UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

ENZIMAS FIBROLÍTICAS DE *Humicola grisea*: PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E SEUS EFEITOS SOBRE A DIGESTIBILIDADE *IN VITRO* DO CAPIM MARANDU, CASQUINHA DE SOJA, FENO DE TIFTON 85 E FORRAGEM DE MILHO

Cristine dos Santos Settimi Cysneiros

Orientador: Prof. Dr. Cirano José Ulhoa

GOIÂNIA
2009

Termo de Ciência e de Autorização para Disponibilizar as Teses e Dissertações Eletrônicas (TEDE) na Biblioteca Digital da UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás–UFG a disponibilizar gratuitamente através da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações – BDTD/UFG, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: **[ ] Dissertação** **[X] Tese**

2. Identificação da Tese ou Dissertação

Autora: Cristine dos Santos Settimi Cysneiros

CPF: E-mail: cysneiroscristine@hotmail.com
Seu e-mail pode ser disponibilizado na página? [ ]Sim [x] Não

Vínculo Empregatício do autor: Superintendência de Atenção Integral à Saúde/SES - GO
Agência de fomento: Sigla:
País: Brasil UF: GO CNPJ:
Título: Enzimas fibrolíticas de *Humicola grisea*: Produção, caracterização e seus efeitos sobre a digestibilidade *in vitro* do capim Marandu, casquinha de soja, feno de Tifton 85 e forragem de milho.
Palavras-chave: ANKOM, caracterização bioquímica, forragens, fungo termofílico, resíduos agroindustriais, soluções enzimáticas

Título em outra língua: Fibrolytic enzymes of *Humicola grisea:* Production, characterization and its effects on the *in vitro* digestibility of Marandu grass, soybean hulls, Tifton 85 hay and maize forage
Palavras-chave em outra língua: Agroindustrial byproducts, ANKOM, biochemical characterization, enzymatic solutions, forages, thermophilic fungus
Área de concentração: Produção Animal
Data defesa: 03/04/2009
Programa de Pós-Graduação: Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal
Orientador: Prof. Cirano José Ulhoa E-mail: ulhoa@icb.ufg.br
Co-orientador: Prof. Reginaldo Nassar Ferreira E-mail: nassar@icb.ufg.br
Co-orientador: Prof. Gumercindo Loriano Franco E-mail: gumercindo@nin.ufms.br

3. Informações de acesso ao documento:

Liberação para disponibilização?[1] [X] total [ ] parcial

Em caso de disponibilização parcial, assinale as permissões:
[ ] Capítulos. Especifique: _____
[ ] Outras restrições: _____

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF ou DOC da tese ou dissertação.
O Sistema da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações garante aos autores, que os arquivos contendo eletronicamente as teses e ou dissertações, antes de sua disponibilização, receberão procedimentos de segurança, criptografia (para não permitir cópia e extração de conteúdo, permitindo apenas impressão fraca) usando o padrão do Acrobat.

Data: 25/05/2009

_____
Assinatura do (a) autor (a)

[1] Em caso de restrição, esta poderá ser mantida por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Todo resumo e metadados ficarão sempre disponibilizados.

CRISTINE DOS SANTOS SETTIMI CYSNEIROS

ENZIMAS FIBROLÍTICAS DE *Humicola grisea*: PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E SEUS EFEITOS SOBRE A DIGESTIBILIDADE *IN VITRO* DO CAPIM MARANDU, CASQUINHA DE SOJA, FENO DE TIFTON 85 E FORRAGEM DE MILHO

Tese apresentada para obtenção do grau de Doutor em Ciência Animal junto à Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás.

Área de concentração:
Produção Animal

Orientador:
Prof. Dr. Cirano José Ulhoa
Comitê de Orientação:
Prof. Dr. Reginaldo Nassar Ferreira
Prof. Dr. Gumercindo Loriano Franco

GOIÂNIA
2009

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

(GPT/BC/UFG)

Cysneiros, Cristine dos Santos Settimi.
C997e Enzimas fibrolíticas de *Humicola grisea* [manuscrito]: produção, caracterização e seus efeitos sobre a digestibilidade *in vitro* do capim Marandu, casquinha de soja, feno de Tifton 85 e forragem de milho / Cristine dos Santos Settimi Cysneiros. – 2009.
vii, 104 f.: il., color., figs., tabs.

Orientador: Prof. Dr. Cirano José Ulhoa.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Goiás, Escola de Veterinária, 2009.

Bibliografia.
Incluem anexos.

1. Digestibilidade *in vitro* 2. *Humicola grisea* 3. Aditivos Enzimáticos 4. Forragens 5. Resíduo Agroindustrial I. Ulhoa, Cirano José. II. Universidade Federal de Goiás, **Escola de Veterinária.** III. Título.

CDU: 579.6

CRISTINE DOS SANTOS SETTIMI CYSNEIROS

Tese defendida e aprovada em **03/04/2009** pela Banca Examinadora constituída pelos professores:

Prof. Dr. Cirano José Ulhôa
(ORIENTADOR (A))

Prof. Dr. Roberto Guimarães Júnior (EMBRAPA Cerrados Planaltina/DF

Profa. Dra. Fabrícia Paula de Faria – ICB/UFG

Profa. Dra. Geisa Fleury Orsine –EV/UFG (memória)

Prof. Dr. Roberto do Nascimento Silva – ICB/UFG

AGRADECIMENTOS

A Deus, presença constante em minha vida, sempre me iluminando e abrindo novos caminhos. Obrigada Senhor por mais este trabalho.

A Jesus Cristo, meu mestre e amigo, que sempre me deu força para continuar a caminhada em busca de serenidade e paz de espírito.

Aos meus irmãos Frederico e Cristiane e meus sobrinhos, Cássio Filho e Yasmin, pelo amor, carinho e pelos momentos de alegria. A minha irmã Cyntia que se encontra na pátria espiritual, na certeza de que sempre torceu e se alegra por esta vitória. A minha família querida, obrigada pelo amor e incentivo.

Aos amigos de turma do curso de Mestrado e Doutorado em Ciência Animal e do Laboratório de Enzimologia do Instituto de Ciências Biológicas, pelos ensinamentos, pelos momentos de alegria, amizade e colaboração.

Aos amigos João Danilo e Taty, pela amizade, carinho e pelo caloroso acolhimento em Campo Grande, MS.

Ao prof. Dr. Gumercindo Loriano Franco, pela amizade, pelo laboratório e pelo acolhimento na Universidade Federal de Mato Grosso dos Sul.

Aos professores e funcionários da Universidade Federal de Goiás e ao colega Antônio, da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, pela colaboração e amizade.

Aos amigos Jayme e Luis Flávio, pela amizade, incentivo e ajuda.

A todos que colaboraram para realização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Aos meus pais, **Giuglio e Marise**, que com muito amor me criaram, pelo incentivo em mais este momento importante de minha formação. Vocês são responsáveis por esta vitória! Muito obrigada por fazerem parte da minha história.

Ao meu orientador, grande amigo e incentivador prof. Dr. **Cirano José Ulhoa**, por acreditar em meu trabalho, por ter contribuído de maneira importante em minha formação e amadurecimento profissional e pessoal ao longo de 12 anos de convivência. Muito obrigada pela sua amizade, orientação, confiança, dedicação, pelos valiosos ensinamentos e pelo exemplo profissional.

Ao amigo, prof. Dr. **Reginaldo Nassar Ferreira**, que não mediu esforços para que este trabalho pudesse ser realizado. Considero que tive dois grandes orientadores, um deles foi você. Muito obrigada pela confiança, amizade, colaboração valiosíssima e pelo incentivo em minha carreira profissional. Devo a você grande parte deste trabalho.

