance of Awassi lambs. **Livestock Science**, v. 111, n. 3, p. 255-258, 2007.
- NARANG, S.; SAHAI, V.; BISARIA, V.S. Optimization of Xylanase Production by *Melanocarpus albomyces* IIS68 in Solid State Fermentation Using Response Surface Methodology. **Journal of Bioscience and bioengineering**, v. 91, p. 425-427, 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.

- 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.
- O'CONNOR-ROBISON, C.I.; NIELSEN, B.D.; MORRIS, R. Cellulase Supplementation Does Not Improve the Digestibility of a High-Forage Diet in Horses. **Original research**, v. 27, p. 535-538, 2007.
- 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.
- PHUTELA, U. DHUNA, V.; SANDHU, S. Pectinase and polygalacturonase production by a thermophilic *Aspergillus fumigatus* isolated from decomposing orange peels. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 36: 63-69, 2005.
- PLESSAS, S.; BEKATOROU, A.; KOUTINAS, M.; SOUPIONI, M.; BANAT, I.M.; MARCHANT, R. Use of *Saccharomyces cerevisiae* cells immobilized on orange peel as biocatalyst for alcoholic fermentation. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 860–865, 2007.
- PUCHART, V., KATAPODIS, P., BIELY, P., KREMnický, L., CHRISTAKOPOULOS, P., VRSANSKÁ, M., KEKOS, D., MACRIS, B.J., BHAT, M.K. Production of xylanases, mannanases, and pectinases by the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 24, p. 355-361, 1999.
- REDDISH, M. A.; KUNG, L., JR. The effect of feeding a dry enzyme mixture with fibrolytic activity on the performance of lactating cows and digestibility of a diet for sheep. **Journal of Dairy Science**, v. 90, n. 10, p. 4724-4729, 2007.
- RODRIGUES, C. Desenvolvimento de Bioprocesso para Produção de Ácido Cítrico por Fermentação no Estado Sólido Utilizando Polpa Cítrica, **Curitiba, Universidade Federal do Paraná**, 2006, 93. Mestrado.
- RODRIGUEZ COUTO, S.; SANROMÁN, M. A. Application of solid-state fermentation to ligninolytic enzyme production. **Biochemical Engineering Journal**, v. 22, p. 211-219, 2005.
- ROGALINSKI, T.; INGRAN, T.; BRUNNER, G. Hydrolysis of lignocellulosic biomass in water under elevated temperatures and pressures. **J. of Supercritical Fluids**, v. 47, p. 54–63, 2008.
- SAID, S.; PIETRO, C.L.R. Enzimas como agentes biotecnológicos. Ribeirão Preto, **Legis Summa**, 1ed., v.1, 2004.

- SATHISH-KUMAR, S.; PALANIVELU, P. Purification and characterization of an extracellular polygalacturonase from the thermophilic fungus, *Thermomyces lanuginosus*. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 15, p. 643 - 646, 1999.
- SCHIMIDT, J., SZAKÁCS, G., CENKVÁRI, É., SIPOCZ, J., URBÁNSZKI, K., TENGHERDY, R.P. Enzyme assisted ensiling of alfalfa with enzymes by solid substrate fermentation. **Bioresource Technology**, v.76, p.207-212, 2001.
- 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**, *in press*, 2008.
- SILVA, D.; MARTINS, E. S.; DA SILVA, R.; GOMES, E. Pectinase production by *Penicillium viridicatum* RFC3 by solid state fermentation using agricultural wastes and agro-industrial by-products. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 33, p. 318-324, 2002.
- 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, V. L. M. M.; GOMES, W. C.; ALSINA, O. L. M. Utilização do bagaço de cana de açúcar como biomassa adsorvente na adsorção de poluentes orgânicos. *Revista Eletrônica de Materiais e Processos*, v. 2, p. 27-32, 2007.
- SINGH, S.; PILLAY, B.; PRIOR, B. A. Thermal stability of beta-xylanases produced by different *Thermomyces lanuginosus* strains. **Enzyme and Microbiology Technology**, v. 26(7), p. 502-508, 2000.
- SINGH, S.; MADLALA A. M.; PRIOR B. A. *Thermomyces lanuginosus*: properties of strains and their hemicellulases. **FEMS Microbiology**, v. 27, p. 3-16, 2002.
- SOCCOL, R. S.; VANDERBERGHE, L. P. S. Overview of applied solid-state fermentation in Brazil. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, p. 205-218, 2003.
- SONIA, K.G., CHADHA, B.S., SAINI, H.S. Sorghum straw for xylanase hyper-production by *Thermomyces lanuginosus* (D2W3) under solid-state fermentation. **Bioresource Technology**, v.96, p.1561-1569, 2005.
- SPAGNA, G.; ANDREANI, F.; SALATELLI, E.; ROMAGNOLI, D.; PIFERRI, P. G. Immobilization of α -L-arabinofuranosidase on chitin and chitosan. **Process Biochemistry**, v. 33, Nº 1, p. 57-62, 1997.

