

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

APLICAÇÃO DE EXTRATOS ENZIMÁTICOS FÚNGICOS NA
ENSILAGEM DO MILHO

André Teixeira Lellis
Zootecnista

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL
Março de 2012

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

APLICAÇÃO DE EXTRATOS ENZIMÁTICOS FÚNGICOS NA
ENSILAGEM DO MILHO

André Teixeira Lellis

Orientador: Prof. Dr. Flávio Dutra de Resende

Co-orientadora: Profa. Dra. Eleni Gomes

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

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Março de 2012

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

ANDRÉ TEIXEIRA LELLIS – nascido no dia 03 de dezembro de 1984, na cidade de Ribeirão Preto, São Paulo, filho de Carlos Cesar Lellis e Maria Aparecida Malaspina Teixeira. Iniciou o curso de Zootecnia na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Campus de Jaboticabal em março de 2004 e obteve o título de Zootecnista em dezembro de 2008. Em março de 2010, ingressou no curso de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Campus de Jaboticabal, sob orientação do Professor Dr. Flávio Dutra de Resende.

EPÍGRAFE

“Ando devagar porque já tive pressa e levo esse sorriso porque já chorei demais. Hoje me sinto mais forte, mais feliz, quem sabe, só levo a certeza de que muito pouco sei, ou nada sei. Conhecer as manhas e as manhãs, o sabor das massas e das maçãs. É preciso amor pra poder pulsar, é preciso paz pra poder sorrir, é preciso a chuva para florir. Penso que cumprir a vida seja simplesmente compreender a marcha e ir tocando em frente, como um velho boiadeiro levando a boiada, eu vou tocando os dias pela longa estrada, eu vou, estrada eu sou. Todo mundo ama um dia, todo mundo chora, um dia a gente chega e no outro vai embora. Cada um de nós compõe a sua história, cada ser em si carrega o dom de ser capaz e ser feliz.”

Almir Sater e Renato Teixeira

A minha mãe, Maria Aparecida Malaspina Teixeira

Pelo estímulo e apoio na realização deste trabalho.

DEDICO

As minhas tias, Eloisa Helena Teixeira e Neide Malaspina Teixeira

Pelo carinho e pela força.

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS:

A minha família, pelo apoio, amizade, carinho e confiança que sempre demonstraram por mim;

As minhas três mães, por todo apoio, ajuda, carinho, amor e respeito durante todos os momentos.

Ao meu pai pelo apoio, carinho e confiança.

Ao Professor Dr. Flávio Dutra de Resende, pela orientação, confiança, compreensão e pela oportunidade concedida;

A Professora Eleni Gomes, pela orientação e por acreditar que esse trabalho valeria a pena.

Ao Professor Dr. Ricardo Andrade Reis, por participar da banca de qualificação e defesa e por todo aprendizado e paciência durante esses anos de convívio.

A Professora Daniela Alonso Bocchini Martins por aceitar participar da defesa e por todas as conversas e discussões, sempre muito proveitosas;

Ao Professor Ruben Pablo Schocken-Iturrino que participou da banca de qualificação com sugestões muito valiosas.

Dr. Marco Antonio Alves Balsalobre pelo auxílio.

Ao Dr. Gustavo Resende Siqueira pelos ensinamentos e orientação;

As companheiras de pesquisa Erika Graminha e Aline Gonçalves pelo apoio, ensinamentos e cobranças;

Ao meu grande amigo, Matheus Henrique Moretti, pelas conversas, discussões e ensinamentos, você foi de grande importância neste trabalho;

Ao Ruan Fonseca Segura Gabriel, pela parceria, amizade e ajuda. Obrigado pelo apoio e por acreditar no nosso trabalho.

Ao grande amigo de hoje e sempre, Juliano Corsino. Obrigado pelo apoio, motivação e por fazer parte dos momentos especiais na minha vida.

Aos irmãos da República Nostravamus, por sempre me receberem de braços abertos.

As eternas amigas Luciana (Lola), Ana Paula (Fuxica), Carla (Biskoita), Daniela (Pega-Leve), Cynthia (Lontra) e Maristela (Cerca) pelas ajuda e pelas risadas;

A Thays Quadros (Black) pelo incentivo e pela grande ajuda;

Aos grandes amigos Daniel, Chico, Batista e Candinho por sempre estarem do meu lado;

As companheiras de trabalho do IBILCE pelos ensinamentos e por sempre me receberem muito bem;

Aos companheiros de pós-graduação, João Marcos, Marcella e Raul e também a todos os estagiários da UNIFEB.

Aos funcionários do Pólo Regional de Desenvolvimento Tecnológico do Agronegócio, Apta – Alta Mogiana, pelo auxílio no desenvolvimento dos trabalhos;

A Universidade Estadual Paulista, UNESP – campus de Jaboticabal, pela oportunidade de realização do mestrado.

Aos professores da pós-graduação da UNESP de Jaboticabal, pelos valiosos ensinamentos;

A empresa Bellman Nutrição Animal, pela parceria e contribuição no experimento;

A Agência Paulista de Tecnologia do Agronegócio, APTA de Colina, pelo espaço concedido para realização deste trabalho;

A todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente na realização desse trabalho e da minha formação;

Obrigado!

SUMÁRIO

	Pág.
1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	
2.1. <i>Silagem de milho</i>	2
2.2. <i>Composição da parede celular de forrageiras</i>	3
2.2.1. <i>Celulose</i>	4
2.2.2. <i>Hemecelulose</i>	5
2.2.3. <i>Liginina</i>	7
2.3. <i>Enzimas que degradam material lignocelulósico</i>	8
2.3.1. <i>Celulases</i>	8
2.3.2. <i>Xilanases</i>	10
2.4. <i>Produção de enzimas por fermentação em estado solido (FES)</i>	11
2.5. <i>Utilização de resíduos para a produção de enzimas</i>	13
2.6. <i>Aplicação de enzimas na nutrição animal</i>	14

3. OBJETIVO

Objetivo geral 15

Objetivos específicos 15

4. MATERIAL E MÉTODOS 16

4.1. Micro-organismos..... 16

4.2. Substrato para fermentação em estado sólido (FES)..... 18

4.3. Obtenção do extrato enzimático pela FES 18

4.4. Determinação da atividade das celulases 21

4.5. Determinação da atividade das xilanases..... 22

4.6. Ensilagem e avaliação da silagem 22

4.7. Ensilagem 23

4.8. Amostragem e avaliações químico-bromatológicas 23

4.9. Determinação das perdas 24

4.10. Avaliação da digestibilidade 26

4.11. Tratamentos avaliados..... 26

4.12. Delineamento experimental e análise estatística..... 26

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO 27

6. CONCLUSÃO.....	52
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	53
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	54

LISTA DE FIGURAS

		Pág.
Figura 1	Estrutura do material lignocelulolítico. A) celulose – homopolímero formado por moléculas de B-D-glicose (hexose). B) Hemicelulose – constituída por pentoses. C) Lignina – formada pelos precursores álcool p-comarílico, álcool conerílico e álcool sinapílico (GRAMINHA et al., 2008).	4
Figura 2	Estrutura química da celulose mostrando a ligação B(1-4) entre os monômeros B-D-glicose e as ligações de hidrogênio que contribuem para insolubilidade e resistência do homopolímero (BUCKERIDGE, 2008).	5
Figura 3	Estrutura química que pode ocorrer na xilana mostrando a ligação B 1,4-glicosídica entre os monômeros D-xilanopiranosil e os grupos radicais o-acetil, α -L-arabinofuranosil, ácido 4-O-metil- α -D-glucopiranosil, ácido ferúlico e coumárico.	6
Figura 4	Estrutura da lignina encontrada em gimnospermas. Nas angiospermas, as unidades fenolpropanóides apresentam dois grupos metoxil em posição orto em relação ao oxigênio (PÉREZ et al., 2002).	7
Figura 5	Representação esquemática da ação sinérgica das celulasas (DA-SILVA, 1992).	10
Figura 6	(A) Enzimas xilanolíticas envolvidas na degradação da xilana. Ac: grupo acetil; α -Araf: α arabinofuranosideo; α -4-O-Me-GlcA: ácido α -4-O-metilglicurônico. B) Hidrolise dos xilooligossacarídeos pela β – xilosidase (POLIZELI et al., 2005).	11
Figura 7	<i>Thichoderma reesei</i> QM9414 crescido em placa no meio PDA.	17
Figura 8	<i>Thermoascus aurantiacus</i> CBMAI756 crescido em placa no meio Saboraud.	18
Figura 9	Pré-inóculo do fungo <i>Trichoderma reesei</i> .	19
Figura 10	Pré-inóculos do fungo <i>Thermoascus aurantiacus</i> .	19
Figura 11	Micro-organismos crescidos no substrato antes da retirada dos extratos enzimáticos	21
Figura 12	Medida de pH de silagens de milho ensilada com quatro doses de extratos enzimáticos do fungo <i>Thermoascus aurantiacus</i> após a abertura (0,10, 20 e 40 mL de extrato/Kg de MN).	34
Figura 13	Perdas por efluente da silagem de milho ensilada com quatro doses	35

	de extratos enzimáticos do fungo <i>Trichoderma reesei</i> (0,10, 20 e 40 mL de extrato/Kg de MN).	
Figura 14	Perdas por efluente da silagem de milho ensilada com quatro doses de extratos enzimáticos de fungo <i>Thermoascus aurantiacus</i> (0,10, 20 e 40 mL de extrato/Kg de MN).	36
Figura 15	Perdas de gases durante a ensilagem de milho com adição de quatro doses de extratos enzimáticos <i>Trichoderma reesei</i> (0,10, 20 e 40 mL de extrato/Kg de MN).	37
Figura 16	Perdas de gases durante a ensilagem de milho com adição de quatro doses de extratos enzimáticos do fungo <i>Thermoascus aurantiacus</i> (0,10, 20 e 40 mL de extrato/Kg de MN).	37
Figura 17	Recuperação de matéria seca após ensilagem de milho com adição de quatro doses de extratos enzimáticos do fungo <i>Trichoderma reesei</i> (0,10, 20 e 40 mL de extrato/Kg de MN).	38
Figura 18	Recuperação de matéria seca após ensilagem de milho com adição de quatro doses de extratos enzimáticos do fungo <i>Thermoascus aurantiacus</i> (0,10, 20 e 40 mL de extrato/Kg de MN).	39
Figura 19	Teor de matéria seca (MS) da silagem de milho com adição de quatro doses de extratos enzimáticos do fungo <i>Trichoderma reesei</i> (0,10, 20 e 40 mL de extrato/Kg de MN).	40
Figura 20	Teor de matéria seca (MS) da silagem de milho com adição de quatro doses de extratos enzimáticos do fungo <i>Thermoascus aurantiacus</i> (0,10, 20 e 40 mL de extrato/Kg de MN).	41
Figura 21	Teor de matéria mineral da silagem de milho com adição de quatro doses de extratos enzimáticos do fungo <i>Trichoderma reesei</i> (0,10, 20 e 40 mL de extrato/Kg de MN).	42
Figura 22	Digestibilidade in vitro da matéria seca da silagem de milho com adição de quatro doses de extratos enzimáticos do fungo <i>Thermoascus aurantiacus</i> (0,10, 20 e 40 mL de extrato/Kg de MN).	44
Figura 23	Recuperação de proteína bruta da silagem de milho com adição de quatro doses de extratos enzimáticos do fungo <i>Trichoderma reesei</i> (0,10, 20 e 40 mL de extrato/Kg de MN).	46
Figura 24	Recuperação de proteína bruta da silagem de milho com adição de quatro doses de extratos enzimáticos do fungo <i>Thermoascus aurantiacus</i> (0,10, 20 e 40 mL de extrato/Kg de MN).	47
Figura 25	Recuperação de FDN da silagem de milho com adição de quatro doses de extratos enzimáticos do fungo <i>Trichoderma reesei</i> (0,10, 20 e 40 mL de extrato/Kg de MN).	49

Figura 26	Recuperação de FDA da silagem de milho com adição de quatro doses de extratos enzimáticos do fungo <i>Trichoderma reesei</i> (0,10, 20 e 40 mL de extrato/Kg de MN).	49
Figura 27	Recuperação de FDN da silagem de milho com adição de quatro doses de extratos enzimáticos do fungo <i>Thermoascus aurantiacus</i> (0,10, 20 e 40 mL de extrato/Kg de MN).	50
Figura 28	Recuperação de FDA da silagem de milho com adição de quatro doses de extratos enzimáticos do fungo <i>Thermoascus aurantiacus</i> (0,10, 20 e 40 mL de extrato/Kg de MN).	50
Figura 29	Recuperação de lignina da silagem de milho com adição de quatro doses de extratos enzimáticos do fungo <i>Thermoascus aurantiacus</i> (0,10, 20 e 40 mL de extrato/Kg de MN).	51

LISTA DE TABELAS

		Pág.
Tabela 1	Solução nutriente.	20
Tabela 2	Atividade de celulases e xilanases a 60°C (U/g) após os períodos de cultivo pré determinados (168h).	28
Tabela 3	Atividade de celulases e xilanases a 60°C (U/mL) do extrato enzimático bruto utilizado na ensilagem.	28
Tabela 4	Atividade de enzimas celulolíticas e hemilolíticas a 60°C (U/g) após os períodos de cultivo pré determinados (168h).	29
Tabela 5	Atividade de celulases e xilanases a 60°C (U/mL) do extrato enzimático bruto utilizado na ensilagem.	29
Tabela 6	Composição químico-bromatológica do milho em função dos tratamentos estabelecidos antes da ensilagem (Fungo <i>T. reesei</i>).	30
Tabela 7	Composição químico-bromatológica do milho em função dos tratamentos estabelecidos antes da ensilagem (<i>T. aurantiacus</i>).	31
Tabela 8	Valores de pH e perdas da silagem de milho tratadas com doses do extrato enzimático do fungo <i>Trichoderma reesei</i> .	32
Tabela 9	Valores de pH e perdas da silagem de milho tratadas com doses do extrato enzimático do fungo <i>Thermoascus aurantiacus</i> .	33
Tabela 10	Composição bromatológica de silagens de milho tratadas com doses do extrato enzimático do fungo <i>Trichoderma reesei</i> .	39
Tabela 11	Composição bromatológica de silagens de milho tratadas com doses do extrato enzimático do fungo <i>Thermoascus aurantiacus</i> .	40
Tabela 12	Recuperações de PB, FDN, FDA e lignina após fermentação de silagens de milho tratadas com doses do extrato enzimático do fungo <i>Trichoderma reesei</i> .	45
Tabela 13	Recuperações de PB, FDN, FDA e lignina após fermentação de silagens de milho tratadas com doses do extrato enzimático do fungo <i>Thermoascus aurantiacus</i> .	45

Tabela 14	Valores de conteúdo celular referentes aos carboidratos (%) antes da ensilagem e após a abertura dos silos e aumento percentual para cada tratamento dos fungos <i>T. reesei</i> e <i>T. aurantiacus</i> .	52
-----------	--	----

LISTA DE ABREVIATURAS

CEL = Celulose

CNF = Carboidratos não fibrosos

DIVMS = Digestibilidade *in vitro* da matéria seca

FDA = Fibra em detergente ácido

FDN = Fibra em detergente neutro

FES = Fermentação em estado sólido

HEM = Hemicelulose

LIG = Lignina

MM = Matéria mineral

MN = Matéria Natural

MS = Matéria Seca

PB = Proteína bruta

PDA = Potato Dextrose Ágar

PG = Perda por gases

RMS = Recuperação de matéria seca

APLICAÇÃO DE EXTRATOS ENZIMÁTICOS FUNGICOS NA ENSILAGEM DO MILHO

RESUMO – Objetivou-se produzir enzimas fibrolíticas por fermentação em estado sólido com os fungos *Trichoderma reesei* e *Thermoascus aurantiacus* e avaliar a ensilagem do milho com adição de doses dos extratos enzimáticos produzidos (0; 143,4; 286,8 e 573,6 U CMCase/Kg de matéria natural e 0; 1800,9; 3601,8 e 7203,6 U CMCase//Kg de matéria natural, respectivamente), em delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições para cada tratamento. Avaliou-se o valor nutritivo da forragem antes da ensilagem e após a abertura dos silos. Após 168h de fermentação, em substrato contendo bagaço de cana-de-açúcar e farelo de trigo (1:1), foi retirado cada extrato enzimático bruto. O extrato do fungo *T. reesei* continha 14,34 U/mL de CMCase, 1,03 U/mL de β -glicosidase, 74,60 U/mL de Xilanase e 0,48 U/mL de β -xilosidase e do *T. aurantiacus* continha 180,91 U/mL de CMCase, 6,02 U/mL de β -glicosidase, 719,98 U/mL de Xilanase e 0,17 U/mL de β -xilosidase. A adição dos extratos enzimáticos dos fungos *T. reesei* e *T. aurantiacus*, possibilitou queda na recuperação de matéria seca, com $Y=96,02-0,1205x$ ($R^2=0,48$) e $Y=95,625-0,1262x$ ($R^2=0,56$), aumento nas perdas por gás com $Y=23,27+0,0843x$ ($R^2=0,29$) e $Y=19,983+0,2863x$ ($R^2=0,39$) e queda no teor de N-NH₃/NT com $Y=3,9243-0,0434x$ ($R^2=0,54$) e $Y=3,355-0,141x+0,0028x^2$ ($R^2=0,56$) respectivamente. Também se observou menor recuperação de FDN com $Y=72,611-0,1247x$ ($R^2=0,52$) e $Y=74,819-0,1683x$ ($R^2=0,50$) e FDA com $Y=89,841-0,2642x$ ($R^2=0,53$) e $Y=97,181-0,3717x$ ($R^2=0,72$) para os fungos *T. reesei* e *T. aurantiacus*, respectivamente. Como consequência propiciou menores valores de DIVMS com $Y=75,364-0,1034x$ ($R^2=0,51$) para o *T. aurantiacus*. Esses valores podem ser atribuídos pela atuação das enzimas presentes no extrato, removendo barreiras estruturais, com um maior aproveitamento do conteúdo celular pelas bactérias fermentadoras no material ensilado.

Palavras-chave: digestibilidade, enzimas, forragem, fungos.