Ao meu grande amigo **Wanderley Borges da Silva**, presença constante durante este trabalho, por ter contribuído de forma valiosa na realização dos experimentos, pelo incentivo, pelas orações, pela força, pelos momentos de descontração e alegria. Palavras são poucas para registrar a minha eterna gratidão.

Ao pesquisador **Waldomiro Barioni Júnior,** da Embrapa Pecuária Sudeste, que mais uma vez se mostrou verdadeiro amigo. Muito obrigada pela amizade, carinho, confiança, incentivo e pelo desprendimento em me ajudar.

Aos companheiros **Michelly Ayres Oliveira, Adriano Oliveira Favoretto e Fabyano Álvares Cardoso Lopes** que se mostraram colaboradores e amigos neste período de dedicação. Serei sempre grata a vocês.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 CONSIDERAÇÕES GERAIS 1
1INTRODUÇÃO 1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 3
2.1 A parede celular das plantas 3
2.1.1 Principais componentes das paredes celulares 5
2.1.1.1 Substâncias Pécticas 5
2.1.1.2 Hemicelulose 7
2.1.1.3 Celulose 9
2.1.1.4 Lignina 11
2.1.1.5 Proteínas e Glicoproteínas 13
2.2 Amido 14
2.3 Ambiente ruminal 15
2.4 Forrageiras e resíduo agroindustrila 17
2.4.1 *Brachiaria brizantha* cv. Marandu 17
2.4.2 Forragem de Milho 18
2.4.3 Casquinha de Soja 18
2.4.4 Feno de Tifton 85 18
2.5 Modelo conceitual de hidrólise da parede celular de forragens 20
2.6 Microrganismos termofílicos**.** 23
2.7 O fungo *Humicola grisea* var. *thermoidea* 25
2.8 Enzimas fibrolíticas 26
2.8.1 Caracterização e modo de ação das enzimas 31
2.8.2 Respostas obtidas com adição de enzimas 33
3. OBJETIVOS. 36
3.1.Objetivo Geral 36
3.2 Objetivos Específicos 36
REFERÊNCIAS 37
CAPÍTULO 2 PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ENZIMAS HIDROLÍTICAS DE *Humicola grisea* var. *thermoidea* 47
RESUMO 47
ABSTRACT 48
1 INTRODUÇÃO 49

2 MATERIAL E MÉTODOS 51
2.1 Local e período experimental 51
2.2 Linhagem utilizada e manutenção do fungo 51
2.3 Produção das soluções enzimáticas 51
2.4 Caracterização enzimática 52
2.4.1 Dosagem de proteínas totais 52
2.4.2 Determinação da atividade enzimática 52
2.4.2.1 Celulase total. 52
2.4.2.2 Xilanase. 53
2.4.2.3 β-Glicosidase. 53
2.4.2.4 CMCase. 54
2.4.2.5 Exocelulase. 54
2.4.2.6 Pectinase 54
2.4.2.7 Amilase 55
2.5 Caracterização bioquímica. 55
2.5.1 pH ótimo. 56
2.5.2 Temperatura ótima. 56
2.5.3 Termoestabilidade 56
2.6 Concentração das soluções enzimáticas 56
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO 57
3.1 Produção dassoluções enzimáticas 57
3.2 Caracterização bioquímica 61
3.2.1 Temperatura ótima 61
3.2.2 pH ótimo 64
3.2.3 Termoestabilidade 67
3.3 Atividade enzimática após concentração por ultrafiltração. 69
4 CONCLUSÃO 72
REFERÊNCIAS 73
CAPÍTULO 3 POTENCIAL DE ENZIMAS FIBROLÍTICAS PRODUZIDAS POR *H. grisea* SOBRE A DIGESTIBILIDADE *IN VITRO* DA MATÉRIA SECA DO CAPIM MARANDU, CASQUINHA DE SOJA, FENO DE TIFTON 85 E FORRAGEM DE MILHO 77
RESUMO 77

ABSTRACT 78
1 INTRODUÇÃO 79
2. MATERIAL E MÉTODOS 80
2.1 Local e período experimental 80
2.2 Substratos utilizados no experimento 80
2.3 Tratamento dos substratos com enzimas fibrolíticas 81
2.4 Digestibilidade verdadeira *in vitro* da matéria seca (DVIVMS). 81
2.4.1 Preparação dos sacos de filtro F57 e dos substratos 81
2.4.2 Preparação das soluções tampões 82
2.4.3 Coleta, preparação do líquido ruminal e incubação 82
2.4.4 Determinação da fibra em detergente neutro 83
2.5 Delineamento e análise estatística 85
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO 86
3.1 Digestibilidade verdadeira *in vitro* da matéria seca (DVIVMS). 86
4 CONCLUSÃO 94
REFERÊNCIAS 95
CAPÍTULO 4 CONSIDERAÇÕES FINAIS 98
ANEXO 99

RESUMO

Enzimas fibrolíticas exógenas são produzidas por cultura específica de bactérias ou fungos. São essenciais aos animais por estarem envolvidas na hidrólise dos componentes complexos das dietas em moléculas orgânicas mais simples como glicose, celobiose, xilose, aminoácidos, ácidos graxos, que são então usadas pelos microrganismos do rúmen e/ou pelo animal. Melhoras no desempenho dos ruminantes devido ao uso de enzimas fibrolíticas são atribuídas principalmente à maior degradação da fibra no rúmen, o que resulta em aumento da ingestão de energia disponível pelos animais. Os objetivos deste trabalho foram os de produzir e caracterizar quatro soluções enzimáticas, utilizando o fungo *Humicola grisea* var. *thermoidea* e avaliar seus efeitos por meio da digestibilidade verdadeira *in vitro* da matéria seca de quatro substratos: capim Marandu, casquinha de soja, feno de Tifton-85 e forragem de milho. As soluções enzimáticas foram produzidas a partir de quatro meios de culturas diferentes, contendo a fonte de carbono específica, durante 96 horas de cultivo, a 42°C. Foi observado que o fungo produziu as enzimas celulases, xilanase e β-glicosidase em diferentes concentrações, o que foi dependente da fonte de carbono. A caracterização bioquímica mostrou que a celulase produzida apresentou maior atividade em temperatura entre 40ºC e 50°C. A temperatura ótima de xilanase e β-glicosidase foi entre 50 e 60°C. O pH ótimo da enzima celulase foi 6,0, quando o fungo cresceu em feno de Tifton, forragem de milho e casquinha de soja. Para o capim Marandu, a enzima apresentou atividade ótima em pH 5,5. Para as quatro fontes de carbono, a xilanase produzida apresentou pH ótimo de 6,0. Em relação a β-glicosidase, a atividade enzimática foi maior em pH 5,5, no meio com feno de Tifton. Para capim Marandu, a atividade da enzima foi máxima na faixa de 5,5 a 6,5. Quanto à forragem de milho e casquinha de soja, a enzima exibiu maior atividade em pH 6,5. A celulase produzida, nas quatro fontes de carbono, permaneceu estável após a incubação por 60 minutos, a 39°C. Xilanase produzida apresentou estabilidade térmica durante 240 minutos de incubação, a 50°C. A β-glicosidase, dependendo da fonte de carbono, manteve de 66,7 a 125,75% de sua atividade, a 50°C, durante 240 minutos. Para avaliar o potencial das soluções enzimáticas sobre a digestibilidade *in vitro* dos substratos, 2,5; 5,0 e 10 mL de cada solução foram aplicados, por aspersão, em 17 g dos seus respectivos substratos, moídos em peneira com malha de 1 mm de diâmetro. Após aspersão, as enzimas ficaram em contato com os substratos por 2 e 24 h (tempo de reação enzima-substrato), antes de serem incubados no rúmen. A digestibilidade *in vitro* da MS foi avaliada em líquido ruminal tamponado, durante o período de 12, 24, 48 e 96 h. Para cada substrato, foram incubados 34 sacos (4 níveis de enzimas x 4 períodos de incubação x 2 repetições x 1 branco x 1 testemunha). As soluções enzimáticas, em qualquer nível de enzimas, quando comparados aos tratamentos controle, aumentaram a digestibilidade da MS dos substratos, nos tempos de reação enzima-substrato e período de incubação no rúmen. Este estudo mostrou que enzimas fibrolíticas exógenas produzidas por *H. grisea* tem potencial para uso como aditivo em dietas de ruminantes.