- SUBRAMANIAN, S.; VAUGHN, K.; CARRIER, D.J.; CLAUSEN, E.C. Pretreatment of milk thistle seed to increase the silymarin yield: An alternative to petroleum ether defatting. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 2501–2506, 2008.
- SUN, Y.; CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. **Biores. Technol.**, v. 83, p. 1-11, 2002.
- SUN, S. Y.; XU, Y. Solid-state fermentation for ‘whole-cell synthetic lipase’ production from *Rhizopus chinensis* and identification of the functional enzyme. **Process Biochemistry**, v. 43, p. 219-224, 2008.
- THAREJA, A.; PUNIYA, A. K.; GOEL, G.; NAGPAL, R.; SEHGAL, J. P.; SINGH, P. K.; SINGH, K. In vitro degradation of wheat straw by anaerobic fungi from small ruminants. **Archives of Animal Nutrition**, v. 60, n. 5, p. 412 – 417, 2006.
- THONGEKKAEW, J.; IKEDA, H.; MASAKI, K.; IEFUJI, H. An acidic and thermostable carboxymethyl cellulase from the yeast *Cryptococcus* sp. S-2: Purification, characterization and improvement of its recombinant enzyme production by high cell-density fermentation of *Pichia pastoris*. **Protein Expr Purif**, v.60, p. 140-146, 2008.
- 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.
- TITI, H.H., TABBAA, M.J, Efficacy of exogenous cellulase on digestibility in lambs and growth of dairy calves. **Livestock Production Science** , V. 87, p. 207– 214, 2004.
- TOPAKAS, E., KATAPODIS, P., KEKOS, D., MACRIS, B.J., CHRISTAKOPOULOS, P. Production and partial characterization of xylanase by *Sporotrichum thermophile* under soil-state fermentation. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v.19, p.195-198, 2003.
- TRICARICO, J. M.; JOHNSTON, J. D.; DAWSON, K. A. Dietary supplementation of ruminant diets with an *Aspergillus oryzae* α -amylase. **Animal Feed Science and Technology**, 2007, doi:10.1016/j.anifeedsci.2007.01.017.
- TRIPATHI, P.; KUMARI, A.; RATH, P.; KAYASTHA, A. M. Immobilization of α -amylase from mung beans (*Vigna radiata*) on Amberlite MB 150 and chitosan beads: A comparative study. **Journal of Molecular Catalysis**, v. 49, p. 69-74, 2007.
- TUNCER, M.; BALL, A. S.; ROB, A.; WILSON, M. Optimization of extracellular lignocellulolytic enzyme production by a thermophilic actinomycete *Thermomonospora fusca* BD25. **Enzyme and Microbial Technology** , v. 25, p. 38–47, 1999.

- VALASKOVÁ; BALDRIAN, P. Estimation of bound and free fractions of lignocellulose-degrading enzymes of wood-rotting fungi *Pleurotus ostreatus*, *Trametes versicolor* and *Pictoporus betulinus*. **Research in Microbiology**, v.157, p.119-124, 2006.
- VIEILLE, C.; ZEIKUS, J.G. Hyperthermophilic enzymes: sources, uses and molecular mechanisms for thermostability. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, vol 65, n° 1, p. 1-43, 2001.
- 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.
- WIKINS, M.R. Effect of orange peel oil on ethanol production by *Zymomonas mobilis*. **Biomass and bioenergy**. *Article in press*, 2008.
- 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, 2008a.
- WU, Y.; ZHANG, S.; GUO, X.; HUANG, H. Adsorption of chromium (III) on lignin. **Bioresource Technology**, *in press*, 2008b.
- YANG, S.; HUANG, Z.; JIANG, Z.; LI, L. Partition and purification of a thermostable xylanase produced by *Paecilomyces thermophila* in solid-state fermentation using aqueous two-phase systems. **Process Biochemistry**, v. 43, p. 56-61, 2008.
- YANG, S.Q., YAN, Q.J., JIANG, Z.Q., LI, L.T., TIAN, H.M., WANG, Y.Z. High-level of xylanase production by the thermophilic *Paecilomyces thermophila* J18 on wheat straw in solid-state fermentation. **Bioresource Technology**, v.97, p.1794-1800, 2006.
- YANG, W. Z.; BEAUCHEMIN, K. A.; RODE, L. M. Effects of an feed additive on extent of digestion and milk production of lactating dairy cows. **Journal Dairy Science**, v. 82, p. 391 – 403, 1999.
- YANG, X., CHEN, H., GAO, H., LI, Z. Bioconversion of corn straw by coupling ensiling and solid-state fermentation. **Bioresource Technology**. v. 78, p. 277–280, 2001.
- YEOH.S.; SHI, J.; LANGRISH, T.A.G. Comparisons between different techniques for water-based extraction of pectin from orange peels. **Desalination**, v. 218, p. 229–237, 2008.
- XAVIER-SANTOS, S. **Diversidades, 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 Microbiologia Aplicada). Universidade Estadual Paulista, Rio Claro.

ZHANG, Q.; LO, C.-M.; JU, L.-K. Factors affecting foaming behavior in cellulase 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 usarii* and its expression in *Escherichia coli*. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 831-838, 2008.

ZIAIE-SHIRKOLAEI, Y.; TALEBIZADEH, A.; SOLTANALI, S. Comparative study on application of *T. lanuginosus* SSBP xylanase and commercial xylanase on biobleaching of non wood pulps. **Bioresource technology**, *In press*, 2008.

Autorizo a reprodução xerográfica para fins de pesquisa.

São José do Rio Preto, 05/03/2009

Assinatura