APPLICATION OF FUNGI ENZYMATIC EXTRACTS IN THE CORN ENSILING

ABSTRACT – The aim of this research is to product fibrolitic enzymes by solid state fermentation with *Trichoderma reesei* and *Thermoascus aurantiacus* fungi and to analyze the corn ensiling with crescent concentrations of enzymatic extracts produced (0; 143,4; 286,8 e 573,6 U CMCase/Kg of wet material and 0; 1800,9; 3601,8 e 7203,6 U CMCase//Kg of wet material, respectively), in delineation completely casualized, with four replications for each treatment. We evaluated the nutritional value of forage was measured before and after opening silos. After 168h of fermentation using sugar cane bagasse and wheat bran (1:1) as substrate it was collected each crude enzymatic extract. The *T. reesei* crude extract contained 14,34U/ml of CMCase, 1,03 U/mL of β -glycosidase, 74,60 U/mL of Xylanase and 0,48 U/mL de β -xylosidase. The *T. aurantiacus* crude extract contained 180,91 U/mL of CMCase, 6,02 U/mL of β -glycosidase, 719,98 U/mL de Xylanase and 0,17 U/mL de β -xylosidase. The addiction of fungus enzymatic extract of *T. reesei* and *T. aurantiacus* enabled the overthrow in the recuperation of dry matter, with $Y=96,02-0,1205x$ ($R^2=0,48$) and $Y=95,625-0,1262x$ ($R^2=0,56$), increase in waste by gas with $Y=23,27+0,0843x$ ($R^2=0,29$) and $Y=19,983+0,2863x$ ($R^2=0,39$) and downfall in the N-NH₃/NT content with $Y=3,9243-0,0434x$ ($R^2=0,54$) and $Y=3,355-0,141x+0,0028x^2$ ($R^2=0,56$) respectively. Furthermore, it was observed less recuperation of NDF with $Y=72,611-0,1247x$ ($R^2=0,52$) and $Y=74,819-0,1683x$ ($R^2=0,50$) and ADF with $Y=89,841-0,2642x$ ($R^2=0,53$) and $Y=97,181-0,3717x$ ($R^2=0,72$) for *T. reesei* and *T. aurantiacus*, respectively. As a consequence, it propitiated lower values of DIVMS with $Y=75,364-0,1034x$ ($R^2=0,51$) for *T. aurantiacus*. These values may be attributed by the action of the enzymes present in crude extract, removing structural barriers, with a major use of the cellular content by bacteria in the silage material.

Keywords: digestibility, enzymes, forage, fungi.

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Nos sistemas de produção de ruminantes, grande parte (40 a 90%) das exigências nutricionais é atendida por meio de volumosos. Em algumas regiões do país, os rebanhos destinados a produção de carne e leite dependem de forragens conservadas para o suprimento de nutrientes durante os períodos de escassez de alimentos.

O aproveitamento de alimentos fibrosos pelos ruminantes, está relacionado à síntese e secreção de enzimas pelos micro-organismos do rúmen, promovendo a hidrólise da parede celular das plantas. Entretanto, a conversão dos alimentos, especialmente os fibrosos, para produção de carne e leite tem sido pouco eficiente (VARGA & KOLVER, 1997), refletindo a necessidade de novos programas biotecnológicos de alimentação animal com o objetivo de maximizar a utilização dos nutrientes.

A aplicação de enzimas fibrolíticas exógenas na alimentação dos ruminantes são alvos de estudos (BEAUCHEMIN et al., 1999; HRISTOV et al., 2000), sendo que as enzimas fibrolíticas poderiam potencializar a degradação dos polissacarídeos estruturais juntamente com as enzimas produzidas pelos micro-organismos do rúmen, estimulando a taxa de degradação da fibra (NEWBOLD, 1997).

Entretanto, as inúmeras variações quanto a padronização das preparações enzimáticas e formas de aplicação, entre outras, proporcionam resultados inconsistentes, tornando difíceis a avaliação e comparação do efeito das enzimas sobre a fermentação da silagem e o desempenho de animais (LOURDES et al., 2005).

Desta forma, dentre as diferentes estratégias de aplicação, o presente trabalho avaliou a adição das enzimas antes da ensilagem.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. *Silagem de milho*

O processo de ensilagem é uma alternativa muito empregada nos sistemas de criação animal. Consiste na preservação de forragens úmidas, recém-colhidas, por meio de um processo fermentativo, baseado na produção de ácidos orgânicos, principalmente o ácido lático, a partir de açúcares solúveis, o que promove redução do pH e, conseqüentemente, inibição de micro-organismos deletérios indesejáveis.

Assim, a anaerobiose e a queda do pH são os fatores responsáveis pela preservação da forragem estocada, fazendo com que os micro-organismos capazes de deteriorar a silagem sejam inibidos pelo efeito dos ácidos produzidos durante a fermentação (DRIEHUIS et al., 1999; PAHLOW et al., 2003).

O milho é a cultura padrão para ensilagem, pela tradição no cultivo, pela elevada produtividade e pelo bom valor nutricional. Assim, a silagem de milho é uma alternativa de alimento volumoso fundamental na cadeia produtiva intensiva tanto de bovinos de corte ou leite, em função dos índices de produtividade da cultura, da estabilidade de produção, do valor nutritivo e da concentração de energia (NEUMANN, 2006).

Inúmeros fatores afetam a qualidade da silagem de milho e, sem dúvida, um dos principais refere-se às características químicas da planta a ser ensilada. Desta forma, tem-se que os carboidratos solúveis da planta afetam a qualidade da silagem, influenciando diretamente o processo de fermentação, enquanto o conjunto de carboidratos estruturais e não estruturais tem marcada influencia no processo digestivo do animal

Quanto aos fatores ligados à acidificação da massa, eles são obtidos quando ocorre predominantemente fermentação homolática e podem ser alcançados com facilidade na cultura do milho, devido a alta concentração de carboidratos solúveis, baixo poder tamponante e umidade (ALLEN et al., 2003).

2.2. *Composição da parede celular de forrageiras*

A parede celular é classificada como um conjunto de polímeros em que as microfibrilas de celulose são envolvidas por hemiceluloses, sendo este domínio imerso em uma matriz de polímeros pécticos, a qual “preenche” todo o sistema (BUCKERIGE et al., 2000). Paciullo (2002) classifica quimicamente a parede celular como uma matriz complexa composta por proteínas, complexos fenólicos, água, minerais e polissacarídeos como celulose, hemiceluloses e pectina. Sua composição química varia com o tipo de material.

Os carboidratos são, geralmente, unidos à lignina por ligações de hidrogênio, mas também por algumas ligações covalentes, essas ligações são bastante fortes, resultando em uma estrutura de difícil degradação (LEE, 1997) (Figura 1). A dificuldade na degradação da lignocelulose está associada, também, a composição aromática da lignina que ao ser decomposta, forma compostos bastante tóxicos, como furfural e hidroximetilfurfural (MUSSATO & ROBERTO, 2004).

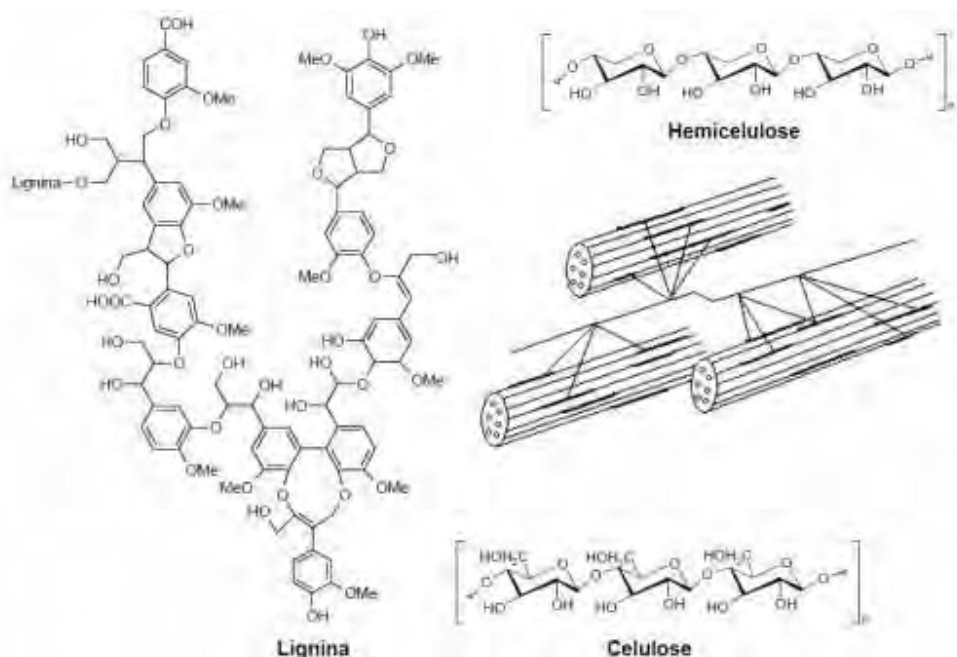


Figura 1. Estrutura do material lignocelulolítico. A) celulose – homopolímero formado por moléculas de B-D-glicose (hexose). B) Hemicelulose – constituída por pentoses. C) Lignina – formada pelos precursores álcool p-comarílico, álcool conerílico e álcool sinapílico (GRAMINHA et al., 2008).

2.2.1. Celulose

A celulose é um homopolímero linear de β -D-glicose unido por ligações $\beta(1\rightarrow4)$ que foi descoberto e isolado pela primeira vez por volta de 1850 e desde então muitos estudos foram realizados (O'SULLIVAN, 1997). Na natureza corresponde à cerca de 40% do peso seco total das plantas superiores e é o composto orgânico mais abundante (PALMA-FERNANDEZ, 2002).

Sua composição varia de 8000 a 12000 resíduos de glicose/cadeia, aproximadamente, e cada molécula relaciona-se com a seguinte por um ângulo de 180° através da ligação $\beta(1\rightarrow4)$ e por ligações de hidrogênio entre o oxigênio do anel, e o grupamento hidroxila na posição 3 da molécula seguinte, e entre as hidroxilas das posições 2 e 6, conformação esta que permite que longas cadeias lineares sejam formadas (DA-SILVA *et al.*, 1997; NELSON; COX, 2004; PALMA-FERNANDEZ, 2002) – Figura 2.

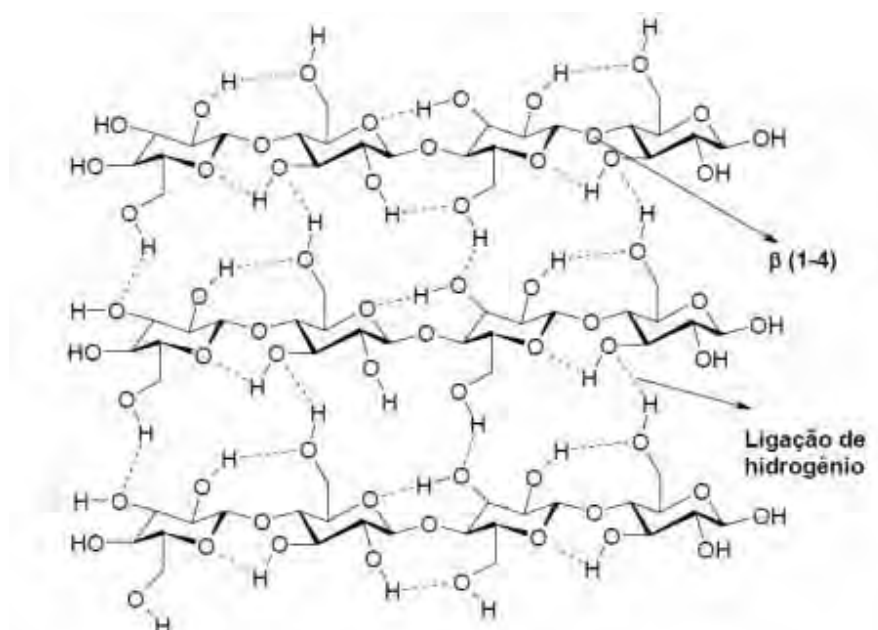


Figura 2: Estrutura química da celulose mostrando a ligação $\beta(1-4)$ entre os monômeros B-D-glicose e as ligações de hidrogênio que contribuem para insolubilidade e resistência do homopolímero (BUCKERIDGE et al., 2008).

As fibras de celulose são divididas em regiões cristalinas, de difícil degradação e regiões amorfas. As regiões cristalinas são formadas pela configuração paralela das cadeias lineares, o que resulta na formação de pontes de hidrogênio intermoleculares, contribuindo para a insolubilidade da celulose e sua baixa reatividade, ao mesmo tempo tornando-a mais resistente à hidrólise ácida, dificultando a entrada de água e modificando a elasticidade das fibras (DA-SILVA et al., 1997; BOBBIO; BOBBIO, 2003; NELSON; COX, 2004).

2.2.2. Hemicelulose

O termo hemicelulose foi primeiramente introduzido por Schulze (1891) para a fração isolada ou extraída de plantas que é solúvel em álcali. São heteropolímeros de xilose, galactose, manose, arabinose e outros tipos de

açúcares e ácidos urônicos. É o maior polissacarídeo estrutural das células vegetais e o segundo polissacarídeo mais abundante na natureza, calcula-se que esteja entre as três maiores fontes de carbono orgânico renovável (BEG et al., 2001; COLLINS et al., 2005; KATAPODIS et al., 2006).

A xilana é o principal e mais abundante polissacarídeo componente da hemicelulose, trata-se de um complexo polissacarídico composto por uma estrutura principal de resíduos de D-xilanopiranosil unidos por ligações β -1,4-glicosídicas e ramificações de grupos o-acetil, α -L-arabinofuranose, ácido 4-O-metil- α -D-glucopiranosil, podendo ainda conter resíduos de ácido ferúlico e coumárico esterificados – Figura 3 (BEG et al., 2001; HALTRICH, et al., 1996).

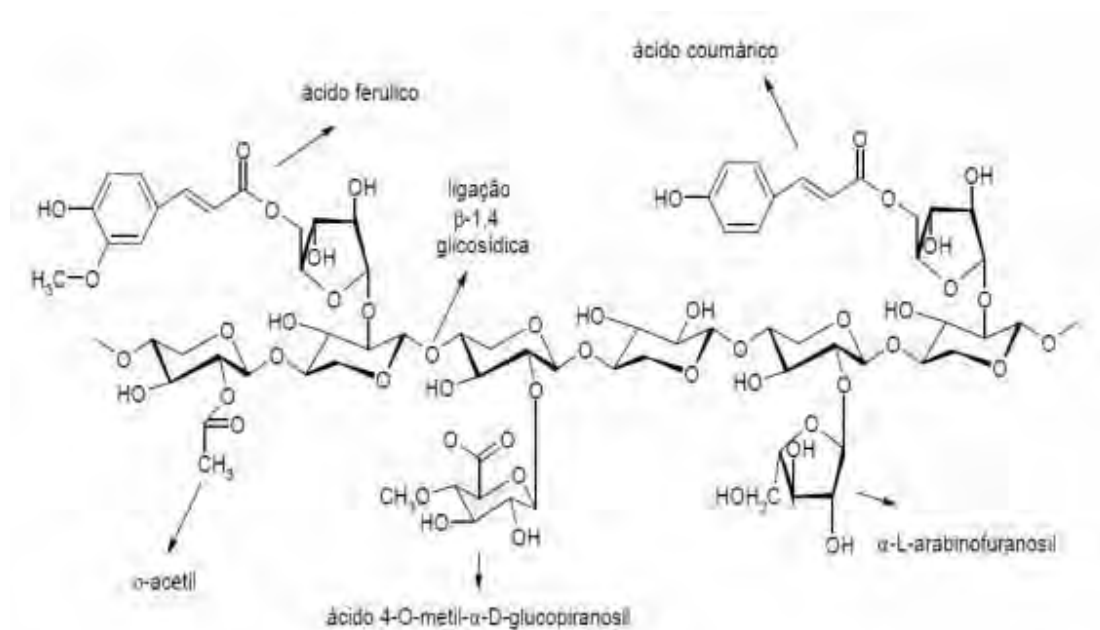


Figura 3. Estrutura química que pode ocorrer nas xilanas mostrando a ligação β 1,4-glicosídica entre os monômeros D-xilanopiranosil e os grupos radicais o-acetil, α -L-arabinofuranosil, ácido 4-O-metil- α -D-glucopiranosil, ácido ferúlico e coumárico.

2.2.3. Lignina

A lignina (Figura 4) é o segundo composto mais abundante na natureza, depois da celulose e hemicelulose, sendo considerada uma macromolécula amorfa, resultante da condensação de unidades fenilpropanóides (álcool coniferílico, álcool sinapílico e álcool p-cumarílico) derivadas de fenilalanina, conectadas por diferentes ligações éter (C-O-C) e carbono-carbono (C-C) (HIGUCHI, 2004; PAPINUTTI; FORCHIASSIN, 2007; HENDRIKS; ZEEMAN, 2009).

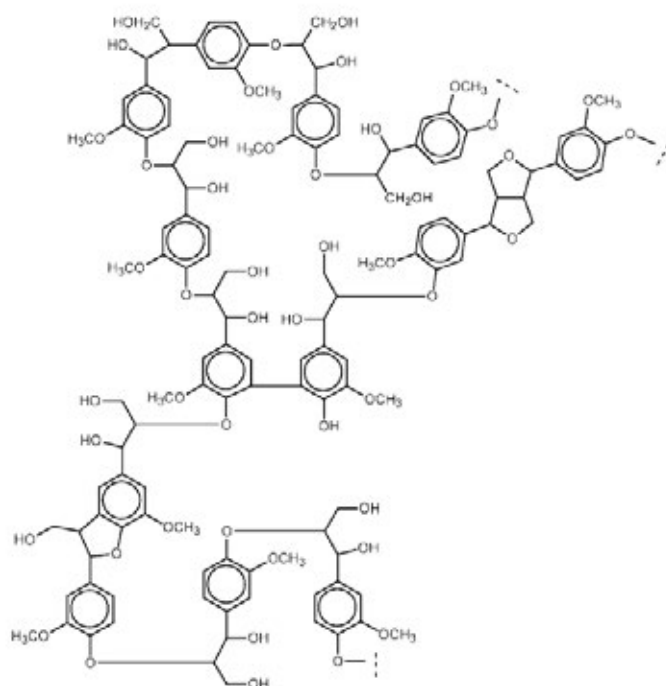


Figura 4. Estrutura da lignina encontrada em gimnospermas. Nas angiospermas, as unidades fenolpropanóides apresentam dois grupos metoxil em posição orto em relação ao oxigênio (PÉREZ et al., 2002).

A principal função da lignina é dar resistência às plantas contra ataques de enzimas produzidas por fitopatógenos, ao estresse oxidativo além de conferir rigidez aos tecidos vegetais (SANDGREN et al. 2005; HENDRIKS; ZEEMAN,

2009). Ela é depositada na rede de carboidratos da parede celular secundária das plantas, durante o seu crescimento (SANDGREN et al., 2005). Mesmo após a morte da planta, a lignina continua dificultando o acesso dos micro-organismos decompositores às suas fontes de celulose e de hemiceluloses (LEONOWICZ et al., 1999).

2.3. Enzimas que degradam material lignocelulósico

As enzimas desempenham a função de catalisar as reações nos organismos e, com exceção de alguns RNAs (ribozimas), todas as enzimas são proteínas. Estas proteínas apresentam várias propriedades que as tornam atrativas em processos industriais como alta atividade catalítica em comparação com os catalisadores convencionais (DALLA-VECCHIA; et al., 2004) e alta eficiência em condições reacionais consideravelmente brandas de temperatura, pH e pressão, exigindo menor consumo energético e minimizando a degradação térmica dos produtos finais. Além disso, em função da seletividade enzimática é possível à obtenção de produtos específicos, que dificilmente seriam obtidos por reações químicas convencionais (GUNSTONE, 1999).