Palavras-chave: ANKOM, caracterização bioquímica, forragens, fungo termofílico, resíduos agroindustriais, soluções enzimáticas

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

1 INTRODUÇÃO

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

Ainda que os microrganismos do rúmen consigam digerir celulose e outros carboidratos fibrosos, fatores relacionados à estrutura e composição da planta, como as interações físico-químicas entre a matriz de hemicelulose e lignina, e aspectos relacionados ao animal, como a mastigação, salivação e pH ruminal, podem limitar a extensão da digestão no rúmen, por representarem barreiras aos processos fibrolíticos (MARTINS et al., 2006).

Na utilização de produtos biotecnológicos, estudos vêm avaliando o efeito de enzimas fibrolíticas exógenas, principalmente celulase e xilanase, em potencializar a ação das enzimas produzidas pelos microrganismos do rúmen na degradação dos polissacarídeos estruturais, estimulando a digestão total e a taxa de degradação (NEWBOLD, 1997).

Estudos mostram que enzimas fibrolíticas podem agir diretamente sobre a fibra (FENG et al., 1996) ou aumentar a degradação da MS e da FDN no rúmen (FENG et al., 1996, HRISTOV et al., 2000). De acordo com MCALLISTER et al. (2001), essas ações estariam interligadas, de modo que as alterações mediadas pelas enzimas antes do consumo refletiriam nas digestões ruminal e pós-ruminal dos nutrientes, com aumento da produção de leite (SCHINGOETHE et al., 1999) ou do ganho de peso dos bovinos (BEAUCHEMIN et al., 1995).

LEWIS et al. (1996) avaliaram diferentes métodos de aplicação de enzimas fibrolíticas e não observaram diferenças em fornecê-las via rúmen ou diretamente na forragem, sobre as características digestivas de novilhos. Segundo os autores, as enzimas, quando adicionadas no rúmen, podem sofrer hidrólise ou ficarem suspensas na fase fluida, sendo eliminadas desse compartimento antes mesmo que ocorra o seu contato com a partícula alimentar, interação necessária para a degradação do alimento. Contudo, estudos recentes

têm demonstrado que enzimas fibrolíticas podem ser resistentes às proteases por período significativo de tempo (MORGAVI et al., 2000), aumentando o potencial hidrolítico ruminal.

A eficiência de enzimas fibrolíticas na produção animal é observada em vários experimentos, entretanto, não há informações suficientes para garantir a consistência e a magnitude destas respostas, o que se deve a vários fatores como: fonte de enzimas, método de aplicação do aditivo, tipo de dieta, atividade enzimática, taxa de aplicação da enzima, tempo de reação e especificidade enzima-substrato e estado fisiológico dos animais (BEAUCHEMIN et al., 1998).

Pesquisas mostram que não é possível predizer, somente com base na caracterização bioquímica, o potencial das enzimas exógenas em aumentar a degradação da parede celular no rúmen. Conseqüentemente, sistemas *in vitro*, como os que permitem medir a degradabilidade da fibra e a produção de gás, são usados para reconhecer a eficiência de grupos de enzimas (COLOMBATTO et al., 2003).

Este trabalho foi realizado com o objetivo de produzir e caracterizar quatro soluções enzimáticas, utilizando o fungo *Humicola grisea* var. *thermoidea* e avaliar seus efeitos por meio da digestibilidade verdadeira *in vitro* da matéria seca de quatro substratos: capim Marandu, casquinha de soja, feno de Tifton-85 e forragem de milho.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A parede celular das plantas

A parede celular, classificada em primária e secundária, é a principal característica que diferencia as células animais das vegetais. Apresenta funções essenciais e específicas, sendo uma estrutura dinâmica, metabolicamente ativa, cuja propriedade, composição e forma sofrem alterações constantes em resposta ao crescimento, atividade da célula e ambiente. Por certo tempo, foi considerado como produto inativo do protoplasma (MARCON, 2004).

Segundo BACIC et al. (1988), parede primária é o termo usado para designar a camada mais externa das células das plantas em crescimento, dos tecidos vegetais suculentos e das células parenquimáticas das folhas e frutos e é durante o seu crescimento que pectina, xilana, celulose, proteínas e ácidos fenólicos são depositados.

Após cessar o alongamento da célula, a parede secundária, camada mais interna, começa a ser depositada sobre a primária (O' NEILL et al., 1996). Durante o crescimento secundário, a parede vai se tornando progressivamente mais espessa, crescendo da região mais interna da parede primária em direção ao centro da célula. A parede secundária é rica em celulose, mas contém baixo teor de xilana e pectina (BACIC et al., 1988).

A arquitetura da parede é descrita como sendo um esqueleto de celulose e hemiceluloses, em ligações cruzadas, imerso em uma matriz de substâncias pécticas e reforçado com proteínas estruturais e substâncias aromáticas (BRETT e WALDRON, 1996), Figura 1.

A estrutura química dos carboidratos, em sua maior parte, já foi estabelecida, mas pouco se conhece sobre as ligações cruzadas que unem os polímeros da parede celular (O' NEILL et al., 1996).

De acordo com ALBERSHEIM et al. (1996), mais de 100 diferentes monossacarídeos têm sido descritos na natureza. No entanto, somente dez desses resíduos são quantitativamente blocos construtores das paredes celulares das plantas superiores, a saber: L-arabinose, D-xilose, D-glicose, D-galactose, D-

manose, ramnose, fucose, 6-desoxi-hexose, ácidos D-galacturônicos, D-glucurônicos e 4-*O*-metil-D-glucurônico.

ASPINALL (1981) relatou que os polissacarídeos constituintes da parede são freqüentemente isolados e classificados após extração seqüencial com solventes aquosos. Os extratos, apesar de pequenas diferenças químicas, são muitas vezes misturas de diferentes polissacarídeos ou frações de polissacarídeos. Como conseqüência, foi necessário utilizar uma classificação mais precisa com base na estrutura química desses compostos. Assim, eles foram divididos em cinco grupos, como: glucanas, que incluem celulose, xiloglucanas e β-1,3-1,4-glucanas; ramnogalacturonanas, constituídas pelas arabinanas e arabinogalactanas; mananas, formadas por glucomananas e galactoglucomananas; xilanas e, por fim, glucuronomananas (ASPINAL, 1981).

Ainda que a parede celular apresente uma arquitetura básica semelhante, existem diferenças importantes entre os maiores grupos taxonômicos de forragens quanto à composição e estrutura da parede. As folhas das leguminosas, diferentemente das gramíneas, possuem menos parede celular e sua concentração se mantém constante com a maturação. Os caules de todas as forragens contêm mais parede celular do que as folhas, com aumento na maturidade (ASPINAL, 1981).

Segundo ALBERSHEIM et al. (1996), os principais polissacarídeos presentes na parede celular primária das dicotiledôneas são celulose, xiloglucanas e os polissacarídeos pécticos. Na parede secundária, celulose, xilanas e lignina são observadas em maior quantidade.

Em oposição às dicotiledôneas, a matriz da parede celular primária de gramíneas é pobre em xiloglucanas e polissacarídeos pécticos. Os principais carboidratos são arabinoxilana, glucuronoarabinoxilana, celulose e proporções de xiloglucanas e ligações mistas de β-glucanas. A parede secundária das gramíneas, como nas dicotiledôneas, é dominada por celulose, xilanas e lignina (ALBERSHEIM et al., 1996).