2.3.1. Celulases

A produção de celulases por microorganismos ocorre, principalmente, por bactérias e fungos filamentosos, havendo poucos relatos de produção por leveduras (SANDGREN et al., 2005).

A hidrólise enzimática de material celulósico até glicose envolve a ação sinérgica de no mínimo três diferentes enzimas: endoglucanase (EC 3.2.1.4), exoglucanase (EC 3.2.1.91) e a β -glicosidase (EC 3.2.1.21) (DA-SILVA et al., 1997; PALMA-FERNANDEZ, 2002).

Endoglucanase ou endo- β -1,4-glucanase (EC. 3.2.1.4) hidrolisa as cadeias ao acaso, atacando os polímeros internamente, resultando em uma rápida redução no tamanho da cadeia ou grau de polimerização (DA-SILVA, 1992). Essas enzimas hidrolisam a celulose amorfa e celuloses modificadas quimicamente (solúveis), como a carboximetilcelulose e hidroxietilcelulose (HEC) (LI et al., 2005).

Exoglucanase, ou exo- β -1,4-glucanase, ou celobiohidrolase (EC. 3.2.1.91) atua sobre a celulose cristalina, removendo unidades de celobiose a partir de extremidades (DA-SILVA, 1992).

As β -glucosidases (EC 3.2.1.21) (celobiase) por sua vez, hidrolisam celobioses e, em alguns casos, outros oligossacarídeos curtos a glicose (MAHESHWARI et al, 2000; MARTINS et al, 2008; FUKUDA et al, 2009).

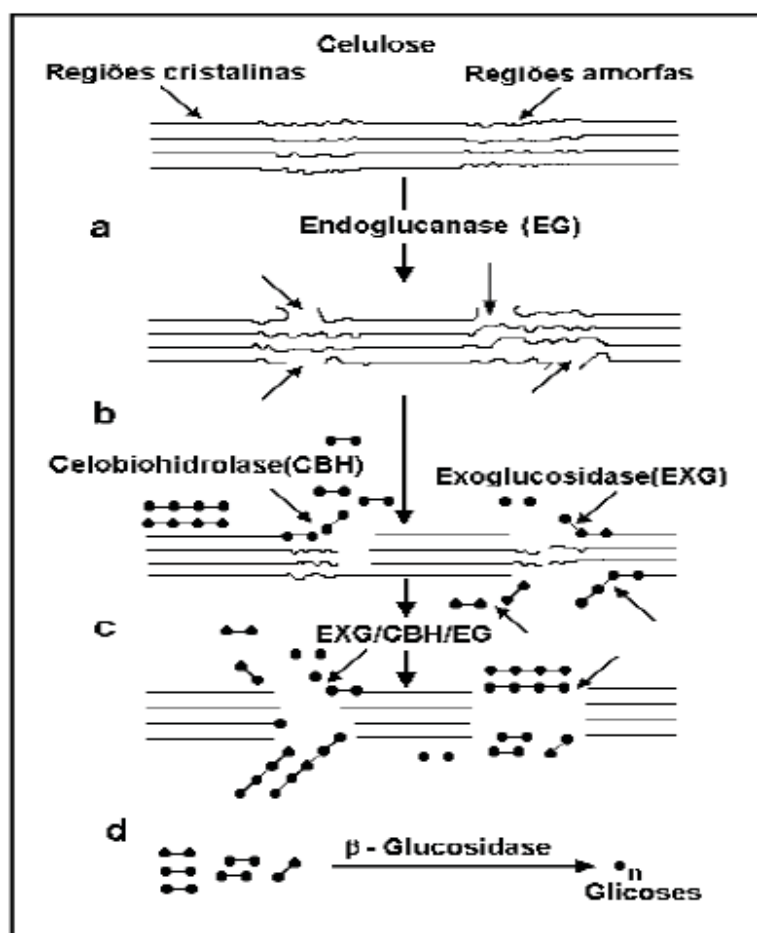


Figura 5. Representação esquemática da ação sinérgica das celulases (DA-SILVA, 1992).

2.3.2. Xilanases

São enzimas que tem como substrato a xilana. A degradação enzimática completa de uma molécula de xilana nativa requer a ação de várias enzimas. As β -1,4-endoxilanases quebram as ligações glicosídicas internas do esqueleto da heteroxilana, resultando em uma redução no grau de polimerização do substrato. Os xilooligossacarídeos são os principais produtos formados pela ação dessa enzima. As β -xilosidases são exoglicosidases que hidrolisam pequenos

xilooligossacarídeos e xilobiase, a partir da extremidade não redutora, para liberar xilose. Também importantes são as β -L-arabinofuranosídeses: dois tipos de arabinases, a exo- β -L-arabinofuranosíde, que hidrolisa as ligações das ramificações de arabinoses, e a endo-1,5- β -L-arabinofuranosíde, que é ativa apenas próxima às arabinoses lineares. Outras enzimas que também agem na hemicelulose são: β -D-glucuronídeses, esterases acetilxilana, e esterases ácidas ferúlicas (POLIZELI et al., 2005) - Figura 6.

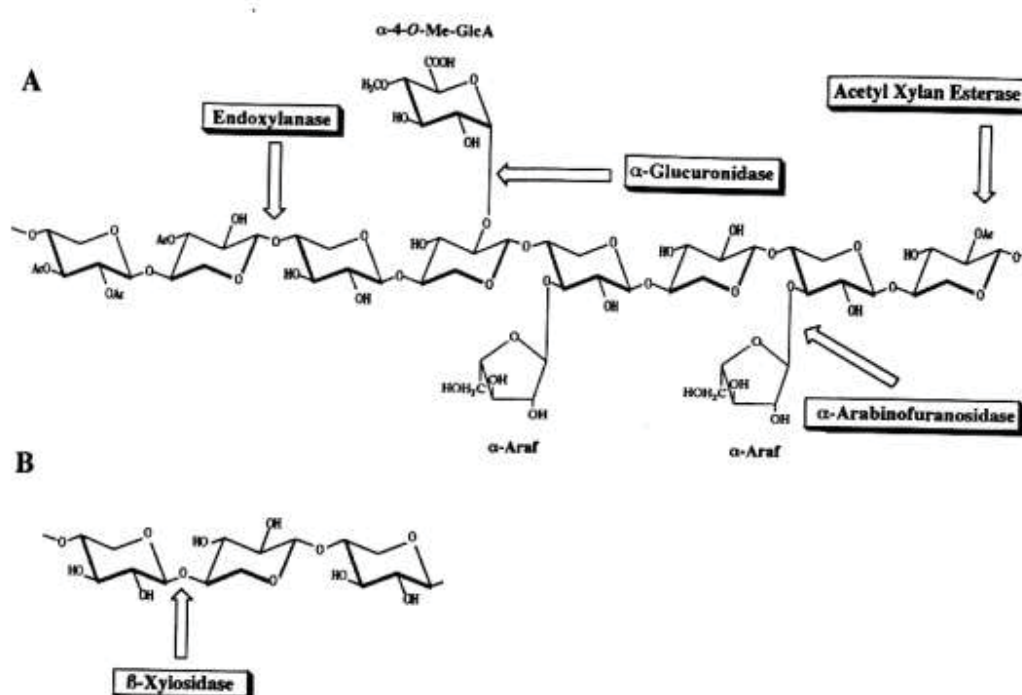


Figura 6. (A) Enzimas xilanolíticas envolvidas na degradação da xilana. Ac: grupo acetil; α -Araf: α arabinofuranosídeo; α -4-O-Me-GlcA: ácido α -4-O-metilglucurônico. B) Hidrólise dos xilooligossacarídeos pela β -xilosidase (SUNNA; ANTRANIKIAN, 1997).

2.4. Produção de Enzimas por Fermentação em Estado Sólido (FES)

Em termos industriais, aceita-se a denominação fermentação ou processo fermentativo para caracterizar qualquer transformação intermediada por um

microorganismo através de uma sequência de reações bioquímicas. Assim, são considerados, também, processos fermentativos, as transformações envolvendo respiração microbiana, biossíntese, fotossíntese e respiração com substratos inorgânicos. (BARROS et al., 2002)

A fermentação em estado sólido (FES) é definida como aquela que envolve o crescimento de um microorganismo sobre um substrato sólido, que pode ser usado como fonte de carbono e energia ou apenas como suporte inerte, com mínima quantidade de água livre entre as partículas (GUTIERREZ-ROJAS; FAVELA-TORRES, 1992; CANNEL; MOO-YONG, 1980; LONSANE et al, 1992; MITCHELL et al, 2002; PANDEY, 2002).

A FES tem se apresentado como uma alternativa válida para a produção de enzimas por fungos filamentosos visto a possibilidade de se reproduzir às condições de crescimento deste tipo de microorganismo e o baixo valor econômico necessário.

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

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

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

Os fungos filamentos são considerados melhor adaptados ao processo de FES porque têm facilidade de acesso ao substrato, uma vez que as hifas do micélio penetram nos tecidos vegetais melhor do que bactérias e actinomicetos e dessa forma, têm acesso ao conteúdo celular indisponível para outros micro-organismos do mesmo ambiente. A colonização se dá pelo crescimento das hifas na superfície externa e interna das partículas (SANTOS et al, 2004).

2.5. Utilização de resíduos para produção de enzimas

Diante da possibilidade de se utilizar enzimas como aditivos em suplementos e rações, uma variável importante é o custo das mesmas. Considerando-se que os processos de produção ainda são bastante onerosos, e que o meio de fermentação é um dos componentes importantes para preço final do produto, faz-se necessária a busca de substratos de baixo custo e alto rendimento para o processo fermentativo.

Uma vez que o interesse pela produção de enzimas por fermentação sólida tem crescido significativamente no mundo, acompanhada pela crescente importância industrial das enzimas, o uso deste tipo de fermentação, associado ao aproveitamento de substratos facilmente disponíveis e de baixo custo, como os resíduos agroindustriais, pode tornar essa técnica economicamente vantajosa para aplicação na produção pecuária bovina. Para os países subdesenvolvidos, ou em fase de crescimento, onde a crise atual e a globalização da economia mundial

não permitem que todo o setor agropecuário acompanhe evolução biotecnológica, estes processos apresentam uma oportunidade a ser considerada.

A FES é uma das técnicas que utiliza resíduos agroindustriais como substrato, inclusive alguns autores ressaltam que a principal característica da FES é a utilização desses resíduos, o que resulta na redução do custo, devido à disponibilidade e baixo valor, além da importância ambiental de se dar uma destinação adequada aos resíduos (CASTILHO et al., 2000; SOARES et al., 2000).

Diversos produtos podem ser utilizados como substrato para produção de enzimas, entre eles, palha de arroz e de trigo, farelos de trigo, milho e arroz; bagaços de cana-de-açúcar e laranja, resíduo de banana e espiga de milho, (GRAMINHA et al., 2008; MARTINS, 2006).

Na FES, além da função de fornecer nutrientes, o substrato é utilizado como suporte para o crescimento microbiano (LEE, 1997; MARTIN, 2006; DILLON, 2004). O substrato que é capaz de fornecer todos nutrientes é chamado de substrato ideal, porém a maioria dos substratos necessita da adição de nutrientes para o desenvolvimento de micro-organismos (PALMA, 2003).

Outro fator importante na seleção do substrato é o tamanho das partículas, as partículas pequenas oferecem maior superfície de contato, possibilitando maior acesso do microrganismo aos nutrientes, mas dificulta a aeração e disponibilidade de oxigênio entre os grãos, limitando o crescimento microbiano, já as partículas grandes oferecem o oxigênio necessário ao microrganismo, mas dificulta o acesso do microrganismo ao interior dos grãos, limitando a superfície de contato do substrato e dificultando a transferência de massa (PALMA, 2003).

2.6. Aplicação de enzimas na nutrição animal

De acordo com Newbold (1997), as enzimas fibrolíticas poderiam potencializar a degradação dos polissacarídeos estruturais juntamente com as

enzimas produzidas pelos micro-organismos do rúmen, estimulando a taxa de degradação da fibra.

Considerando que nem todos os sítios de ligação do substrato disponíveis para a atuação das enzimas microbianas estejam ocupados, o aumento na concentração de enzimas (celulase e xilanase) poderia proporcionar aumento na taxa de digestão da parede celular no rúmen com o auxílio da atividade microbiana (DEHORITY & TIRABASSO, 1998).

Morgavi et al. (2000), avaliando o efeito da combinação de enzimas microbianas e extraídas do fungo *Trichoderma longibrachiatum* na degradação da silagem de milho, observaram que a complexidade da estrutura química da silagem de milho causou variações nas respostas com a combinação destas misturas enzimáticas. Segundo esses autores, a celulase seria mais limitante na degradação da fibra da silagem de milho que a xilanase.

A redução dos conteúdos de fibra em detergente neutro e de fibra em detergente ácido da forragem ensilada pela adição de enzimas fibrolíticas é uma das vantagens a ser destacada, tendo em vista a possibilidade de aumento da ingestão e da eficiência da digestão de matéria seca, quando oferecida aos ruminantes (CYSNEIROS et al., 2006).

3. OBJETIVO

Produzir extratos enzimáticos brutos de origem fúngica por fermentação em estado sólido, aplicar na ensilagem do milho e avaliar o efeito das enzimas na fermentação e digestibilidade da silagem.

Objetivos específicos

- Produzir celulasas e xilanases com os fungos *Trichoderma reesei* e *Thermoascus aurantiacus*.

- Aplicar os extratos enzimáticos durante a ensilagem e determinar modificações no processo fermentativo, composição química e digestibilidade das silagens de milho..
- Avaliar qual dose dos dois extratos enzimáticos produzidos é necessária para melhorar o processo fermentativo, composição química e digestibilidade da silagem de milho.

4. MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi dividido em duas fases. A primeira realizada no Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada, IBILCE – Unesp, campus de São Jose do Rio Preto, onde os extratos enzimáticos foram produzidos. A segunda fase no Pólo Regional de Desenvolvimento Tecnológico dos Agronegócios da Alta Mogiana, localizado no município de Colina – SP, onde as enzimas foram aplicadas na ensilagem do milho e foram realizadas as avaliação da silagem após abertura dos silos.

4.1. Micro-organismos

Para a produção dos extratos enzimáticos foram utilizados o fungo mesofílico *Thichoderma reesei* QM9414 (Figura 7) e o fungo termofílico *Thermoascus aurantiacus* CBMAI756 (Figura 8) pertencentes a coleção de culturas do Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada, IBILCE – UNESP/São José do Rio Preto.

A cultura pura utilizada foi mantida por repiques sucessivos em meios de cultura descritos abaixo, mantida em incubador tipo B.O.D. até crescimento visível do micélio e então conservada em solução glicerinada e criopreservadas (- 80 °C). Quadrados com aproximadamente 0,5 cm de tamanho foram mantidos em solução de 10% de glicerina dentro de criotubos em freezer a -80°C.

Durante as fermentações o meio de cultura utilizado para o crescimento e manutenção do *T. reesei* foi o meio Potato Dextrose Ágar (PDA) e para o *T. aurantiacus* foi utilizado o meio Sabouraud. Os fungos foram mantidos em tubos de cultura nos meios descritos acima sendo que o *T. reesei* foi conservado em câmara fria a 6 °C e o *T. aurantiacus* permaneceu em temperatura ambiente.

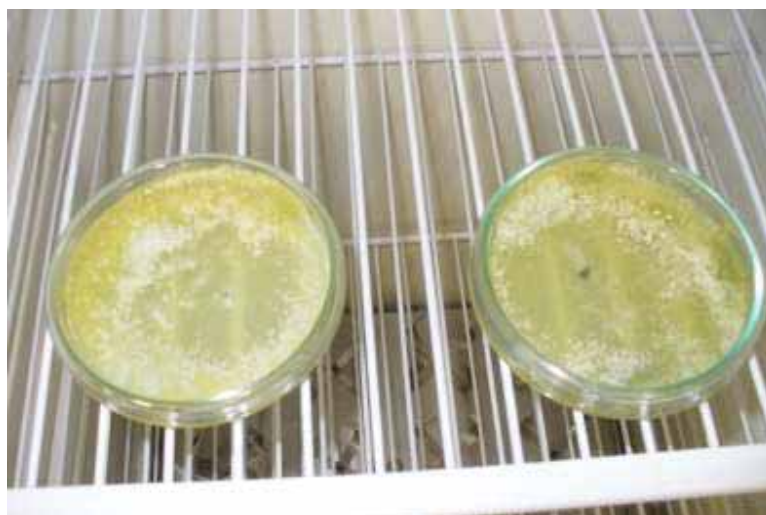


Figura 7. *Thichoderma reesei* QM9414 crescido em placa no meio PDA.

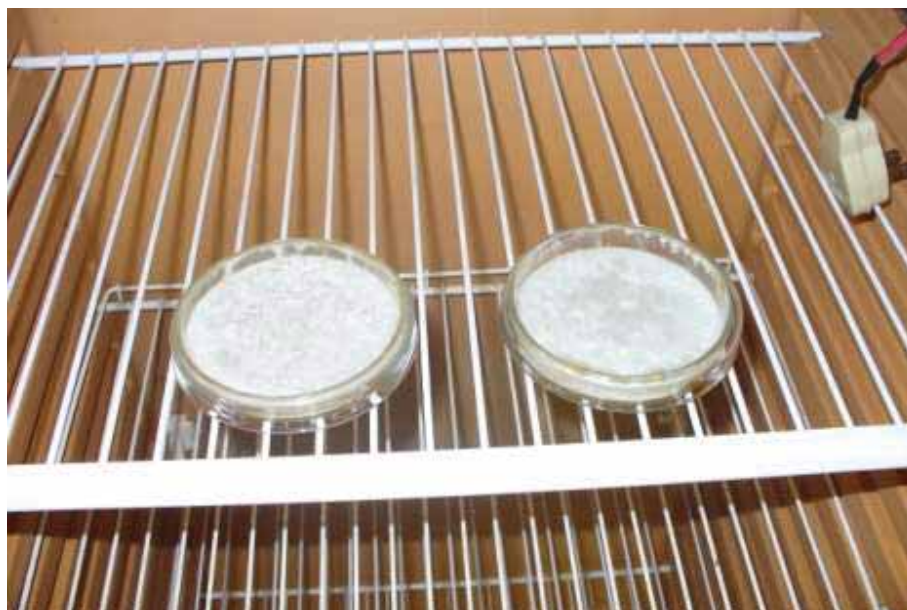


Figura 8. *Thermoascus aurantiacus* CBMAI756 crescido em placa no meio Saboraud.

4.2. Substratos para a fermentação em estado sólido (FES)

Foi utilizada uma mistura de bagaço de cana-de-açúcar (50%) e farelo de trigo (50%) na matéria seca, como substrato para a FES. Os materiais foram lavados em água corrente para retirar impurezas, secos a 55 °C até peso constante. O bagaço de cana foi moído com granulometria aproximada de 5 mm e peneirado e o farelo de trigo apenas peneirado para padronização. Os materiais foram esterilizados em autoclave a 120 °C, por 20 minutos.

4.3. Obtenção do extrato enzimático pela FES

Para o preparo dos pré-inóculos foram adicionados 50 mL de meio de cultura em erlenmeyer de 250 mL. O fungo *T. reesei* foi cultivado a 28 °C em meio PDA (Potato Dextrose Agar) por 5 dias e o *T. aurantiacus* foi cultivado a 50 °C em meio Saboraud, durante 3 dias (Figura 9 e 10). Após o crescimento dos fungos

foram adicionados 100 mL de solução nutritiva (Tabela 1) e foi feita raspagem com auxílio de alça de inoculação.



Figura 9. Pré-inoculo do fungo *Trichoderma reesei*.



Figura 10. Pré-inoculos do fungo *Thermoascus aurantiacus*.

A FES ocorreu em sacos de polipropileno autoclavados, contendo um arame em forma de “mola” dentro de cada saco, para evitar a compactação do substrato e uma rolha de algodão na ponta para a troca gasosa. Cada saco continha 5 g do substrato (bagaço de cana + farelo de trigo) com 20 mL dos inóculos (solução nutriente + microrganismo).

As fermentações foram realizadas na temperatura descritas acima, porém, foram realizadas com sete dias de cultivo (pico de produção da enzima CMCase) (Figura 11). Após este período, foram adicionados 40 mL de água destilada ao material fermentado, sendo homogeneizado, macerado e posteriormente agitado por 30 minutos a 150 rpm. O material foi filtrado e centrifugado a 10000 xg durante 20 minutos, a 5°C e os sobrenadantes utilizados como soluções enzimáticas brutas.

Tabela 1. Solução nutriente.

Nutriente	(g/L)
(NH ₄)SO ₄ (Sulfato de amônio)	3,5
KH ₂ PO ₄ (Fosfato de potássio)	3,0
MgSO ₄ .7H ₂ O (Sulfato de magnésio)	0,5
CaCl ₂ (Cloreto de cálcio)	0,5
Tween 80	10

O pH da solução foi ajustado para 5,0. Foi utilizada água destilada.



Figura 11. Micro-organismos crescidos no substrato antes da retirada dos extratos enzimáticos.

Após a obtenção do extrato enzimático, o mesmo foi submetido a um sistema de filtração Quixstand Benchtop (Amershan Biosciences, Sweeden) com membrana de corte de 10 kDa, afim de aumentar as concentrações de enzimas no extrato pela retirada de água.

4.4. Determinação da atividade das celulases

A atividade de endoglucanase (CMCase) foi determinada em mistura de reação contendo 0,1 mL do extrato enzimático bruto e 0,9 ml de uma solução de 4,0% de carboximetilcelulose (CMC) em tampão acetato 0,2 M e pH 5,0. Após a incubação, em temperatura de 60 °C por 10 minutos, a reação foi interrompida com gelo e com adição de ADNS. Após banho de ebulição os açúcares redutores foram quantificados pelo método ADNS (MILLER, 1959). Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μmol de glicose por minuto nas condições de ensaio.

Para a atividade de β -glicosidase a mistura de reação foi composta de 50 μ L do extrato enzimático bruto, 250 μ L de 4-nitrofenol-D-glicopiranosídeo 4 mM (PNPG, Sigma Co.) e 250 μ L de solução tampão acetato 0,1 M e pH 5,0. Após a incubação, em temperatura de 60 °C por 10 minutos a reação foi interrompida com gelo e pela adição de 2,0 mL de Na_2CO_3 2M, e o nitrofenol liberado foi quantificado por espectrofotometria na região do visível em 410 nm. A atividade enzimática foi determinada por curva padrão de nitrofenol. Uma unidade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μ mol de nitrofenol por minuto de reação.

4.5. Determinação da atividade das xilanases

A atividade xilanase foi medida em mistura de reação contendo 0,1 mL do extrato enzimático bruto e 0,9 mL de uma solução de 1,0% de xilana “birchwood” (Sigma) em tampão acetato 0,2 M e pH 5,0. Após a incubação, em temperatura de 60 °C por 10 minutos, os açúcares redutores foram quantificados pelo método ADNS (MILLER, 1959). Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μ mol de xilose por minuto nas condições de ensaio.

A atividade de β -xilosidase foi medida por procedimento idêntico a atividade da β -glicosidase, exceto o substrato que foi substituído pelo 4- nitrofenol-D-xilopiranosídeo 4 mM (PNPX, Sigma Co.).

4.6. Ensilagem e avaliação da silagem

Esta fase foi desenvolvida com o objetivo de subsidiar com informações básicas, as alterações na composição química, digestibilidade, perdas durante o

processo fermentativo após o processo de armazenamento com adição das enzimas.

4.7. *Ensilagem*

O híbrido utilizado foi Biomatrix 502, sendo que a ensilagem foi realizada quando o milho atingiu 34% de matéria seca. Foram confeccionados 28 silos experimentais, sendo 7 tratamentos e 4 repetições. Os silos experimentais utilizados foram baldes de plástico com capacidade de 18,5 litros e no fundo dos silos foram colocados 7 kg de areia seca, separada da forragem por um tecido de náilon, para quantificação do efluente produzido. Os bales foram fechados com tampa plástica e lacrados com fita adesiva.

Foram utilizados soquetes para a compactação da forragem alcançando a massa específica média de 570 kg de matéria natural por metro cúbico.

A planta foi cortada, picada e acondicionada de maneira uniforme sobre uma lona plástica, onde o complexo enzimático foi adicionado por aspersão. Após misturar cada tratamento, os baldes foram montados, fechados e pesados.

4.8. *Amostragens e avaliações químico-bromatológicas*

Antes da ensilagem foram realizadas amostragens representativas do milho, que foram levadas ao laboratório, homogeneizadas e secas em estufa de ventilação forçada a 55°C por 72 horas e novamente pesadas para o cálculo da matéria seca.

Estas amostras já secas foram moídas em moinho de facas tipo Willey utilizando-se peneira com malha de 1,0 mm e guardada em recipientes apropriados para posteriores análises.

A análise bromatológica da forragem foi realizada para determinação dos teores de matéria seca (MS), matéria mineral (MM), proteína bruta (PB), fibra em

detergente neutro (FDN) e fibra em detergente ácido (FDA) e lignina (LIG), determinados conforme os métodos descritos por Silva & Queiroz (2002), os teores de celulose (CEL) e hemicelulose (HEM) foram obtidos por diferenças.

4.9. Determinação das perdas

Após a confecção dos silos, esses foram pesados e armazenados em temperatura ambiente durante 100 dias, passado esse período os silos foram novamente pesados antes da abertura para a quantificação de perdas por gás e da recuperação da matéria seca, que foram obtidas pelas equações abaixo.

A determinação da perda por gases foi calculada pela seguinte equação:

$PG = (PSI - PSF) / MSI \times 100$, sendo:

PG: perda por gases (% da MS);

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

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

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

Para a determinação da recuperação da matéria seca foi utilizado:

$Rec = MSF / MSI \times 100$, sendo:

Rec: recuperação da matéria seca;

MSF: matéria seca no momento da abertura (quantidade de forragem (kg)* %MS);

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

A determinação da produção de efluente foi calculada pela equação:

$PE = (PSAF - PSAI) / MNI \times 1000$, sendo;

PE = produção de efluente (kg de efluente/ton de matéria verde ensilada);

PSAF = peso do conjunto silo, areia e tela após a abertura (kg);

PSAI = peso do conjunto silo, areia e tela antes da ensilagem (kg);

MNI = quantidade de forragem ensilada (kg).

A recuperação de matéria seca foi calculada com a seguinte equação:

Recuperação de MS: $(MSi / MSf) \times 100$, sendo:

MSf = quantidade de MS final;

MSi = quantidade de MS inicial.

Para o cálculo da recuperação de cada constituinte foram utilizadas as informações de recuperação de matéria seca e análise bromatológica antes da ensilagem e após a abertura dos silos. Com esses valores foi possível estimar quanto de cada constituinte foi recuperado.

O cálculo dos carboidratos não fibrosos foi realizado para entender as alterações nos teores de FDN encontradas antes da ensilagem e após a abertura dos silos, pela atuação das enzimas na parede celular. Foi calculado conforme Sniffen et al. (1992), com as seguintes equações:

CHO (MS) = $100 - PB (MS) - EE (MS) - MM (MS)$, sendo:

PB (MS) = teor de proteína bruta na matéria seca;

EE (MS) = teor de extrato etéreo na matéria seca;

MM (MS) = teor de matéria mineral na matéria seca.

CNF = $CHO (MS) - FDN (MS)$, sendo:

CNF = carboidratos não fibrosos;

FDN (MS) = teor de FDN na matéria seca.

Com os valores de CNF do milho antes da ensilagem e das silagens após abertura, foi possível calcular sua variação.

4.10. Avaliação da digestibilidade

Nas amostras já secas e armazenadas das silagens foi realizada digestibilidade *in vitro* verdadeira da matéria seca (DIVMS), sendo determinada pelo método Goering & Van Soest (1970).

4.11. Tratamentos avaliados

Foram avaliadas doses dos extratos enzimáticos produzidos pelos fungos *Thichoderma reesei* e *Thermoascus aurantiacus* durante o processo de ensilagem do milho, onde:

Controle – forragem ensilada com 40 mL de água destilada/kg de matéria natural (MN)

Tratamento I – forragem ensilada com 10 mL enzima + 30 mL de água destilada/kg de MN

Tratamento II – forragem ensilada com 20 mL enzima + 20 mL de água destilada/kg de MN

Tratamento III – forragem ensilada com 40 mL enzima/kg de MN

Os tratamentos I, II e III eram compostos pelos dois extratos enzimáticos separadamente.

4.12. Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, onde cada fungo foi considerado como um experimento independente, com quatro tratamentos e quatro repetições cada, sendo que o controle foi o mesmo. Para as avaliações, o silo (balde) foi considerado como unidade experimental.

Os dados foram analisados através do procedimento GLM do pacote estatístico SAS 9.1 (2003), com as médias comparadas por contraste, a 5% de probabilidade.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A produção de enzimas foi realizada por fermentação em estado sólido (FES) utilizando bagaço de cana-de-açúcar e farelo de trigo como fonte de carbono na proporção 1:1 na matéria seca. Para padronização dos extratos enzimáticos, a enzima CMCase foi escolhida como padrão, assim os extratos foram retirados nos picos de produção da enzima conforme Travaini (2008) e Amaral (2008).

De acordo com Travaini (2008), para o fungo *T. reesei* no substrato utilizado, o pico de produção de CMCase é com 168 horas de fermentação (7 dias), sendo compatível com o *T. aurantiacus*, também com o pico de produção da enzima em 168h (AMARAL, 2008). Sendo assim, após 168 horas, a fermentação foi interrompida e as atividades enzimáticas foram quantificadas em unidade enzimática por grama de substrato fermentado (U/g).

Na tabela 2 estão apresentadas as atividades das enzimas hidrolíticas (CMCase, β -glicosidase, Xilanase e β -xilosidase) produzidas pelo microrganismo *T. reesei*. A temperatura adotada para as dosagens das atividades enzimáticas foi 60°C. Travaini (2008) encontrou maior temperatura de atividade para a enzima CMCase, com 60°C, assim como essa enzima foi escolhida como padrão, a temperatura foi fixada. O pH dos tampões foi ajustado para 5,0.

Tabela 2. Atividade de celulases e xilanases a 60°C (U/g) após os períodos de cultivo pré determinados (168h).

Microrganismo	Atividade enzimática (U/g)			
	CMCase	β -glicosidase	Xilanase	β -xilosidase
<i>Trichoderma reesei</i>	114,72	8,24	596,8	3,84

U/g: unidades de enzimas produzidas por grama de substrato fermentado.

As atividades do extrato bruto do *T. reesei* utilizado nesse trabalho são superiores às atividades enzimáticas encontradas na literatura. Travaini (2008) encontrou 3,57 U/g de β -glicosidase, 55,73 U/g de CMCase, 0,91 U/g de β -xilosidase, 135,87 U/g de xilanase para o mesmo micro-organismo utilizando o mesmo substrato. O aumento nas atividades ocorre, pois o extrato aplicado nesse experimento foi concentrado por um sistema de filtração Quixstand Benchtop (Amershan Biosciences, Sweeden). Com a retirada de água pelo sistema, existe aumento nas concentrações das enzimas do extrato. Assim a concentração se mostra eficiente.

A atividade enzimática também pode ser expressa em unidades por mL (U/mL). Para extração das enzimas foram adicionados 40 mL de água destilada para cada 5g de substrato fermentado. Sendo assim para cada grama de substrato foram obtidos 8 mL de extrato enzimático bruto (Tabela 3).

Tabela 3. Atividade de celulases e xilanases a 60°C (U/mL) do extrato enzimático bruto utilizado na ensilagem.

Microrganismo	Atividade enzimática (U/mL)			
	CMCase	β -glicosidase	Xilanase	β -xilosidase
<i>Trichoderma reesei</i>	14,34	1,03	74,60	0,48

U/mL: unidades de enzimas por mL do extrato enzimático bruto.

As atividades das enzimas produzidas pelo fungo *T. aurantiacus* estão apresentadas na tabela 4. A temperatura adotada para as dosagens das atividades enzimáticas também foi 60°C e o pH dos tampões ajustado para 5,0.

Tabela 4. Atividade de enzimas celulolíticas e xilanolíticas a 60°C (U/g) após os períodos de cultivo pré determinados (168h).

Microrganismo	Atividade enzimática (U/g)			
	CMCase	β -glicosidase	Xilanase	β -xilosidase
<i>Thermoascus aurantiacus</i>	1447,28	48,16	5759,84	1,35

U/g: unidades de enzimas produzidas por grama de substrato fermentado.

Amaral (2008) trabalhou com o *T. aurantiacus* e encontrou menores atividades enzimáticas com todas as enzimas apresentadas, com exceção da β -xilosidase: 781,9 U/g de CMCase (80°C), 68,7 U/g de β -glicosidase (75°C), 3784,5 U/g de xilanase (75°C), 18,7 U/g de β -xilosidase (55°C), para o mesmo substrato. As enzimas com atividades maiores, o aumento também é devido ao processo de concentração do extrato.

Para a enzima β -xilosidase, é possível que a atividade seja menor devido a temperatura em que a mesma foi dosada, sendo que o valor ótimo de temperatura para a enzima é 55°C (AMARAL, 2008).

A atividade enzimática expressa em unidades por mL (U/mL) está apresentada na tabela 5.

Tabela 5. Atividade de celulasas e xilanasas a 60°C (U/mL) do extrato enzimático bruto utilizado na ensilagem.

Microrganismo	Atividade enzimática (U/mL)			
	CMCase	β -glicosidase	Xilanase	β -xilosidase
<i>Thermoascus aurantiacus</i>	180,91	6,02	719,98	0,17

U/mL: unidades de enzimas por mL do extrato enzimático bruto.

Nas tabelas 6 e 7 , encontram-se os dados referentes aos teores médios da matéria seca (MS), fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente ácido (FDA), lignina (LIG), proteína bruta (PB), matéria mineral (MM), pH e carboidratos não fibrosos (CNF) determinados nas plantas de milho utilizadas na ensilagem, de acordo com os tratamentos estabelecidos, sendo que a amostragem foi realizada poucos minutos antes a ensilagem.

Entre o momento em que a planta foi cortada, a adição das enzimas e a ensilagem em si, podem ter ocorrido alteração na constituição do material, devido ao tempo que ficaram expostos.

Tabela 6. Composição químico-bromatológica do milho em função dos tratamentos estabelecidos antes da ensilagem (Fungo *T. reesei*).

Atributos ¹	Tratamentos ²			
	Controle	10mL/Kg MN	20mL/Kg MN	40mL/Kg MN
MS	33,10	35,24	34,34	33,17
FDN	54,89	58,94	59,60	59,42
FDA	25,86	28,12	28,20	28,55
LIG	5,10	5,21	5,00	5,26
PB	8,71	8,11	8,17	8,09
MM	6,26	6,45	6,69	7,20
pH	5,25	5,25	5,09	5,22
CNF	27,89	24,39	23,86	23,11

¹ MS: matéria seca total (%); FDN: fibra em detergente neutro; FDA: fibra em detergente ácido; LIG: lignina; PB: proteína bruta; MM: matéria mineral; pH: potencial hidrogeniônico; CNF: carboidratos não fibrosos.

² Controle: sem adição de extrato enzimático; 10mL/Kg MN: adição de 10 mL de extrato enzimático por Kg matéria natural (MN); 20mL/Kg MN: adição de 20 mL de extrato enzimático/Kg MN; 40mL/Kg MN: adição de 40 mL de extrato enzimático/Kg MN.

A análise dos dados apresentados na Tabela 6, referente aos teores de MS no momento da ensilagem, evidencia que esses foram próximos, proporcionando condições de fermentação semelhantes entre os tratamentos e tendo como média geral 33,96% de MS. Os teores de MS foram acima dos 25% preconizados por McDonald et al. (1991) como condição necessária para que as perdas de efluentes dentro do silo sejam minimizadas e, conseqüentemente, ocorra à manutenção dos nutrientes do material ensilado. O mesmo acontece quanto é adicionado o extrato enzimático do *T. aurantiacus* (Tabela 7).

Tabela 7. Composição químico-bromatológica do milho em função dos tratamentos estabelecidos antes da ensilagem (*T. aurantiacus*).

Atributos ¹	Tratamentos ²			
	Controle	10mL/Kg MN	20mL/Kg MN	40mL/Kg MN
MS	33,10	35,02	34,44	34,25
FDN	54,89	54,25	56,49	60,06
FDA	25,86	25,01	26,26	29,57
LIG	5,10	5,96	4,31	5,90
PB	8,71	8,48	8,47	8,38
MM	6,26	6,18	7,04	7,60
pH	5,25	5,21	5,21	5,19
CNF	27,89	28,27	25,18	21,13

¹ MS: matéria seca total (%); FDN: fibra em detergente neutro; FDA: fibra em detergente ácido; LIG: lignina; PB: proteína bruta; MM: matéria mineral; pH: potencial hidrogeniônico; CNF: carboidratos não fibrosos.

² Controle: sem adição de extrato enzimático; 10mL/Kg MN: adição de 10 mL de extrato enzimático por Kg matéria natural (MN); 20mL/Kg MN: adição de 20 mL de extrato enzimático/Kg MN; 40mL/Kg MN: adição de 40 mL de extrato enzimático/Kg MN.