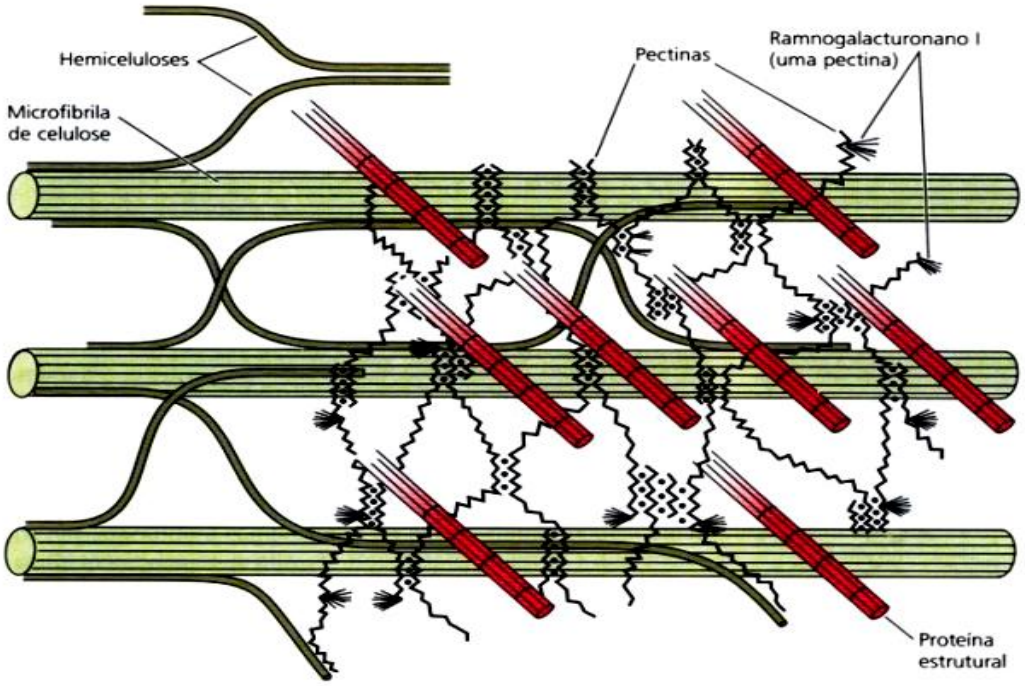

FIGURA 1 - Principais componentes estruturais da parede celular, adaptado de BRETT e WALDRON (1996)

2.1.1 Principais componentes das paredes celulares

2.1.1.1 Substâncias Pécticas

Pectina é um termo genérico designado para um grupo de polissacarídeos de estrutura coloidal complexa (Figura 2), localizados na parede celular primária e em maior concentração na lamela média de plantas superiores, que é a camada intercelular mais externa da parede celular, responsável pela aderência de duas células adjacentes, perfazendo10 a 30% do tecido intacto (WILLATS, 2006). Nessa faixa de concentração, a pectina forma uma estrutura que protege a célula, sendo como o polímero de celulose, responsável pelas propriedades estruturais das plantas (FILHO, 2004).

São substâncias pécticas os polímeros em que o ácido galacturônico se encontra metil-esterificado (pectinas), os polímeros em que esse se encontra desesterificado (ácidos pécticos) e os polissacarídeos neutros que apesar de não

possuírem uma cadeia de ácido galacturônico se encontram geralmente em associação com arabinanas, galactanas e arabinogalactanas (DEVRIES et al., 1982, 1983).

As pectinas são formadas por cadeias lineares de ácido D-galacturônico em ligação α-(1→4), interrompidas por resíduos de L-ramnose em ligação α-(1→2), e de cadeias laterais, constituídas principalmente de arabinose e galactose (DEVRIES et al., 1982, 1983). Os principais pontos de ramificação são as posições C-4 dos resíduos de ramnose, havendo também cadeias laterais ligadas diretamente ao C-2 ou C-3 do resíduo do ácido galacturônico (ASPINALL, 1981).

Segundo O' NEILL et al. (1996), tanto nas monocotiledôneas como nas dicotiledôneas (leguminosas), três polissacarídeos pécticos da parede celular primária têm sido caracterizados. São eles: ramnogalacturonana I (RG I), ramnogalacturonana II (RG II) e homogalacturonana, variando em proporções e características estruturais conforme a planta.

Ramnogalacturonana I é um heteropolímero de unidades repetitivas do dissacarídeo [→4)-α-D-GalA-(1→2)-α-L-Rha-(1→]. Aproximadamente 50% dos resíduos de Rha, em C-4, são pontos de ramificação de cadeias laterais curtas, ricas em arabinose e/ou galactose, distribuídas de maneira irregular. Já as RG II possuem estrutura incomum, sendo formadas por doze açúcares diferentes, alguns deles não usuais, que ocorrem como cadeias laterais de (ramno) galacturonanas com ligações diretas no C-2 ou C-3 de resíduos de ácido galacturônico (VARNER e LIN, 1989).

As homogalacturonanas são polissacarídeos de resíduos de (1→ 4) α-D-Gal*p*A, em geral parcialmente esterificados com metanol; por desesterificação e retratamento da homogalacturonanas com endo-PG (endo-poligalacturonase) resulta na formação de mono, di e trissacarídeos. Resíduos de ramnose podem ser encontrados ocasionalmente na homogalacturonana. A distribuição dos diferentes polissacarídeos pécticos na parede celular não é bem conhecida (VARNER e LIN, 1989).

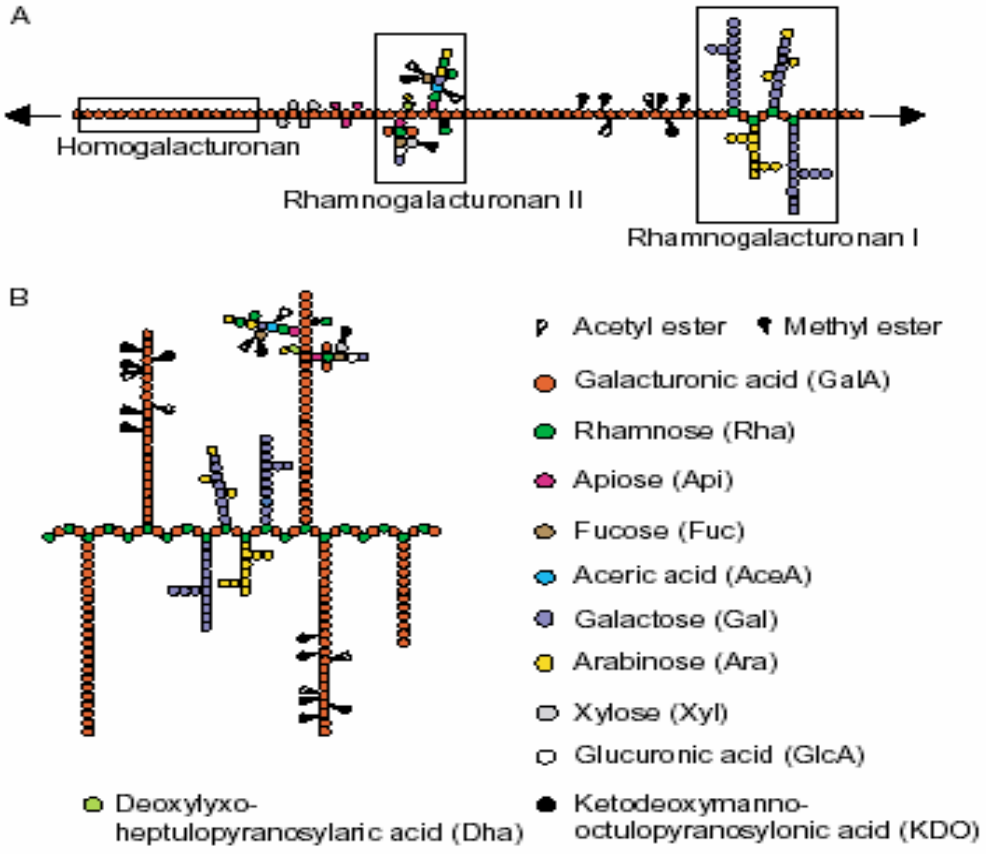

FIGURA 2 - Estrutura básica da pectina. (A) Representação esquemática convencional; (B) Estrutura proposta recentemente. Os polímeros mostrados ilustram alguns dos principais domínios encontrados na maioria das estruturas mais definidas de pectinas (WILLATS, 2006)