Com os dois extratos enzimáticos, se observa aumento nos teores de FDN, FDA, lignina e matéria mineral. Após a adição das enzimas e antes da ensilagem, os materiais ficaram expostos ao ambiente, durante o tempo de confecção dos silos e preparação de materiais. As alterações encontradas podem ser devido à respiração da planta, causando redução do conteúdo celular, obtendo-se assim, elevação proporcional dos constituintes da parede celular, ou pela ação das enzimas na parede celular, aumentando a perda de conteúdo celular. Na respiração os açúcares solúveis são os principais substratos utilizados. O fator de diluição explica o aumento desses constituintes, não representado formação dos mesmos. (Tabela 6 e 7).

É possível observar queda nos teores de carboidratos não fibrosos com a adição de enzimas.

Esses valores foram próximos aos encontrados por Silva et al. (2005) no milho no momento da ensilagem com 60,72% de FDN, 28,89% de FDA, 4,20% de lignina.

Os valores de proteína bruta média encontrada nesse estudo foi 8,27% e 8,51% estando entre os valores encontrados por Rocha et al. (2006) e Miyazaki (2008), sendo 7,45% e 8,8% respectivamente.

Os valores de pH, apresentados na tabela 6, não diferiram estatisticamente, sendo a média geral de 5,20. Segundo Travaini (2008) a CMCase produzida pelo fungo *T. reesei* QM9414 possui pH ótimo em 5,0, sendo próximo ao pH no momento da ensilagem. O mesmo pode ser visto na tabela 7, com pH médio 5,21. Segundo Amaral (2008) a xilanase produzida pelo fungo *T. aurantiacus* possui pH ótimo em 5,0, sendo próximo ao pH no momento da ensilagem.

As forragens conservadas podem ter seu valor alimentício alterado, devido aos procedimentos utilizados para a sua produção e conservação, e dos fenômenos bioquímicos e microbiológicos que ocorrem no processo (JOBIM et al., 2007).

Na tabela 8 e 9 estão apresentadas às equações de regressão com o nível de significância e coeficientes de determinação dos valores de pH e perdas da silagem de milho com a adição de diferentes doses (0, 10mL, 20mL e 40 mL/Kg MN) do extrato enzimático dos fungos *Trichoderma reesei* e *Thermoascus aurantiacus*, respectivamente.

Tabela 8. Valores de pH e perdas da silagem de milho tratadas com doses do extrato enzimático do fungo *Trichoderma reesei*.

Variáveis	Equação	P>F ²	R ²
pH ensilagem	Y = 5,20	NS	-
pH abertura	Y = 3,85	NS	-
Efluente	Y = 23,186 – 0,3772x + 0,016x ²	**	0,56
PG	Y = 23,27 + 0,0843x	*	0,29
RMS	Y = 96,02 – 0,1205x	**	0,48

PG: perdas por gases (%MS), RMS: recuperação de matéria seca (%MS).

Equações de regressão, significância (Sig) e coeficientes de determinação (R²) de variáveis avaliadas no processo de ensilagem do milho com a adição de diferentes doses (0, 10mL, 20mL e 40 mL/Kg MN).

*Equação significativa a 5% ** Equação significativa a 1%. NS: não significativa.

No momento da ensilagem não foi possível encontrar variação do pH do milho com a adição de ambos extratos enzimáticos, não alterando o processo inicial devido ao pH.

Com o extrato enzimático do fungo *T. reesei* também não se pode observar alteração do pH das silagens após abertura dos silos (Tabela 8). Cysneiros et al.

(2006) também não encontraram alterações no pH das silagens de milho após adição de enzimas. Segundo o autor a acidez é considerada um fator importante na conservação das silagens. Um pH elevado indica perdas de nutrientes, principalmente de proteína. A atividade das proteases da planta e dos micro-organismos podem ser reduzidas pelo abaixamento do pH.

Tabela 9. Valores de pH e perdas da silagem de milho tratadas com doses do extrato enzimático do fungo *Thermoascus aurantiacus*.

Variáveis	Equação	P>F ²	R ²
pH ensilagem	Y = 5,21	NS	-
pH abertura	Y = 3,8751 – 0,0063x + 0,0001x ²	**	0,58
Efluente	Y = 22,089 – 0,781x + 0,0179x ²	*	0,40
PG	Y = 19,983 + 0,2863x	**	0,39
RMS	Y = 95,625 – 0,1262x	**	0,56

PG: perdas por gases (%MS), RMS: recuperação de matéria seca (%MS).

Equações de regressão, significância (Sig) e coeficientes de determinação (R²) de variáveis avaliadas no processo de ensilagem do milho com a adição de diferentes doses (0, 10mL, 20mL e 40 mL/Kg MN).

*Equação significativa a 5% ** Equação significativa a 1%. NS: não significativa.

De acordo com a tabela 9, com o extrato enzimático do fungo *T. aurantiacus*, na abertura dos silos, verificou-se efeito quadrático sobre o pH, com o seu menor valor (pH = 3,78) com adição de 31,5 mL de extrato enzimático/Kg de MN (Figura 12). Segundo Weiss et al. (2003), as silagens tem valor de pH variando de 3,5 a 5,0. Apesar de ser pequena, a variação pode ter sido causada pela atuação das enzimas. Os açúcares solúveis afetam diretamente a fermentação, pois são substratos utilizados para a produção de ácido lático pelas bactérias lácticas, assim as enzimas tendo potencial hidrolítico, podem ter disponibilizado mais quantidade de açúcares.

Rocha et al. (2006) encontraram efeito de inoculante enzimo-bacteriano sobre o pH das silagens. Segundo os autores, o baixo pH final pode ajudar na redução da população de microorganismos deletérios à silagem.

Silva et al. (2005) observaram maior disponibilização de substratos fermentativos na silagem com inoculante microbiano comercial como celulose e hemicelulose pelo inter-relacionamento entre micro-organismos, enzimas e outros constituintes químicos da própria espécie vegetal, que, juntos, influenciam a

velocidade da queda do pH e, conseqüentemente, a ação dos micro-organismos e das enzimas no processo fermentativo.

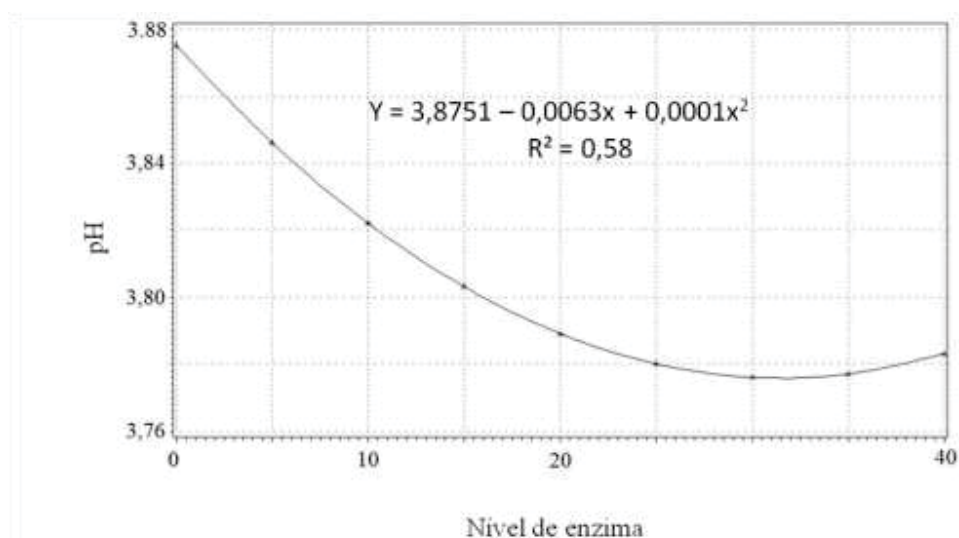


Figura 12. Medida de pH de silagens de milho ensilada com quatro doses de extratos enzimáticos do fungo *Thermoascus aurantiacus* após a abertura (0,10, 20 e 40 mL de extrato/Kg de MN).

Em relação a produção de efluente, com o extrato enzimático do fungo *T. reesei* verificou-se efeito quadrático da adição de enzimas (Figura 13), com menor valor de efluente de 20,96 kg de efluente/t de matéria verde ensilada associado ao uso de 11,79 mL. A remoção de barreiras estruturais pode permitir um maior aproveitamento do conteúdo celular pelas bactérias presentes no material ensilado, aumentando efluentes. Segundo Santos et al. (2008) o maior aproveitamento do conteúdo celular por bactérias ácido-láticas pode aumentar a quantidade de efluente produzido durante a ensilagem.

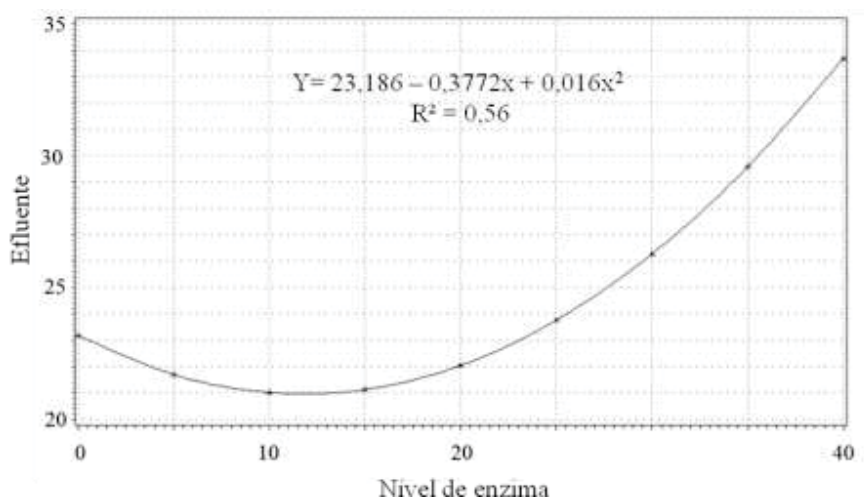


Figura 13. Produção de efluente da silagem de milho ensilada com quatro doses de extratos enzimáticos do fungo *Trichoderma reesei* (0,10, 20 e 40 mL de extrato/Kg de MN).

Quando adicionado o extrato do fungo *T. aurantiacus*, pode-se observar menor produção de efluentes até 13,60 kg de efluente/t de matéria verde ensilada associado a dose 21,82 mL/Kg de MN (Figura 14). Segundo Bernardes (2006) a produção de efluentes está intimamente relacionada com a recuperação de matéria seca.

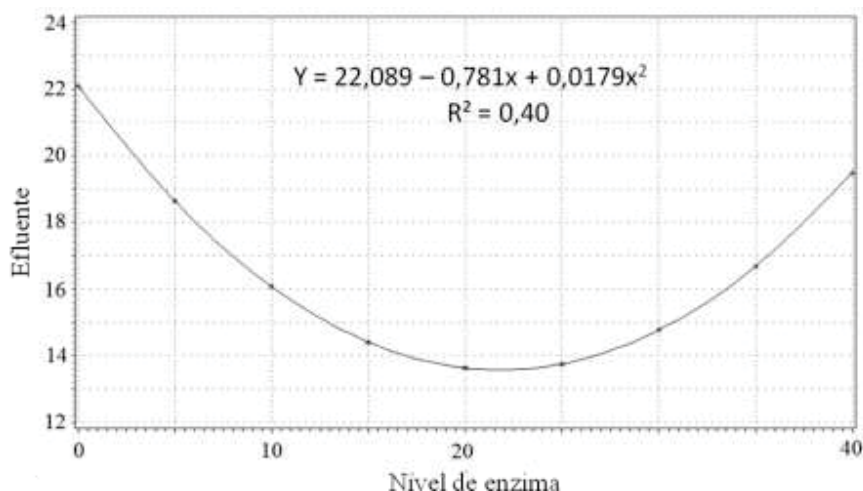


Figura 14. Produção de efluente da silagem de milho ensilada com quatro doses de extratos enzimáticos de fungo *Thermoascus aurantiacus* (0,10, 20 e 40 mL de extrato/Kg de MN).

Na perda por gás houve aumento linear com a adição das enzimas de ambos os micro-organismos (Figura 15 e 16), variando de 23,27 % da MS a 26,64 % da MS o fungo *T. reesei* e 19,98 % da MS a 31,43 % da MS o fungo *T. aurantiacus*, indicando que a enzima atuou sobre o processo fermentativo. Segundo Igarasi (2002) as perdas por gases estão associadas ao perfil de fermentação ocorrido na silagem.

Segundo McDonald et al. (1991), a fermentação heterolática promove maiores perdas de MS pela produção de gases (CO_2 e H_2O). Segundo Siqueira (2005), a produção de gases durante o processo fermentativo é em função da transformação das proteínas e carboidratos pelos micro-organismos que geram vários produtos como ácidos orgânicos, etanol, água, ATP e CO_2 . Oude Elferink et al. (2002), afirmam que a produção de CO_2 na fermentação ocorre pelas bactérias heterofermentativas que possuem a enzima carboxilase necessária para retirar as moléculas de CO_2 do ácido pirúvico.

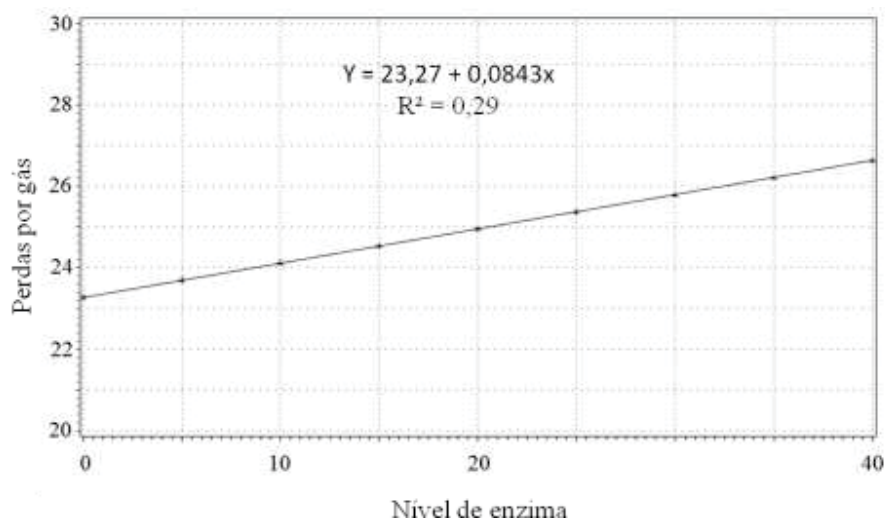


Figura 15. Perdas de gases durante a ensilagem de milho com adição de quatro doses de extratos enzimáticos *Trichoderma reesei* (0,10, 20 e 40 mL de extrato/Kg de MN).

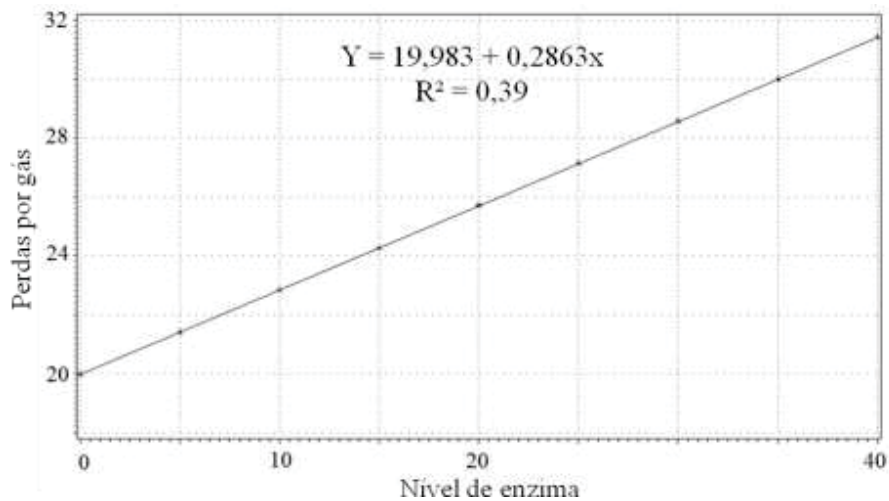


Figura 16. Perdas de gases durante a ensilagem de milho com adição de quatro doses de extratos enzimáticos do fungo *Thermoascus aurantiacus* (0,10, 20 e 40 mL de extrato/Kg de MN).

Segundo Pedroso et al. (2005), a recuperação da MS tem alta correlação com a perda por gases. Contrária a perda por gases, a recuperação de matéria

seca (RMS) apresentou diminuição linear (Figura 17 e 18), variando de 96,02% a 91,2% o fungo *T. reesei* e 95,63% a 90,58% o *T. aurantiacus*.

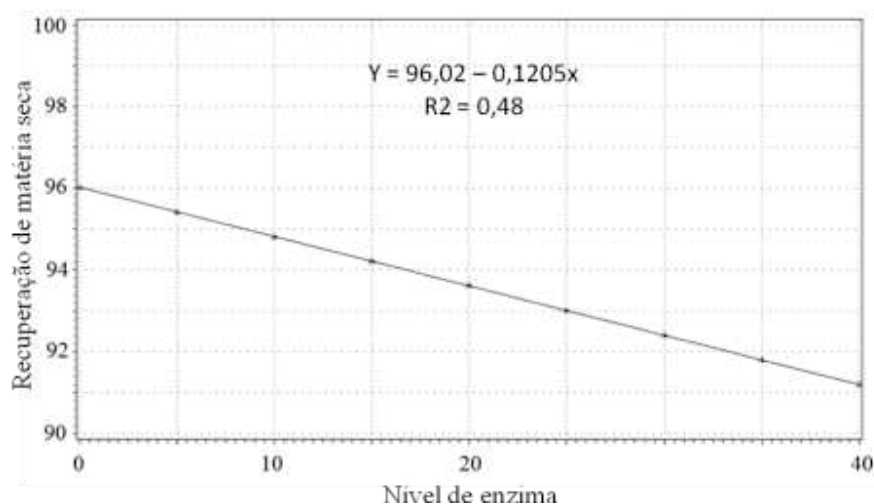


Figura 17. Recuperação de matéria seca após ensilagem de milho com adição de quatro doses de extratos enzimáticos do fungo *Trichoderma reesei* (0,10, 20 e 40 mL de extrato/Kg de MN).

A RMS representa a quantidade de silagem, considerando a quantidade de forragem produzida em relação à forragem ensilada, ambas consideradas na matéria seca (SIQUEIRA, 2005).

Esses resultados confirmam a hipótese da maior atividade das bactérias, mostrando um maior consumo de MS da fração fibrosa com a adição de enzimas na ensilagem.