2.1.1.2 Hemiceluloses

As hemiceluloses são polissacarídeos, de cadeia linear e/ou ramificada, de baixo peso molecular que se ligam às microfibrilas de celulose, especialmente em tecidos não lignificados. São componentes estruturais, facilmente hidrolisáveis, compreendendo de 30 a 40% dos carboidratos totais das células vegetais, além de corresponder a 40% do peso seco da biomassa vegetal. (WILKIE, 1979).

Segundo BASTAWDE et al. (1992), as hemiceluloses são classificadas com base nos resíduos de açúcar da cadeia principal, sendo a maioria

heteropolissacarídeos com um ou mais diferentes resíduos de açúcar, a saber: D-xilose, D-manose, D-glicose, L-arabinose, D-galactose, L-ramnose. Adicionalmente, as moléculas de hemicelulose podem ser compostas de ramificações de resíduos de ácido D-galacturônico e ácido D-glucurônico, ácido 4-*O*-metil-D-glucurônico, grupos *O*-acetil, ácido ferúlico e ácido coumárico (HISAMATSU et al.,1992). Fazem parte do grupo das hemiceluloses: xilana, manana, galactana e arabinana (BEG et al., 2001).

Xilana, a mais abundante das hemiceluloses, encontra-se entre as moléculas de lignina e as fibras de celulose (FILHO, 1994). A cadeia principal, podendo ser linear ou ramificada, é formada de resíduos de xilopiranose que se unem por ligações do tipo β-1,4. Dependendo da origem, a cadeia linear pode ser substituída por acetilação das unidades de xilose, adição de resíduos de ácidos glucurônicos e arabinose. O seu grau de polimerização varia de 70 a 130 (xilanas de coníferas) e de 150 a 200, xilanas de folhosas (O'NEILL et al., 1996).

Conforme FILHO (1994), de acordo com a estrutura química e os grupos substituintes da cadeia lateral, as xilanas estão complexadas e covalentemente ligadas em vários pontos com sobreposição das bainhas de lignina, produzindo uma capa ao redor, interpondo os fios de celulose por pontes de hidrogênio. As camadas de xilanas ligadas por ligações covalentes à lignina e suas interações não covalentes com a celulose são importantes para manter a integridade da celulose e, conseqüentemente, para proteger a fibra contra ação de celulases.

O'NEILL et al. (1996) observaram que, freqüentemente, diferentes substituintes são encontrados na cadeia principal, permitindo a seguinte caracterização do polissacarídeo: homoxilana linear, arabinoxilana, acetilxilana, glucuronoxilana e glucuronoarabinoxilana. Os substituintes são: resíduos de L-arabinose, D-glicose, D-galactose, acetilação no C2 ou C3 das unidades de xilose; ácidos glucurônicos ou metil-glucurônicos unidos por ligações α-1,2; ácidos ferúlico ou cumárico ligados ao C5 da arabinose.

As arabinoxilanas apresentam um alto grau de ramificação com grupos L-arabinofuranosil ligados às unidades de xilose por ligações α-1,2, α-1,3 ou ambas, sendo a cadeia principal formada por ligações tipo β-1,4 (KULKAMI et al., 1999).

De acrodo com McNEILL et al. (1984), as xiloglucanas são formadas de cadeias lineares de (1→4)β-D-glicose e várias unidades de α-D-xilose como constituintes da cadeia lateral; algumas das unidades de xilose podem ser substituídas por resíduos de α-L-arabinose, β-D-galactose e/ou α-L-fucose. As xiloglucanas são construídas em blocos de seis a onze açúcares, tendo três principais variantes estruturais: fucogalacto-XyG (xiloglucanas), arabino-XyG e GAX (glucuronoarabinoxilano) com estruturas variadas (Figura 3).

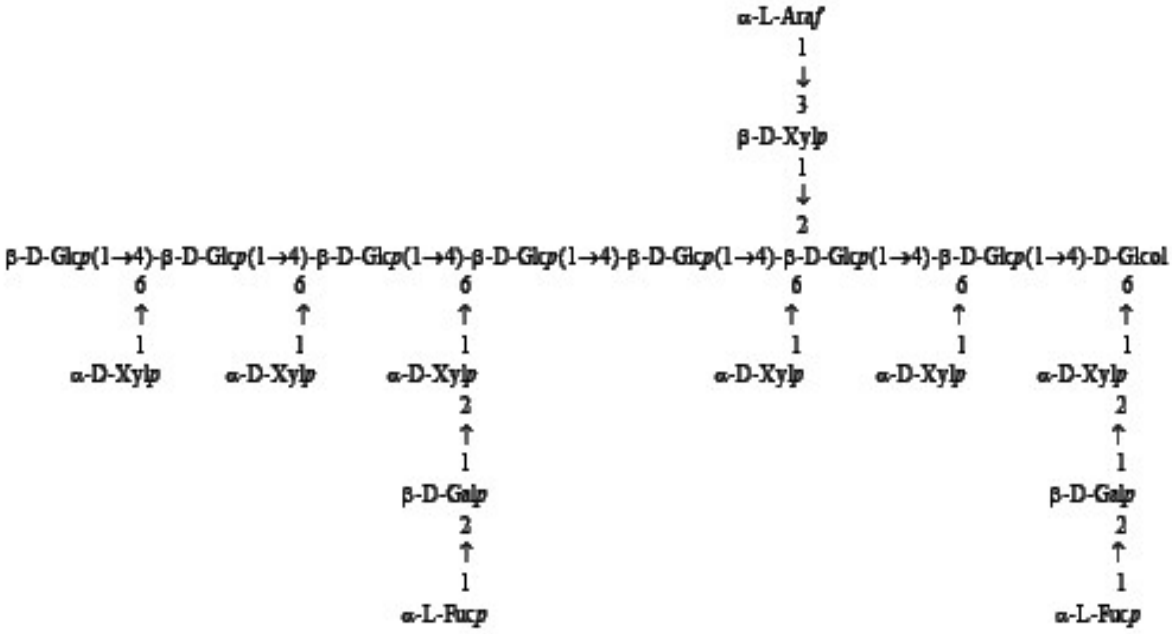

FIGURA 3 - Estrutura do oligossacarídeo, constituído por 20 resíduos glicosídicos, obtido das xiloglucanas das células de sicómoro de cultura em suspensão, por tratamento com endo-b-(1→4)-D-glucanase (HISAMATSU et al.,1992)

2.1.1.3 Celulose

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

De acordo com BROWN & SAXENA (2000), a celulose é sintetizada como moléculas individuais, uma longa seqüência linear de resíduos de (1→4)-β-D-glicopiranoses, que se arranjam no local da biossíntese para formar unidades maiores chamadas de protofibrilas. Aproximadamente 30 moléculas de celulose compõem cada protofibrila, que por sua vez, são empacotadas em unidades maiores denominadas de microfibrilas. O conjunto de microfibrilas forma a fibra de celulose.

BROWN & SAXENA (2000) relataram que devido às ligações equatoriais, a cadeia de celulose é linear, com tendência a formar uma estrutura cristalina distinta. Porém, as fibras desse polímero não se encontram na natureza na forma puramente cristalina. Ao longo das microfibrilas existem regiões cristalinas altamente ordenadas, que se intercalam com regiões amorfas mais abertas. Seu grau de cristalização varia muito, apresentando valores abaixo de 20% na parede primária e acima de 70% na parede secundária (Figura 4).

Uma característica importante da estrutura cristalina da celulose é que as moléculas componentes das microfibrilas individuais são empacotadas suficientemente coesas para evitar a penetração não só de enzimas, mas de moléculas tão pequenas quanto à água. As regiões amorfas podem apresentar vários tipos de irregularidades tais como: micro poros, depressões, rachaduras e torções; tais regiões são alvos de enzimas hidrolíticas (BLOUIN et al., 1970).

O domínio celulose/hemicelulose determina a forma da célula. Durante o processo de biossíntese, as hemiceluloses interagem especificamente com a celulose orientando sua microfibrilas e o seu crescimento (ATALLA et al., 1993). O grau de polimerização da celulose na parede celular primária varia de 2.000 a 6.000 resíduos de D-glicose e, na secundária, a média de polimerização está em torno de 10.000 daltons (REID, 1997).

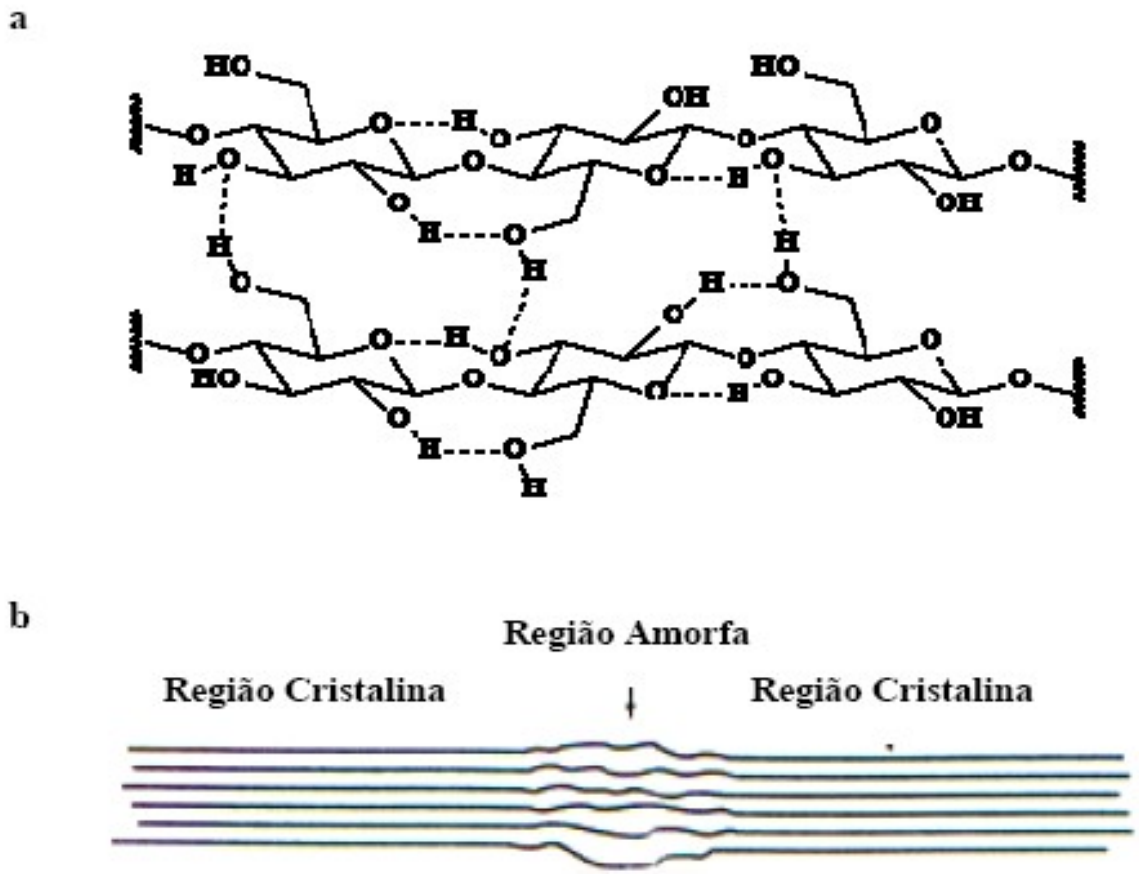

FIGURA 4 - Esquematização da estrutura da fibra de celulose. (a) Ligações de hidrogênio entre as microfibrilas de celulose; (b) Disposição das microfibrilas, formando as regiões cristalinas e regiões amorfas da fibra celulósica

2.1.1.4 Lignina

A lignina, a macromolécula aromática mais abundante da terra, é construída a partir de unidades de fenilpropano (SANTANA et al., 2006). Esses compostos fenólicos podem também estar envolvidos nas ligações cruzadas entre moléculas de xilana e na ligação da xilana a outros polissacarídeos (TUNCER et al., 1999). A lignina é encontrada na parede celular, com predomínio nos tecidos vasculares especializados no transporte de líquidos em vegetais superiores, como as gimnospermas e as angiospermas (HIGUCHI, 1990).

Apesar de ser um composto macromolecular aromático, a lignina difere dos outros componentes presentes na biomassa do vegetal, na medida em que

sua estrutura tridimensional não possui ligações repetitivas entre os resíduos monoméricos constituintes da macromolécula (D'ALMEIDA, 1988).

Na natureza, a lignina está embebida numa matriz de carboidratos, celulose e hemicelulose. Os monômeros que formam a lignina compreendem unidades guaiacila do álcool precursor *trans*-coniferílico, unidades siringila do álcool *trans*-sinapílico e unidades hidroxifenila do precursor *trans*-*p*-cumárico, (GRENET e BESLE, 1991).

Segundo AKIN (1989), a composição, estrutura e quantidade de lignina variam de acordo com os tecidos, órgãos, origem botânica, idade da planta e fatores ambientais. Nas leguminosas, são geralmente mais condensadas e se encontram em maior quantidade, para um mesmo estádio de maturidade, do que em gramíneas (GRENET e BESLE, 1991).

A mudança na composição da lignina, associada ao desenvolvimento da parede, troca de unidades de guaiacil para siringil, parece ser a mesma em todas as forragens. De acordo com JUNG e DEETZ (1993), todas as espécies de forrageiras, com maior concentração nas gramíneas, contêm ácido fenólico na parede. Éster de *p*-cumárico encontra-se em menor concentração nas leguminosas, sendo maior nas gramíneas C4 do que nas C3. Alguns dos ácidos fenólicos são ligados a arabinoxilanas da parede celular (JUNG e DEETZ, 1993)

A lignina é um componente de grande relevância porque sua concentração nos alimentos, principalmente de ruminantes, exerce negativamente uma grande influência sobre a digestibilidade da dieta. Devido à inibição da digestibilidade de constituintes da parede celular de plantas forrageiras, sua determinação tem sido útil na estimativa da digestão da fibra e, por conseguinte, no estabelecimento do valor nutritivo destas (SANTANA et al., 2006).