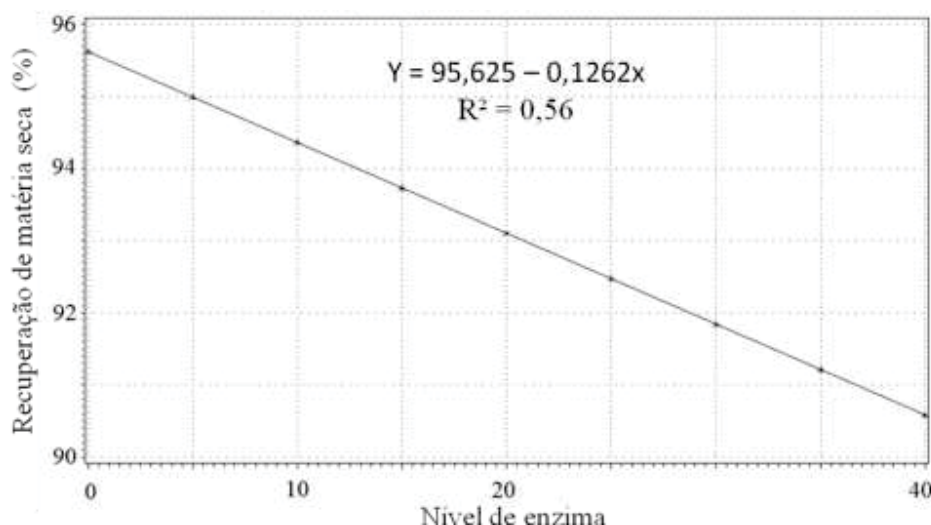


Figura 18. Recuperação de matéria seca após ensilagem de milho com adição de quatro doses de extratos enzimáticos do fungo *Thermoascus aurantiacus* (0,10, 20 e 40 mL de extrato/Kg de MN).

Os parâmetros avaliados após a abertura dos silos com a adição de diferentes doses (0, 10mL, 20mL e 40 mL/Kg MN) do extrato enzimático dos fungos *Trichoderma reesei* e *Thermoascus aurantiacus* respectivamente, estão apresentados nas tabelas 10 e 11, na forma de equações de regressão.

Tabela 10. Composição bromatológica de silagens de milho tratadas com doses do extrato enzimático do fungo *Trichoderma reesei*.

Variáveis	Equação	P>F ²	R ²
MS	Y = 33,748 – 0,0323x	*	0,38
EE	Y = 3,45	NS	-
MM	Y = 4,4321 + 0,0077x	*	0,31
PB	Y = 8,04	NS	-
FDN	Y = 43,65	NS	-
FDA	Y = 25,26	NS	-
LIG	Y = 3,31	NS	-
DIVMS	Y = 75,08	NS	-

MS: matéria seca (%), EE: extrato etéreo (%), MM: matéria mineral (%), PB: proteína bruta (%), FDN: fibra em detergente neutro (%), FDA: fibra em detergente ácido (%), LIG: lignina (%), DIVMS: digestibilidade *in vitro* da matéria seca (%MS).

Equações de regressão, significância (Sig) e coeficientes de determinação (R²) de variáveis avaliadas no processo de ensilagem do milho com a adição de diferentes doses (0, 10mL, 20mL e 40 mL/Kg MN).

*Equação significativa a 5% ** Equação significativa a 1%. NS: não significativa.

Tabela 11. Composição bromatológica de silagens de milho tratadas com doses do extrato enzimático do fungo *Thermoascus aurantiacus*.

Variáveis	Equação	P>F2	R2
MS	$Y = 33,622 - 0,0297x$	*	0,32
EE	$Y = 3,4788 - 0,0211x$	**	0,53
MM	$Y = 4,54$	NS	-
PB	$Y = 8,14$	NS	-
FDN	$Y = 43,37$	NS	-
FDA	$Y = 25,79$	NS	-
LIG	$Y = 3,33$	NS	-
DIVMS	$Y = 75,364 - 0,1034x$	**	0,51

MS: matéria seca (%), EE: extrato etéreo (%), MM: matéria mineral (%), PB: proteína bruta (%), FDN: fibra em detergente neutro (%), FDA: fibra em detergente ácido (%), LIG: lignina (%), DIVMS: digestibilidade *in vitro* da matéria seca (%MS).

Equações de regressão, significância (Sig) e coeficientes de determinação (R^2) de variáveis avaliadas no processo de ensilagem do milho com a adição de diferentes doses (0, 10mL, 20mL e 40 mL/Kg MN).

*Equação significativa a 5% ** Equação significativa a 1%. NS: não significativa.

Foi possível observar queda no teor de MS com a adição de ambos os extratos enzimáticos (Figura 19 e 20), variando de 33,75% a 32,46% o fungo *T. reesei* e 33,62% a 32,43% o fungo *T. aurantiacus*. Essa queda pode ser explicada pelo consumo da parede celular pelas enzimas presentes no extrato enzimático.

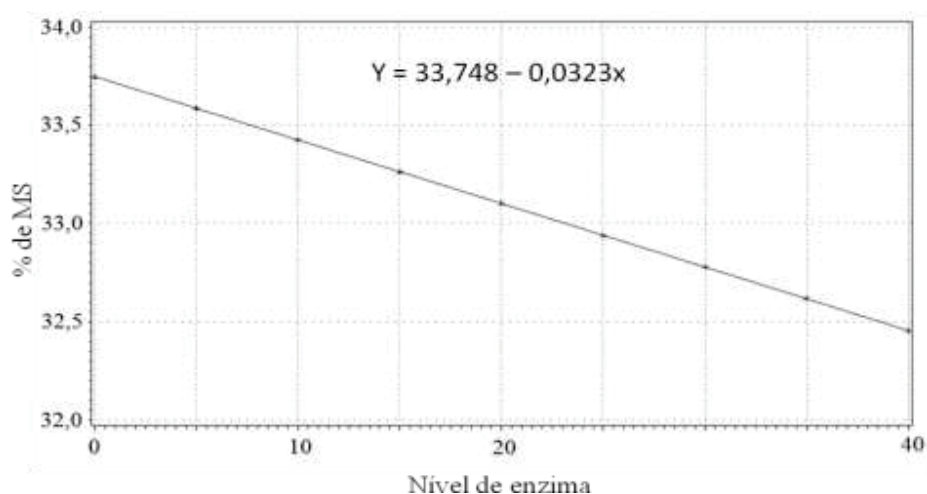


Figura 19. Teor de matéria seca (MS) da silagem de milho com adição de quatro doses de extratos enzimáticos do fungo *Trichoderma reesei* (0,10, 20 e 40 mL de extrato/Kg de MN).

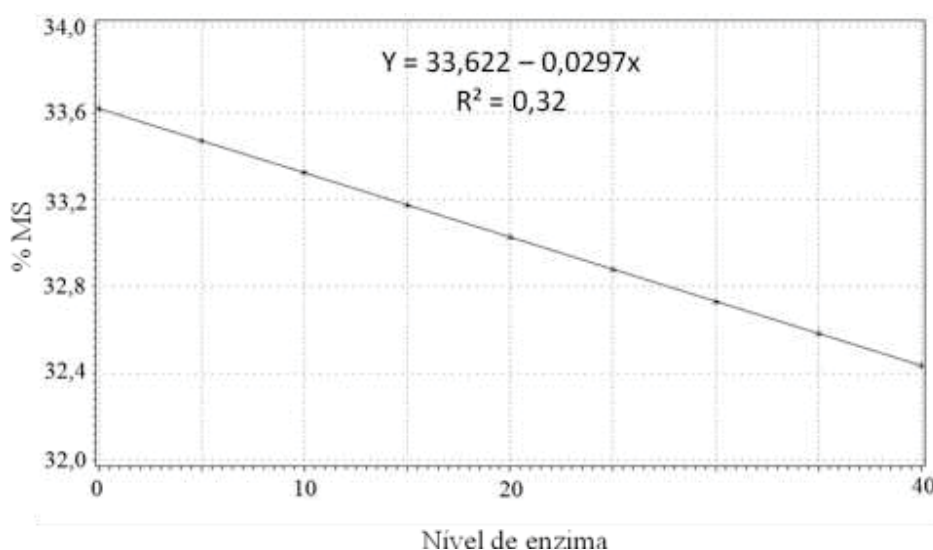


Figura 20. Teor de matéria seca (MS) da silagem de milho com adição de quatro doses de extratos enzimáticos do fungo *Thermoascus aurantiacus* (0,10, 20 e 40 mL de extrato/Kg de MN).

Estudos realizados por COLOMBATTO et al. (2004) não revelaram mudanças no teor de MS de silagens de milho tratadas com diferentes produtos enzimáticos (mistura de xilanase, endoglucanase, exoglucanase, β -glicosidase e α -amilase).

Em relação ao teor de matéria mineral nas silagens de milho, houve crescimento linear com a adição de enzimas do fungo *Trichoderma reesei* (Figura 21) variando de 4,43% a 4,74%. Com o fungo *Thermoascus aurantiacus* não foi encontrado diferença.

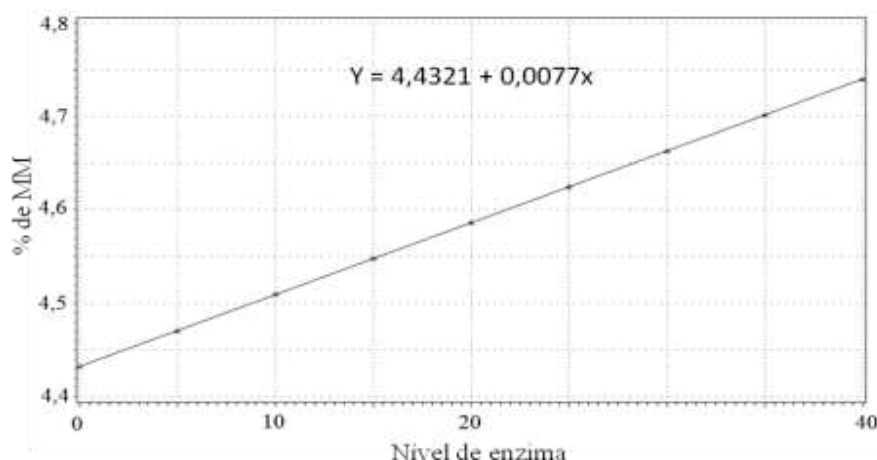


Figura 21. Teor de matéria mineral da silagem de milho com adição de quatro doses de extratos enzimáticos do fungo *Trichoderma reesei* (0,10, 20 e 40 mL de extrato/Kg de MN).

Nas silagens tratadas com extrato do fungo *Trichoderma reesei*, não foram encontradas variações nos teores de extrato etéreo, proteína bruta, FDN, FDA e lignina, com os respectivos valores: 3,45%, 8,04%, 43,65%, 25,25% e 3,31%.

As alterações encontradas não foram capazes de causar mudança na digestibilidade das silagens (Tabela 10): controle (76,3%), tratamento 1 (74,05%), tratamento 2 (74,40%) e tratamento 3 (74,49%).

Segundo Silva (2001) os valores máximos de DIVMS de silagens de milho são encontrados quando os teores de FDN são mínimos. Assim, como o teor de FDN da silagem não diferiu, a DIVMS também não é diferente entre os tratamentos. Rocha et al. (2006) também não encontraram influencia do aditivo enzimo-bacteriano na DIVMS da silagem de milho.

As silagens tratadas com extrato do fungo *Thermoascus aurantiacus*, diferiram estatisticamente apenas no teor de extrato etéreo, onde houve queda linear com a adição das doses do extrato enzimático (Tabela 11). Os teores de matéria mineral, proteína bruta, FDN, FDA e lignina não apresentaram variação, apresentando médias de 4,45%, 8,14%, 43,37%, 25,79% e 3,33%, respectivamente.

Kung Jr. & Ranjit (2001) também não constataram respostas positivas da adição de inoculantes microbianos contendo ou não enzimas sobre a redução da fração FDN em silagens de milho.

Em relação a digestibilidade *in vitro* verdadeira da matéria seca (DIVMS) com a adição do extrato enzimático do fungo *Thermoascus aurantiacus*, se observou queda linear (Figura 22), com variação de 75,36% a 71,22%.

Sniffen et al. (1992) propuseram o fracionamento dos carboidratos em quatro frações (A, B1, B2 e C), considerando a disponibilidade nutricional e a taxa de degradação ruminal. A fração A, rapidamente degradável no rúmen, é composta principalmente pelos carboidratos solúveis. São também considerados nessa fração alguns componentes que se apresentam como “não-carboidratos”, a exemplo dos ácidos orgânicos. Deve-se observar que aos ácidos orgânicos são conferidos valores de taxa de degradação nula; a fração B1, composta de amido e pectina, possui taxa de degradação superior à taxa de passagem; a fração B2, composta pelos carboidratos fibrosos da parede celular, é de disponibilidade ruminal lenta, portanto susceptível aos efeitos da taxa de passagem; e a fração C representa a parede celular indisponível, incluindo a lignina.

Mesmo havendo a mesma quantidade de FDN, a digestibilidade da silagem foi menor possivelmente pela atuação das enzimas durante a fermentação na FDN disponível (fração B2), provavelmente resultando em maior quantidade de FDN indisponível (fração C).

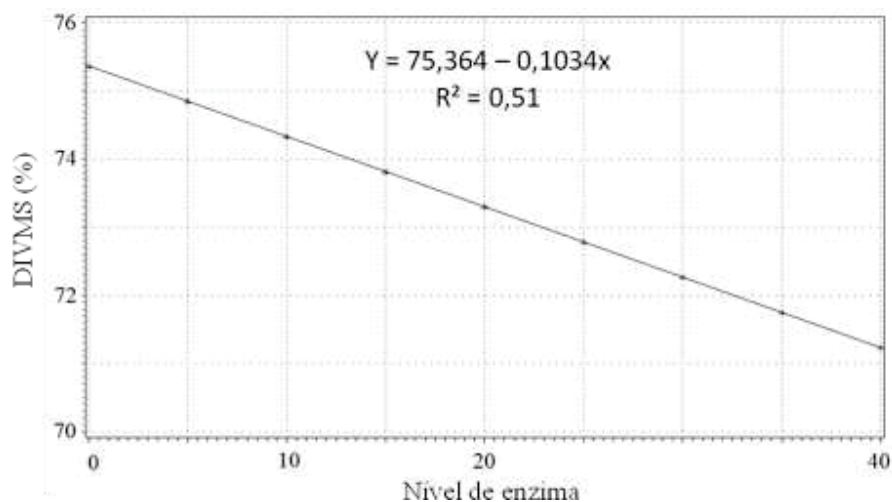


Figura 22. Digestibilidade in vitro da matéria seca da silagem de milho com adição de quatro doses de extratos enzimáticos do fungo *Thermoascus aurantiacus* (0,10, 20 e 40 mL de extrato/Kg de MN).

Pelos resultados encontrados na análise bromatológica do milho ensilado e das silagens, é possível se obter valores em massa de cada constituinte do alimento. A partir desses valores pode ser calculada a recuperação de todos os nutrientes, a fim de se entender como eles variam, sem a interferência do fator de diluição.

Nas tabelas 12 e 13 estão apresentados as equações de regressão da recuperação da PB, FDN, FDA e lignina, quando adicionado os extratos enzimáticos dos fungos *Trichoderma reesei* e *Thermoascus aurantiacus* respectivamente.

Tabela 12. Recuperações de PB, FDN, FDA e lignina após fermentação de silagens de milho tratadas com doses do extrato enzimático do fungo *Trichoderma reesei*.

Variáveis	Equação	P>F ²	R ²
PB	$Y=88,531 + 0,5663x - 0,0164x^2$	**	0,80
FDN	$Y=72,611 - 0,1247x$	**	0,52
FDA	$Y=89,841 - 0,2642x$	**	0,53
LIG	$Y=60,44$	NS	-

PB: proteína bruta (%), FDN: fibra em detergente neutro (%), FDA: fibra em detergente ácido (%), LIG: lignina (%).

Equações de regressão, significância (Sig) e coeficientes de determinação (R²) de variáveis avaliadas no processo de ensilagem do milho com a adição de diferentes doses (0, 10mL, 20mL e 40 mL/Kg MN).

** Equação significativa a 1%. NS: não significativa.

Tabela 13. Recuperações de PB, FDN, FDA e lignina após fermentação de silagens de milho tratadas com doses do extrato enzimático do fungo *Thermoascus aurantiacus*.

Variáveis	Equação	P>F ²	R ²
PB	$Y=88,573 + 0,1838x - 0,0039x^2$	**	0,55
FDN	$Y=74,819 - 0,1683x$	**	0,50
FDA	$Y=97,181 - 0,3717x$	**	0,72
LIG	$Y=65,559 - 0,6531x$	**	0,42

PB: proteína bruta (%), FDN: fibra em detergente neutro (%), FDA: fibra em detergente ácido (%), LIG: lignina (%).

Equações de regressão, significância (Sig) e coeficientes de determinação (R²) de variáveis avaliadas no processo de ensilagem do milho com a adição de diferentes doses (0, 10mL, 20mL e 40 mL/Kg MN).

** Equação significativa a 1%. NS: não significativa.

Em relação a recuperação de proteína bruta foi encontrado efeito quadrático nos dois extratos enzimáticos. Com o extrato do fungo *Trichoderma reesei* até a dose 17,26 mL/Kg MN, houve preservação da proteína (Figura 23), com 93,42% de recuperação. Com o extrato do fungo *Thermoascus aurantiacus* houve preservação até a dose 23,56 mL/Kg MN (Figura 24), com 90,74% de recuperação.

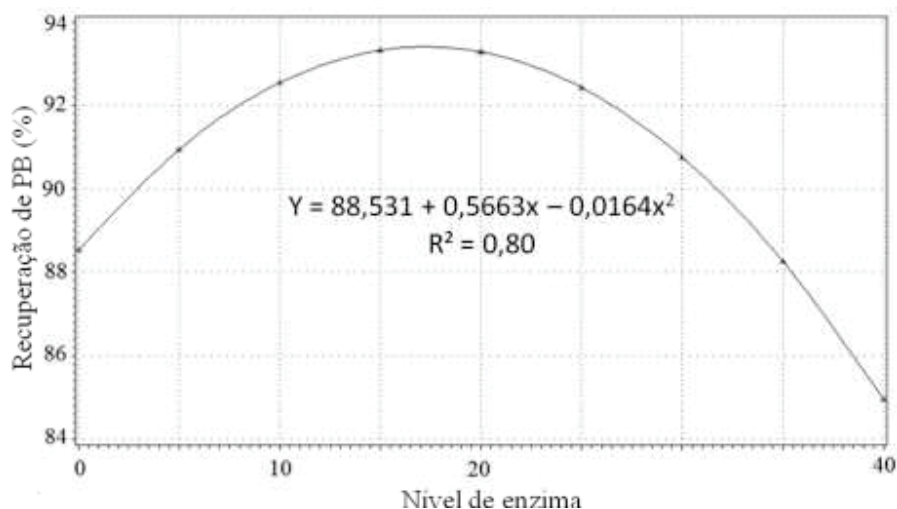


Figura 23. Recuperação de proteína bruta da silagem de milho com adição de quatro doses de extratos enzimáticos do fungo *Trichoderma reesei* (0,10, 20 e 40 mL de extrato/Kg de MN).

A redução da proteólise pode ser resultante de um rápido decréscimo do pH da massa ensilada, favorecendo a produção de grandes quantidades de ácido láctico, o que representa a possibilidade de maior recuperação da matéria seca ensilada (HENDERSON, 1993). A rápida queda do pH pode ser advinda da maior disponibilização de açúcares pela atuação das enzimas presentes nos extratos enzimáticos.

Rocha et al. (2006) encontraram valores de proteína bruta maiores nas silagens tratadas com aditivo enzimo-bacteriano, concluindo que existe menor proteólise nas silagens tratadas com inoculantes, resultando, portanto, em melhor conservação do teor protéico dessas silagens.

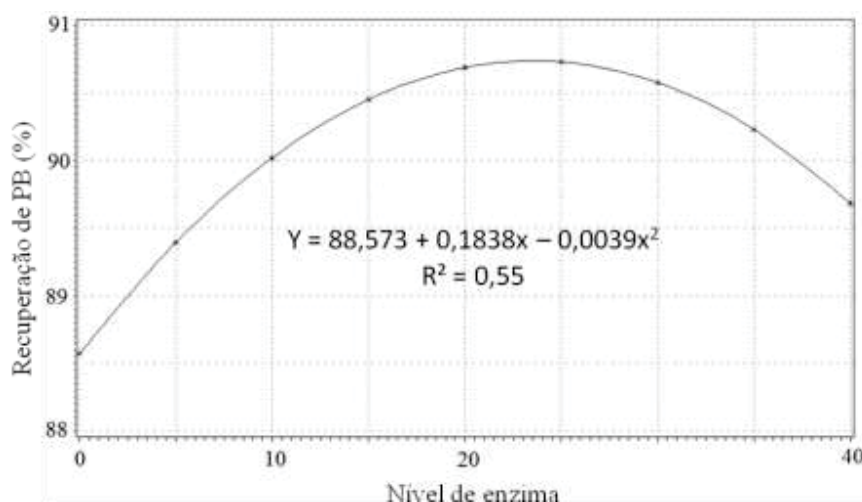


Figura 24. Recuperação de proteína bruta da silagem de milho com adição de quatro doses de extratos enzimáticos do fungo *Thermoascus aurantiacus* (0,10, 20 e 40 mL de extrato/Kg de MN).

Os valores de nitrogênio amoniacal encontrados nas silagens confirmam a preservação da proteína. Com a adição do extrato do fungo *T. reesei* houve queda linear na relação nitrogênio amoniacal/Ntotal ($N-NH_3/N_{total}$) com a equação $Y = 3,9243 - 0,0434x$ ($R^2 = 0,54$). Com adição do extrato do fungo *T. aurantiacus*, foi encontrado efeito quadrático com queda do nitrogênio amoniacal até a dose 25,18 mL/Kg MN, com a equação $Y = 3,355 - 0,141x + 0,0028x^2$ ($R^2 = 0,56$).

A manutenção do N amoniacal a baixos valores e a rápida queda do pH limitam a ocorrência de grandes taxas de proteólise, resultando em melhor preservação da proteína da forragem ensilada.

O nitrogênio amoniacal presente na silagem é um real indicador da extensão em que ocorreu a atividade dos clostrídeos, uma vez que esse produto é produzido em pequenas quantidades por outros micro-organismos da silagem e enzimas da planta. A fermentação por clostrídeos caracteriza-se por lenta elevação de temperatura no silo, pH elevado, alto teor de nitrogênio solúvel em água, alto nitrogênio volátil e baixa concentração de ácido lático (JASTER, 1994). Esses micro-organismos fermentam açúcares, ácido lático e aminoácidos,

produzindo ácido butírico e aminas. Esse tipo de fermentação resulta em significativas perdas de matéria seca e os produtos da fermentação reduzem a palatabilidade, além de diminuir a estabilidade aeróbia da silagem (ROTZ & MUCK, 1994).

Em relação à FDN e FDA das silagens tratadas com ambos os extratos enzimáticos foi encontrado menor recuperação com adição das enzimas. De acordo com as equações (Tabelas 12 e 13) existe uma queda linear na recuperação de FDN e FDA. Com o fungo *T. reesei* houve variação de 72,61% a 67,62% para a recuperação de FDN e 89,84% a 79,27% para a recuperação de FDA. Com o fungo *T. aurantiacus* houve variação de 74,82% a 68,09% para a recuperação de FDN e 97,18% a 82,31% para a recuperação de FDA.

Essa queda pode ser explicada pela atuação das enzimas presentes nos extratos enzimáticos, mostrando que existe atividade nas condições encontradas no interior dos silos (Figuras 25, 26, 27 e 28). Para que enzimas sejam efetivas, elas precisam ter atividade e estabilidade ótima por um período maior de tempo. Colombatto et al. (2004) demonstraram que enzimas produzidas por fungos mesofílicos conservam ao menos 70% de sua atividade por 48h a 39 °C e pH entre 4,0 e 6,8.

Além da hidrólise enzimática, reduções no pH do material podem causar aumento da hidrólise ácida da hemicelulose, resultando em menor recuperação de FDN.

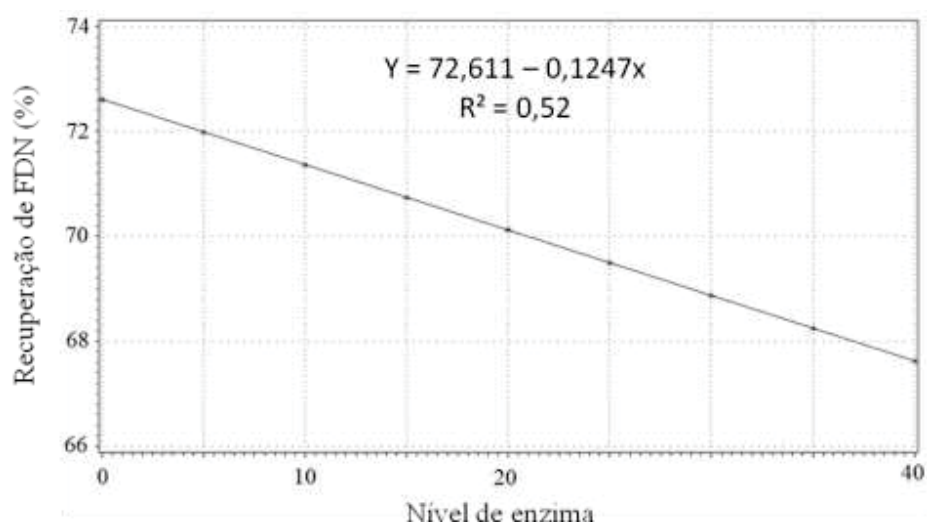


Figura 25. Recuperação de FDN da silagem de milho com adição de quatro doses de extratos enzimáticos do fungo *Trichoderma reesei* (0,10, 20 e 40 mL de extrato/Kg de MN).

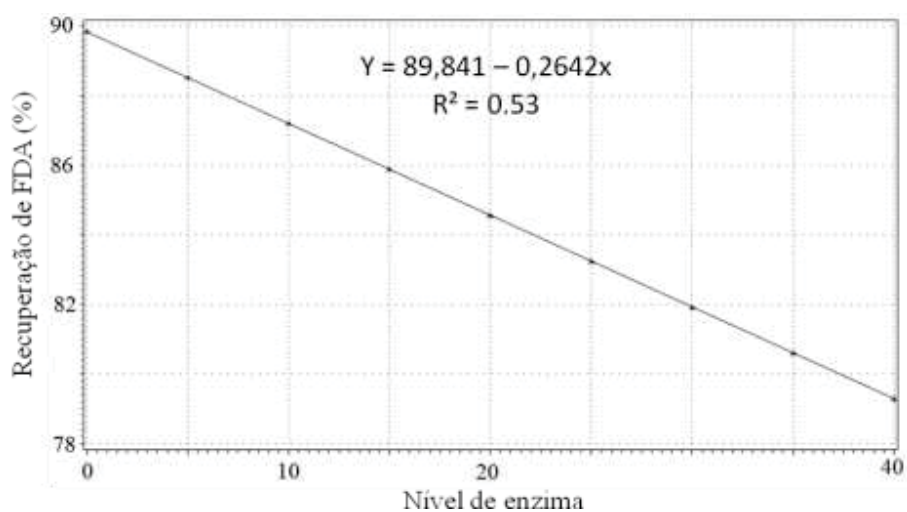


Figura 26. Recuperação de FDA da silagem de milho com adição de quatro doses de extratos enzimáticos do fungo *Trichoderma reesei* (0,10, 20 e 40 mL de extrato/Kg de MN).

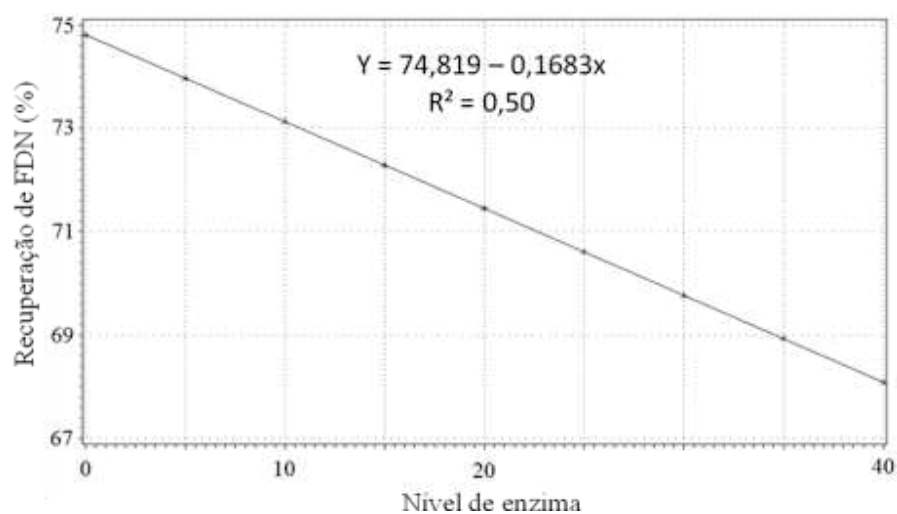


Figura 27. Recuperação de FDN da silagem de milho com adição de quatro doses de extratos enzimáticos do fungo *Thermoascus aurantiacus* (0,10, 20 e 40 mL de extrato/Kg de MN).

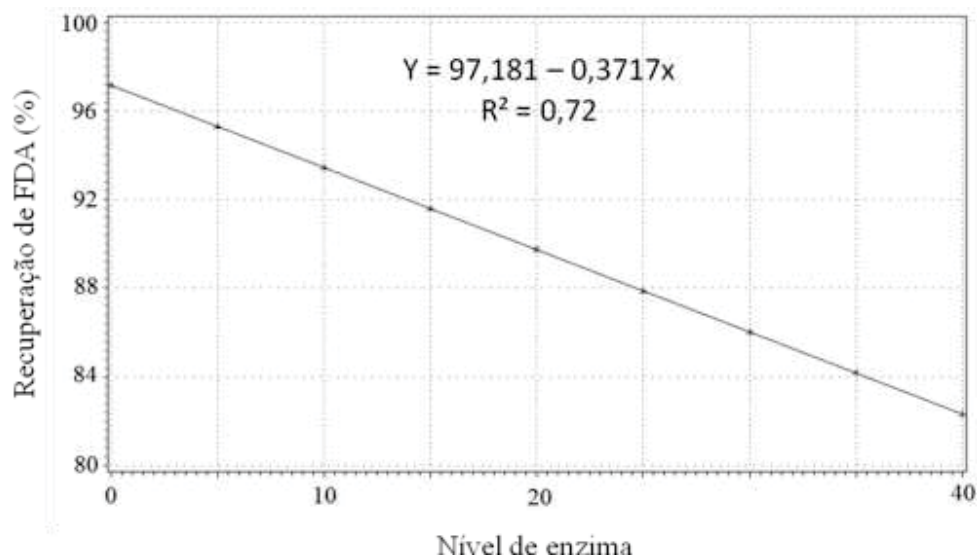


Figura 28. Recuperação de FDA da silagem de milho com adição de quatro doses de extratos enzimáticos do fungo *Thermoascus aurantiacus* (0,10, 20 e 40 mL de extrato/Kg de MN).

Rodrigues et al. (2004), na comparação entre material original e silagem, encontraram redução nos valores de FDN (69,66% contra 63,37%) e de FDA (39,11% contra 38,47%), sendo que os autores explicaram as reduções encontradas como resultado da degradação da hemicelulose por meio da ação de enzimas da própria planta e/ou adicionadas ao material, o que pode justificar o fato de no presente trabalho existir reduções de FDN e da FDA na silagem que teve adicionada enzimas na sua confecção.

Para os valores de recuperação de lignina foi possível encontrar diferença apenas quando adicionado o extrato do fungo *Thermoascus aurantiacus* (Figura 29), com variação de 65,56% a 39,43%. Esses valores podem ser resultado de erros de amostragem, pois o microrganismo *T. aurantiacus* não é produtor de ligninases. Se a digestibilidade da silagem fosse maior, se poderia confirmar os resultados encontrados na recuperação de lignina, o que não aconteceu.

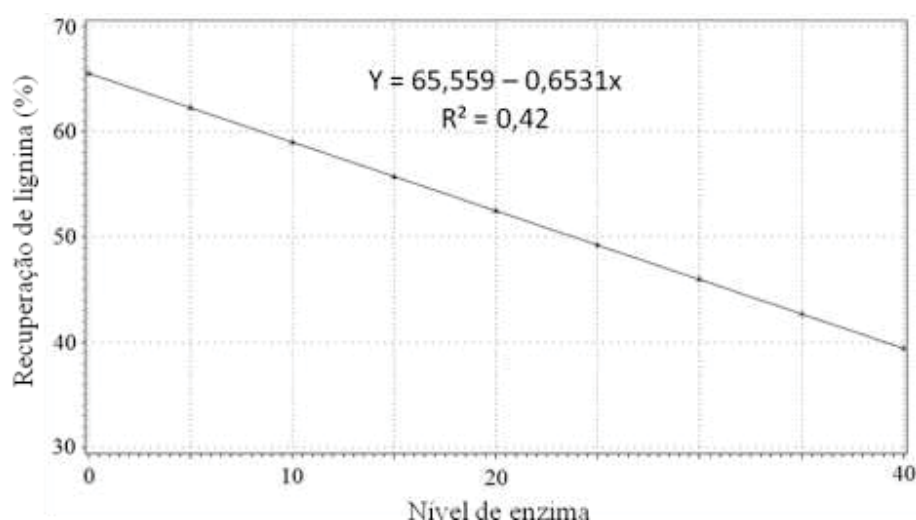


Figura 29. Recuperação de lignina da silagem de milho com adição de quatro doses de extratos enzimáticos do fungo *Thermoascus aurantiacus* (0,10, 20 e 40 mL de extrato/Kg de MN).

Em relação a variação de carboidratos não fibrosos (CNF), pode-se observar aumento entre o momento da ensilagem e após abertura dos silos.

Quando calculado aumento percentual para cada nível de enzima adicionado, os valores de CNF ficam evidentes (Tabela 14).

Tabela 14. Valores de carboidratos não fibrosos (%) antes da ensilagem e após a abertura dos silos e aumento percentual de cada tratamento com os fungos *Trichoderma reesei* e *Thermoascus aurantiacus*.

		Milho	Silagem	Aumento
	Controle	27,89	42,66	52,96 %
<i>Trichoderma reesei</i>	Trat 1	24,39	38,68	58,59 %
	Trat 2	23,86	40,67	70,45 %
	Trat 3	23,11	39,2	69,62 %
<i>Thermoascus aurantiacus</i>	Trat 1	28,27	39,26	38,87 %
	Trat 2	25,18	41,56	65,05 %
	Trat 3	21,13	39,83	88,5 %

Controle: sem adição de enzimas; Trat 1: 10 mL de extrato enzimático/Kg de MN; Trat 2: 20 mL de extrato enzimático/Kg de MN; Trat 3: 40 mL de extrato enzimático/Kg de MN.

Em relação aos dois fungos podem-se observar maiores variações de CNF com a adição de enzimas, podendo ser explicado pela quebra da parede celular e consequente aumento dos carboidratos presentes no conteúdo celular.

Esses resultados confirmam os resultados já apresentados mostrando que as enzimas são capazes de intensificar a hidrólise da parede celular vegetal.

6. CONCLUSÕES

Celulases e xilanases presentes em extratos enzimáticos fungicos, aplicados na planta de milho antes da ensilagem são capazes de alterar o processo fermentativo da silagem.

A hidrólise dos constituintes da parede celular causada pelas enzimas fibrolíticas pode causar queda na digestibilidade das silagens, quando aplicados antes da ensilagem.

Pelo potencial ação de hidrólise das enzimas, outras estratégias de aplicação devem ser testadas para a nutrição de ruminantes.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

As enzimas utilizadas nesse estudo, da forma que foram aplicadas, pioram a digestibilidade das silagens de milho, assim projetos futuros são necessários. Outras formas de aplicação ou utilização de outras enzimas, por exemplo, poderiam ser maneiras de explorar seu potencial.

As enzimas estudadas, se aplicadas na forragem momentos antes do seu consumo pelos animais, poderiam potencializar o aproveitamento do alimento. Diferente da aplicação antes da ensilagem, as enzimas aplicadas na forrageira no cocho, iriam disponibilizar açúcares solúveis para os animais, não sendo perdidos nas etapas anteriores ao fornecimento.