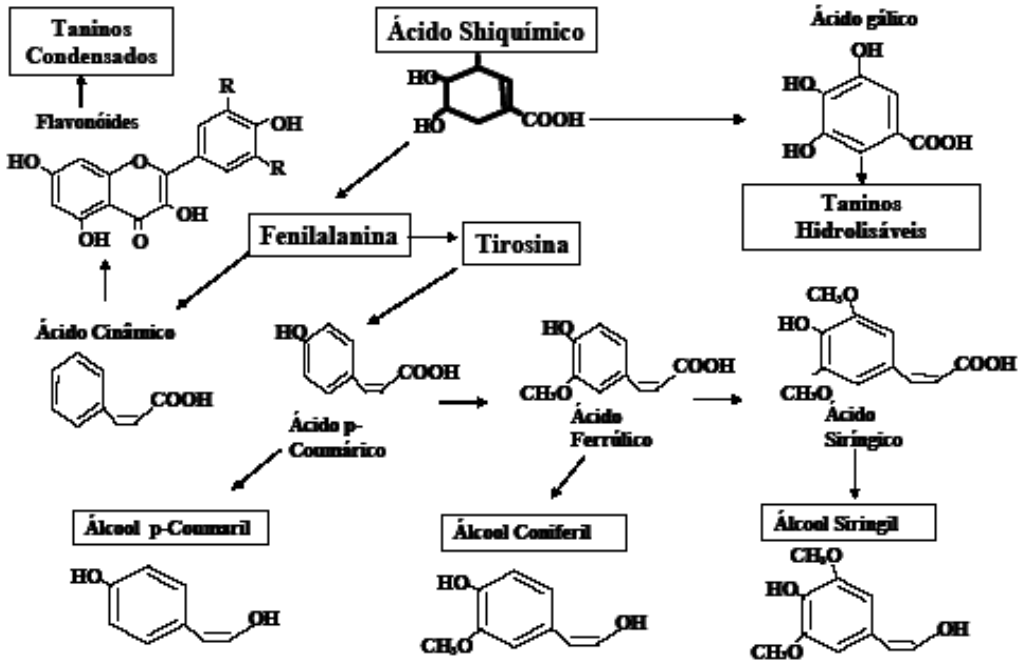

FIGURA 5 - Esquema da formação dos monolignois, precursores da lignina (SANTANA et al., 2006)

2.1.1.5 Proteínas e Glicoproteínas

As paredes celulares contêm uma gama de proteínas, a maioria das quais glicosiladas, que desempenham funções estruturais, de reconhecimento e catalíticas. Ao contrário das presentes no citoplasma, muitas das proteínas estruturais são ricas em hidroxiprolina (Hyp), ocorrendo como parte de uma seqüência de Ser-$(Hyp)_4$ (ESQUERRÉ-TUGAYÉ e LAMPORT, 1979). Os resíduos de Hyp são pontos de ligação de oligossacarídeos, formados de unidades de arabinose (AKIYAMA E KATO, 1977). Nas dicotiledôneas, esses resíduos são em número de três a quatro, fáceis de serem diferenciados da arabinose das substâncias pécticas, por possuírem resíduos de arabinofuranose (Ara*f*) em ligação (1→2) e (1→3) e configuração anomérica β, com exceção do tetra-arabinosídeo α-L-Ara*f*-(1→3)-β-L-Ara*f*-(1→2)-β-L-Ara*f*-(1→2)-β-L-Ara*f*-(1→4)-Hyp (AKIYAMA E KATO, 1977).

As moléculas protéicas, ricas em arabinogalactanas, são grupos de proteínas que contém também Hyp, a maioria das quais ocorre nos espaços

intercelulares; pequena quantidade poderá entrar na composição da parede celular. A localização dessas moléculas na célula é dificultada pela alta solubilidade que apresentam. As arabinogalactanas (tipo II) são polissacarídeos altamente ramificados, com cadeias de unidades de β-D-galactopiranose unidas por ligações (1→3) e (1→6). As ligações (1→3) predominam nas cadeias internas, enquanto que as ligações (1→6) ocorrem principalmente nas cadeias externas, que são geralmente terminadas por unidades L-arabinofuranosil e, em algum grau, por unidades L-arabinopiranosil. Já arabinogalactanas do tipo I têm cadeia linear de unidades piranosídicas de D-galactose, ligação β-(1→4) e 20-40% de unidades furanosídicas de L-arabinose α-(1→5) presentes em cadeias laterais curtas conectadas na posição *O*-3 das unidades de galactose (FINCHER et al., 1983). Vários estudos são desenvolvidos com o objetivo de detalhar a composição, estrutura e desenvolvimento da parede celular das plantas. Atualmente, a estrutura básica dos polissacarídeos e dos componentes químicos a eles associados são conhecidos. Na parede celular, os polissacarídeos não amídicos, juntamente com outros componentes, são organizados numa estrutura tridimensional complexa, não uniforme, unidos na parede por ligações iônicas, pontes de hidrogênio e ligações covalentes (WANG et al., 2002). No entanto, a heterogeneidade dos compostos químicos torna difícil a caracterização definitiva de sua composição, interferindo na hidrólise total da parede celular (JUNG E DEETZ et al., 1993).

2.2 Amido

O amido, classificado em amilose e amilopectina, é o mais importante polissacarídeo de reserva vegetal. Amilose é um polímero linear constituído de até cerca de 6.000 unidades de glicose que se unem por ligações glicosídicas α (1→4). O número de resíduos, também indicado pelo grau de polimerização, varia com a origem. A média do conteúdo de amilose pode variar de quase 0 a 75%, mas o valor típico é de 20 a 25% (MORAES, 2004). A amilopectina é formada de pequenas cadeias lineares de 10 a 60 resíduos de glicose que se unem por ligações glicosídicas com configuração α (1→ 4) e de cadeias laterais de 15 a 45 resíduos unidos por ligações α (1→6). A média do número de ramificações na

amilopectina é de 5%, mas pode variar com a fonte de amido. A molécula completa contém em média cerca de 2.000.000 unidades de glicose, sendo uma das maiores moléculas encontradas na natureza (MORAES, 2004).

2.3 Ambiente ruminal

O sucesso dos ruminantes no processo evolutivo tem sido atribuído à existência de uma relação simbiótica do hospedeiro com os microrganismos ruminais. O animal fornece o alimento e o ambiente (rúmen) para o crescimento dos microrganismos que, de sua parte, suprem o animal com ácidos resultantes da fermentação e proteína microbiana (OLIVEIRA, 2007).

A maior fonte de energia para os ruminantes são os carboidratos contidos nas pastagens, sendo os mais importantes a celulose, hemicelulose e frutose. Nos ruminantes, os alimentos ficam sujeitos a um processo fermentativo nos pré-estômagos antes de alcançarem o abomaso e intestino delgado. A taxa e proporção com que são fermentados no rúmen dependem de uma série de fatores, sendo os mais importantes a composição da dieta e o nível de consumo (OLIVEIRA, 2007).

O rúmen é responsável por 90 a 100% da digestão dos carboidratos solúveis e ácidos orgânicos e por 60 a 90% da digestão da celulose, hemicelulose e frutose, dependendo do grau de lignificação da forragem. Portanto, açúcares e proteínas solúveis são totalmente degradados e de forma rápida. O amido normalmente tem fermentação rápida, mas a taxa e a proporção com que isso ocorre diminuem com a solubilidade. Algumas proteínas estruturais são hidrolisadas lentamente e outras passam intactas para o intestino. Finalmente, celulose e hemicelulose são as frações dos alimentos mais lentamente fermentadas (KOZLOSKI, 2002).

O rúmen é considerado um ecossistema microbiano estável e ao mesmo tempo dinâmico. Seu meio é anaeróbico, com temperatura em torno de 38 a 42°C (média de 39°C), pH normalmente entre 5,5 a 7,0 (média de 6,8), gravidade específica de 1,022 a 1,055, matéria seca entre 10 a 15%, tensão superficial do líquido de 50 dinas/cm, pressão osmótica constante e presença contínua de substrato e de atividade fermentativa, com intensidade variável. É

composto de três tipos de microrganismos ativos: bactérias, protozoários e fungos (LANA, 2005).