Outra estratégia é a utilização de outros fungos e enzimas. Fungos basideomicetos apresentam excelente potencial de produção de muitas enzimas, principalmente as do complexo ligninolítico. Essas enzimas merecem uma atenção especial em estudos futuros, pois diferente das enzimas celulolíticas e xilanolíticas, não tem a capacidade de hidrolisar a celulose e a hemicelulose, não hidrolizando a fibra potencialmente digestível, podendo potencializar a sua digestão.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLEN, M. S.; COORS, J. G.; ROTH, G. W. Corn silage. In: BUXTON, D. R.; MUCK, R. E.; HARRISON, J. H. (Ed.). **Silage science and technology**. Madison: ASA, 2003. p. 547-608
- AMARAL, L. R. Produção e Caracterização de Enzimas Celulolíticas e Hemicelulolíticas a Partir dos Fungos Termofílicos *Thermoascus aurantiacus* CBMAI756 e *Thermomyces lanuginosus* e Sacarificação Enzimática do Bagaço de Cana. **Monografia apresentada ao Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas da Unesp para obtenção do título de Bacharel em Química Ambiental**, São José do Rio Preto, 2008.
- BARROS, N, M; AZEVEDO, J, L; SERAFINI, L, A. **Biotecnologia: avanços na agricultura e na agroindústria**. Caxias do Sul – RS: Editora EDUCS, 2002.
- BEAUCHEMIN, K.A.; YANG, W.Z.; RODE, L.M. Effects of grain source and enzyme additive on site and extent of nutrient digestion on dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.82, p.378-390, 1999.
- BEG, Q.K.; KAPOOR, M.; MAHAJAN, L.; HOONDAL, G.S. Microbial xylanases and their industrial applications: a review. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 56, p. 326-338, 2001.
- BERNARDES, T. F. Controle da deterioração aeróbia de silagens. **Tese apresentada para a obtenção do título de doutor em zootecnia**. Jaboticabal, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, 2006.
- BOBBIO, F.O.; BOBBIO, P.A. Carboidratos. In: **Química do Processamento de Alimentos**, 3ª ed., Varela, cap. 1, p. 69, 2003.
- BUCKERIDGE, M.S., SILVA, G.B. & CAVALARI, A. A. (2008). **Parede Celular**. In: Kerbauy, G.B. (ed). 2ed. Fisiologia Vegetal, Guanabara Koogan: Rio de Janeiro. Pg. 165-181.
- BUCKERIDGE, M.S.; TINÉ, M.A.S.; SANTOS, H.P.; LIMA, D.U. Polissacarídeos de reserva de parede celular em sementes, estrutura, metabolismo, funções e aspectos ecológicos. **Rev. Bras. Fisiol. Vegetal**. 2000;12:137-162
- CANNEL, E.; MOO-YONG, M. Solid-state fermentation systems. **Process Biochemistry**, v. 15, p. 24-8, 1980.
- CASTILHO L.R. ; POLATO, C.M.S. ; BARUQUE, E.A ; SANT'ANNA JR., G.L. ; FREIRE, D.M.G. Economic analysis of lipase production by *Penicillium*

- restrictum in solid-state and submerged fermentations. **Biochemical Engineering Journal**, v. 4, p. 239–247, 2000.
- COLLINS, T.; GERDAY, C.; FELLER, G. Xylanases, xylanases families and extremophilic xylanases. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, p. 3-23, 2005.
- COLOMBATTO, D.; MOULD, F.L.; BHAT, M.K.; PHIPPS, R.H.; OWEN, E. In vitro evaluation of fibrolytic enzymes as additives for maize (*Zea mays* L.) silage. I. Effects of ensiling temperatura, enzyme source and addition level or thermophilic sources. **Animal Feed Science and Technology**, v. 111, p. 111-128, 2004.
- CYSNEIROS, C. dos S. S.; FRANCO, G. L.; ULHOA, C. J.; DIOGO, J. M. da S. D.; RAMOS, A. K. B. Efeito de enzimas fibrolíticas sobre a composição bromatológica de silagens de capins tropicais. **Ciência Animal Brasileira**. Goiânia, v. 7, n. 1, p. 1-10, jan./mar. 2006.
- DALLA-VECCHIA, R.; NASCIMENTO, M. G.; SOLDI, V. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. **Química Nova**, v. 27, n. 4, p. 623-630, 2004.
- DA-SILVA, R. Produção, purificação e caracterização de enzimas celulolíticas termoestáveis de *Humicola* sp. 179-5 e aplicação destas enzimas. **Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em Ciências de Alimentos. Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1992.**
- DA-SILVA, R.; GOMES, E.; FRANCO, C.M.L. Pectinases, hemicelulases e celulasas: substrato, ação, produção e aplicação no processamento de alimentos. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 31, v. 2, p. 249-250, 1997.
- 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, p.2905-2911, 1998.
- DILLON, A.J.L. Celulasas. In: **Enzimas como agentes biotecnológicos**. Editora Legis Summa, cap. 14, p. 243-271, 2004.
- DRIEHUIS, F.; OUDE ELFERINK, S.J.W.H.; SPOELSTRA, S.F. Anaerobic lactate degradation in maize silage inoculated with *Lactobacillus buchneri* inhibits yeast growth and improves aerobic stability. **Journal of Applied Microbiology**, v.87, p.583-594, 1999.

- FUKUDA, H.; KONDO, A.; TAMALAMPUDI, S. Bioenergy: Sustainable fuels from biomass by yeast and fungal whole-cell biocatalysts. **Biochem. Engineer. J.** v. 44, p. 2–12, 2009.
- GOERING, H.K.; VAN SOEST, P.J. **Forage fiber analysis (Apparatus, reagents, procedures and some applications)**. Washington, DC: USDA, 1970. (Agricultural Handbook, 379).
- GRAMINHA, E. B. N.; GONÇALVES, A. Z. L.; PIROTA, R. D. P. B.; BALSALOBRE, M. A. A.; Da SILVA, R.; GOMES, E. Enzyme production by solid state fermentation: Application to animal nutrition. **Animal Feed Scienc Technology**, v. 144, n 1-2, p. 1 – 22, 2008.
- GUNSTONE, F.D. Enzymes as biocatalysts in the modification of natural lipids, **Journal of the Science of Food and Agriculture** 79, 1535–1549, 1999.
- GUTIERREZ-ROJAS, M., FAVELA-TORRES, E. – Curso de fermentaciones en medio solido. **Biotecnologia para el aprovechamineto de residuos agroindustriales y municipales**. Jaguariuna, Ed EMBRAPA, 80 p, 1992.
- HALTRICH, D. ; NIDETZKY, B. ; KULBE, K.D. ; STEINER, W. ; ZUPANCIC, S. Production of fungal xylanases. **Bioresource Technology**, v. 58, p. 137 – 161, 1996.
- HENDERSON, N. Silage additives. **Animal Feed Science and Technology**, v.45, p.35-56, 1993.
- HENDRIKS, A.T.W.M.; ZEEMAN, G. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 10 - 18, 2009.
- HIGUCHI, T. Microbial degradation of lignin: role of lignin peroxidase, manganese peroxidase and laccase. **Proceedings of Japanese Academy**, v. 80, p. 204 - 214, 2004.
- HRISTOV, A.N.; McALLISTER, T.A.; CHENG, K.-J. Intraruminal supplementation with increasing levels of exogenous polisacharide-degrading enzymes: effects on nutrient digestion in cattle feed barley grain diets. **Journal of Animal Science**, v.78, p.477-487, 2000.
- IGARASI, M.S. Controle de perdas na ensilagem de capim Tanzânia (*Panicum maximum* Jack. Cv Tanzânia) sob os efeitos do teor de matéria seca, do tamanho de partícula, da estação do ano e da presença de inoculante bacteriano. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2002.

- 132p. **Dissertação (Mestrado em Ciência Animal e Pastagem)** - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2002.
- JASTER, E. **Fermentation principles of legume, grass forage examined.** Feedstuffs, Minneapolis, v.12, 1994. p.14-16.
- JOBIM, C.C., NUSSIO, L.G., REIS, R. A. E SCHMIDT, P. Avanços metodológicos na avaliação da qualidade da forragem conservada. Rev. Bras. Zootecn., 36 (suppl): 101-119. 2007.
- KATAPODIS, P.; NERINCKX, W.; CLAEYSSSENS, M.; CHRISTAKOPOULOS, P. Purification and characterization of a thermostable intracellular β -xylosidase from the thermophilic fungus *Sporotrichum thermophile*. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 2402–2409, 2006.
- KUNG JR., L.; RANJIT, N.K. The effect of *Lactobacillus buchneri* and other additives on the fermentation and aerobic stability of barley silage. **Journal of Dairy Science**, v.84, n5, p.1149-1155, 2001.
- LEE, J. Biological conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. **Journal of Biotechnology**, v. 56, p. 1-24, 1997.
- LEONOWICZ, A.; MATUSZEWSKA, A.; LUTEREK, J.; ZIEGENHAGEN, D.; WOJTAS-WASILEWSKA, M.; CHO, N. S.; HOFRICHTER, M.; ROGALSKI, J. Biodegradation of lignin by white rot fungi. **Fungal Genetics and Biology**, v. 27, p.115 - 185, 1999.
- LI YH, GUO R, YIN QY, DING M, ZHANG SL, XU GJ, ZHAO FG. Purification and characterization of two endo-beta-1,4-glucanases from mollusca, *Ampullaria crosseana*. **Acta Biochem. Biophys. Sin (Shanghai)**, 37(10): 702-708. 2005.
- LONSANE, B. K., SAUCEDO-CASTANEDA, G., RAIMBAULT, M., ROUSSOS, S., VINIEGRA-GONZÁLEZ, G., GHILDYAL, N. P., RAMAKRISHNA, M., KRISHNAIAH, M. M. Scale-up strategies for solid state fermentation systems. **Process Biochemistry**, v.27, p. 259 - 273, 1992.
- LOURES, D. R. S.; NUSSIO, L. G.; PAZIANI, S. de F.; PEDROSO, A. De F.; MARI, L. J.; RIBEIRO, J. L.; ZOPOLLATTO, M.; SCHMIDT, P.; JUNQUEIRA, M. C.; PACKER, I. U.; CAMPOS, F. P. de. Efeito de Enzimas Fibrolíticas e do Teor de Matéria Seca em Silagens de Capim-Tanzania sobre os Parâmetros Ruminais, o Comportamento Ingestivo e a Digestão de Nutrientes, em Bovinos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.34, n.3, p.736-745, 2005.
- MCDONALD, P.; HENDERSON, A.R.; HERON, S.J.E. **The biochemistry of silage**. 2.ed. Marlow: Chalcomb Publications, 340p, 1991.

- MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. **Microbiologia de Brock**. 10. ed. São Paulo: Person Education, 2004.
- MAHESHWARI, R.; BHARADWAJ, G.; BATH, M.K. Thermophilic fungi: their physiology and enzymes. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 64, p. 461-488, 2000.
- MARTINS, A. S.; VIEIRA, P. F.; BERCHIELLI, T. T; PRADO, I. N.; MOLETTA, J. L. Consumo e digestibilidade aparente total em bovinos sob suplementação com enzimas fibrolíticas. **R. Bras. Zootec.**, v.35, n.5, p.2118-2124, 2006.
- MARTINS, L.F.; KOLLING, D.; CAMASSOLA, M.; DILLON, A.J.P.; RAMOS, L.P. Comparison of *Penicillium echinulatum* and *Trichoderma reesei* cellulases in relation to their activity against various cellulosic substrates. **Bioresour. Technol.**, v. 99, p. 1417- 1424, 2008.
- MIYASAKI, M. K. Uso de aditivo microbiano e de filme plástico no controle da fermentação e da deterioração aeróbia de silagem de milho. **Dissertação (Mestrado em Zootecnia)**. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal. 92p., 2008.
- MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, p. 426 - 428, 1959.
- MITCHELL, D. A., VON MEIEN, O. F., LUZ JR, L. F. E., KRIEGER, N. Evaluation of productivity of zymotis solid-state bioreactor based on total reactor volume. **Food Technology and Biotechnology**, v. 40, p. 135 – 144, 2002.
- MORGAVI, D.P.; BEAUCHEMIN, K.A.; NSEREKO, V.L. et al. Synergy between ruminal fibrolytic enzymes and enzymes from *Trichoderma longibrachiatum*. **Journal of Dairy Science**, v.83, p.1310-1321, 2000.
- MUSSATO, S. I. & ROBERTO, I. Alternatives for detoxification of diluted-acid lignocellulosic hydrolyzates for use in fermentative processes: a review. **Bioresource Technology**, v. 93, p. 1–10, 2004.
- NEWBOLD, J. Proposed mechanisms for enzymes as modifiers of ruminal fermentation. In: FLORIDA RUMINANT NUTRITION SYMPOSIUM, 16., 1997, Gainesville. Proceedings... Gainesville: 1997. p.3-17.
- NELSON, D.L.; COX M. Carbohydrates and Glycobiology. In: **Lehninger Principles of Biochemistry**, 4^a ed., Palgrave Macmillan, cap. 7, p. 249, 2004.
- NEUMANN, M. Efeito do tamanho de partícula e da altura de colheita das plantas de milho (*Zea mays* L.) sobre perdas, valor nutritivo de silagens e desempenho de novilhos confinados. 2006, 203p. Tese (Doutorado em

Zootecnia) – Curso de Pós-graduação em Zootecnia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2006.

OUDE ELFERINK, S. J. W. H.; DRIEHIUS, F.; GOTTDCHAL, J. C. et al. Silage fermentation processes and their manipulation. 2002. HYPERLINK "<http://www.fao.org/walcent/faoinfo/agricult/agp/agpc/gp/silage/paper2.html>"

O'SULLIVAN, A. C. Cellulose: the structure slowly unravels. **Cellulose**, v. 4, p. 173-207, 1997.

PACIULLO, D.S.C. Características anatômicas relacionadas ao valor nutritivo de gramíneas forrageiras. **Cien. Rural**. 2002;32(2):357-364

PAHLOW, G; MUCK, R.E.; DRIEHUIS, F. et al. Microbiology of ensiling. In: BUXTON, D.R.; MUCK, R.E.; HARRISON, J.H. (Eds.) **Silage science and technology**. 1.ed. Madison: American Society of Agronomy, 2003. p.31-94.

PALMA, M. B. Produção de xilanase por *Thermoascus aurantiacus* em cultivo em estado sólido, **Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em Engenharia Química**. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2003.

PALMA-FERNANDEZ, E.R. Produção, purificação e caracterização bioquímica de B-glicosidases do fungo termofílico *Thermoascus aurantiacus* Miehe. **Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Área de Concentração Microbiologia Aplicada)**. Instituto de Biociências – Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Rio Claro, 2002.

PANDEY, A. Solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 3636, p. 1 - 4, 2002.

PAPINUTTI, V. L.; FORCHIASSIN, F. Lignocellulolytic enzymes from *Fomes scleroderneus* growing in solid state fermentation. **Journal of Food Engineering**, v. 81, p. 54 - 59, 2007.

PEDROSO, A.F.; NUSSIO, L.G.; PAZIANI, S.F. et al. Fermentation and epiphytic microflora dynamics in sugar cane silage. *Scientia Agricola*, v.62, p.427-432, 2005.

PÉREZ, J.; MUÑOZ-DORADO, J.; de La RUBIA, T.; MARTÍNEZ, J. Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. **Introductory Microbiology**, v. 5, p. 53 - 63, 2002.

- POLIZELI, M.L, RIZZATTI A.C, MONTI, R.; TERENCE, H.F., JORGE, J.A, AMORIN, D.S. Review: Xylanases from fungi: properties and industrial applications. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 67, p. 577 - 591, 2005.
- RANI, R.; KUMAR, A.; SOCCOL, C. R.; PANDEY, A. Recent advances in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 44, p. 13 – 18, 2009.
- ROCHA, K.D., PEREIRA, O.G., VALADARES FILHO, S.C., OLIVEIRA, A.P., PACHECO, L.B.B. E CHIZZOTTI, F.H.M. Valor nutritivo de silagens de milho (*Zea mays* L.) produzidas com inoculantes enzimbacterianos. **Rev. Bras. Zootec.**, 35: 389-395. 2006.
- RODRIGUES, P. H. M.; ALMEIDA, L. F. S.; LUCCI, C. S.; MELOTTI, L.; LIMA, F.R. Efeitos da adição de inoculantes microbianos sobre o perfil fermentativo da silagem de alfafa adicionada de polpa cítrica. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 33, n. 6, p. 1646-1653, 2004.
- ROTH, ANNA PAULA DE TOLEDO PIZA. Cana-de-açúcar in natura e queimada ensilada com cal virgem e diferentes tempos após a queima. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal/SP, 2009.
- ROTZ, C.A.; MUCK, R.E. Changes in forage quality during harvest and storage. In: Fahey Jr., G.C. **Forage quality, evaluation and utilization**. Madison. American Society of Agronomy. p. 828-868, 1994.
- SANDGREN, M.; STÅHLBERG, J.; MITCHINSON, C. Structural and biochemical studies of GH family 12 cellulases: improved thermal stability, and ligand complexes. **Progres. Biophys. Mol. Biol.**, v. 89, p. 246 - 291, 2005.
- SANTOS, E.M., ZANINE, A.M., FERREIRA, D.J., OLIVEIRA, J.S., PENTEADO, C.S. E PEREIRA, O.G. Inoculante ativado melhora a silagem de capim-tanzânia (*Panicum maximum*). *Arch. Zootec.*, 57: 35-42. 2008.
- SANTOS, M.C., NUSSIO, L.G., MOURÃO, G.B., SCHMIDT, P., MARI, L.J. E RIBEIRO, J.L. 2008. Influência da utilização de aditivos químicos no perfil da fermentação, no valor nutritivo e nas perdas de silagens de cana-de-açúcar. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 37, n.9, p.1555-1563, 2008.

- SANTOS, M.M.; ROSA, A.S.; DAL'BOIT, S.; MITCHELL, D.A.; KRIGER, N. Thermal denaturation: is solid-state fermentation really a good technology for the production of enzymes? **Bioresour. Technol.**, v. 93, p. 261 - 268, 2004.
- SCHULZE, E. Information regarding chemical composition of plant cell membrane. **Ber Dtsch Chem Ges**, v. 24, p. 2277-2287, 1891.
- SILVA, D. J.; QUEIROZ, A. C. **Análises de alimentos: métodos químicos e biológicos**. 3. ed. Viçosa: Imprensa Universitária da UFV, 2002. 165 p.
- SILVA, A. V.; PEREIRA, O. G.; GARCIA, R.; VALADARES, S. C.; CECON, P.; FERREIRA, C. L. L. F. Composição Bromatológica e Digestibilidade in Vitro da Matéria Seca de Silagens de Milho e Sorgo Tratadas com Inoculantes microbianos. **R. Bras. Zootec.**, v.34, n.6, p.1881-1890, 2005.
- SIQUEIRA, G.R. **Cana-de-açúcar (Saccharum officinarum L.) ensilada com aditivos químicos e bacterianos**. 2005. 91f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2005.
- SNIFFEN, C.J.; O'CONNOR, J.D.; VAN SOEST, P.J.; FOX, D.G.; RUSSELL, J.B. A net carbohydrate and protein system for evaluating diets. II. Carbohydrate and protein availability. **Journal of Animal Science**, v.70, p. 3562-3577, 1992.
- SOARES, M. ; CHRISTEN, P. ; PANDEY, A ; SOCCOL, C.R. Fruity flavour production by *Ceratocystis fimbriata* grown on coffee husk in solid-state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 35, p. 857–861, 2000.
- STOLP, H. **Microbial ecology: organisms, habitats, activities**. Cambridge: Cambridge University Press, 1988. 280p.
- TRAVAINI, R. Estudos sobre a produção e caracterização de enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas produzidas por *Penicillium viridicatum* RFC3 E *Trichoderma reesei* QM9414 e aplicação dos extratos enzimáticos na hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar. **Monografia Apresentada Para a Obtenção do Título de Bacharel em Química Ambiental**. São José do Rio Preto, Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho", 2008.
- VAN SOEST, P.J., ROBERTSON, J.B., LEWIS, B.A., 1991. Symposium: carbohydrate methodology, metabolism and nutritional implications in dairy cattle. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. **J. Dairy Sci.** 74, 3583–3597.
- VAN SOEST, P.J. Nutritional ecology of the ruminant. 2.ed. Ithaca: **Comstock Publication Association**, 1994. 476p.

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

WEISS, W. P.; CHAMBERAIN, D. G.; HUNT, C. W. Feeding silages. In: Silage Science and Technology. Buxton, D. R., Muck, R. E., Harrison, J. H. (ed.). **American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, Soil Science of America**. Madison, Wisconsin. 469-504, 2003.