Embora um número maior de bactérias tenha sido isolado, cerca de 20 espécies predominam no rúmen, em torno de 10^9 a 10^{11} células/mL. Os protozoários estão em torno de 10^6 células/mL e são, em sua maioria, ciliados. A biomassa dos protozoários corresponde a cerca de 10%, podendo alcançar até 50% da biomassa microbiana total. As espécies de fungos, estritamente anaeróbicos, têm população próxima a 10^4 zoósporos/mL, formando 8% da biomassa microbiana total e os bacteriófagos de 10^8 a 10^9 /mL.

Os ruminantes não possuem enzimas próprias que degradam as fibras, que por sua vez, são fermentadas por hidrolases de várias espécies de bactérias ruminais. Além disso, os microrganismos do rúmen podem utilizar nitrogênio não protéico para síntese de suas proteínas, que serão posteriormente digeridas e metabolizadas pelo animal (KOZLOSSKI, 2002).

O alimento ingerido pelo animal proporciona aporte constante de substratos, que ficam retidos por tempo necessário para sua degradação pelos microrganismos do rúmen. Muito dos produtos finais da fermentação são absorvidos diretamente na parede do rúmen com a fase líquida e as partículas de tamanho maior permanecem por mais tempo para que sofram degradação (OLIVEIRA, 2007).

As condições anaeróbicas do rúmen são mantidas por gás carbônico, metano, outros gases e traços de hidrogênio, produzidos durante o processo fermentativo. O oxigênio que entra no rúmen é consumido por microrganismos facultativos que mantém a condição anaeróbia. Somente microrganismos capazes de tolerar um baixo potencial redox (-350 mV) são capazes de sobreviver no compartimento ruminal (KAMRA, 2005).

A alta capacidade tamponante e a pressão osmótica também limitam o crescimento da microbiota invasora. Alguns microrganismos produzem compostos que limitam o crescimento de bactérias, fungos e protozoários do próprio ecossistema (KAMRA, 2005).

2.4 Forrageiras e resíduo agroindustrial

2.4.1 *Brachiaria brizantha* cv Marandu

Os capins do gênero *Brachiaria* desempenham papel importante na produção de carne e leite, por tornarem possível o desenvolvimento da pecuária em solos ácidos e fracos, predominantes nos cerrado, e por criarem novos pólos de desenvolvimento, graças a uma pujante indústria de sementes, colocando o Brasil como grande exportador desse insumo para o mundo tropical (VALLE et al., 2000).

Dentre as espécies mais cultivadas e mais utilizadas, o capim Marandu, como alternativa de forrageira para cerrados de média e boa fertilidade, tem apresentado alta capacidade de adaptação, sendo responsável por grande parte da alimentação do rebanho bovino a pasto (VALLE et al., 2000). É uma fonte de alimento de boa qualidade desde que se obedeça à exigência nutricional da planta, com adubação e manejo adequado; caso contrário, perde o valor nutritivo rapidamente, principalmente após o florescimento.

COSTA et al. (2005) trabalhando com capim *Brachiaria brizantha* cv. Marandu, em pastejo rotacionado, obtiveram valores de 9,8; 7,0 e até 11,98% de proteína bruta (PB), em junho, julho e período das águas, respectivamente. Para a fibra em detergente neutro (FDN), verificaram que o teor foi superior na época das águas em relação a da seca, sendo que para as duas épocas os resultados foram maiores a 60%. De acordo com AGUIAR (1999), os teores de FDN de forrageiras tropicais são altos, geralmente acima de 65% em rebrotas e de 75% a 80% em estágios mais avançados de maturação.

Segundo COSTA et al. (2005), a composição de matéria seca (MS) foi menor nos meses de maior precipitação (23-30%). MALAFAIA et al (1997), encontraram teor de 30,20% de MS na *Brachiaria brizantha* cv Marandu.

MELO (2006), obteve, em média, 1,0 e 5,0% de PB e 81,0 e 73,0% de FDN, durante a estação seca e chuvosa, respectivamente.

2.4.2 Forragem de Milho

O milho é uma planta muito utilizada na alimentação animal em decorrência do seu alto valor energético, sua boa composição em fibras, do

potencial de produção de MS, aliado à produção de grãos que enriquece a forragem produzida. Contudo, a sua qualidade pode variar em função do nível de tecnologia e do sistema de manejo utilizado no processo produtivo, influenciando diretamente os ganhos de produção animal (SILVA et al., 2005). Em trabalho desenvolvido pelos autores, a planta de milho apresentou teor de 30,33; 7,68 e 60,72% de MS, PB e FDN, respectivamente.

2.4.3 Casquinha de Soja

O uso de subprodutos energéticos ricos em fibra de alta digestibilidade (95%), como a casquinha de soja, é estudado como alternativa ao uso de grãos ricos em amido. A casca de soja é o tegumento retirado durante o descascamento inicial dos grãos, antes da extração do óleo, com composição bastante variável e dependente do processamento usado na obtenção do farelo de soja (PAROLIZ et al., 2004).

A casquinha tem característica fibrosa dos volumosos ao mesmo tempo em que disponibiliza energia como os alimentos concentrados. Possui uma película fina, rica em pectina, que pode se desprender da casca durante o processo de secagem dos grãos, alterando o teor de nutrientes do resíduo (PAROLIZ et al., 2004). Os autores verificaram valores de 92,5; 13,8 e 64,3% de MS, PB e FDN, respectivamente.

2.4.4 Feno de Tifton 85

O cultivar Tifton 85 foi desenvolvido entre a introdução Sul-Africana, registro P1 290884 (*Cynodon dactylon*) e Tifton 68 (*Cynodon nlenfüensis*). É um híbrido perene, de porte mais alto, com colmos mais compridos, folhas mais largas e cor verde-escuro, rizomas grandes em menor número e estolões que se expandem rapidamente (BURTON et al., 1993), sendo selecionado pela alta produtividade e digestibilidade em relação à maioria das bermudas híbridas (PEDREIRA, 1996). Multiplica-se por meio de mudas enraizadas ou estolões, com exigência média a alta de fertilidade; desenvolve-se bem em regiões tropicais e subtropicais. É recomendado para fenação e pastejo em decorrência da boa

relação folha/colmo, com boa aceitabilidade por bovinos, eqüinos, ovinos e caprinos (EVANGELISTA, 2005).

GONÇALVES et al. (2003), avaliando a composição bromatológica do feno de Tifton-85, em função da idade do corte, obtiveram valores de 92,40; 93,30; 92,80 e 93,60% de MS; 9,50; 8,0; 7,80 e 7,30% de PB e 77,20; 78,80; 78,50 e 79,40% de FDN, em 28, 42, 63 e 84 dias, respectivamente.

2.5 Modelo conceitual de hidrólise da parede celular de forragens

As interações entre os microrganismos do rúmen e os aspectos físicos e bioquímicos dos sistemas de enzimas são importantes para que ocorra a hidrólise efetiva da parede celular das plantas. Existem vários modelos, todos complexos, de degradação da fração fibrosa da parede, com diferenças e semelhanças entre si. A seqüência exata dos eventos, os fatores limitantes e os mecanismos moleculares envolvidos nesse processo não são bem definidos (WHITE et al., 1993).

A alta complexidade da parede celular, com interações de lignina, polissacarídeos não celulolíticos e fibrilas de celulose, formando uma estrutura ordenada, resulta em um modelo de igual complexidade para sua degradação (ENARI & NIKU-PAAVOLA, 1987). De acordo com FORSBERG et al. (2000), durante a degradação da celulose, um substrato insolúvel complexo, várias enzimas deverão agir de forma associada para que ocorra uma hidrólise eficiente. A primeira etapa consiste na ligação dos microrganismos e interação das enzimas ao substrato insolúvel.

A adesão dos microrganismos e de enzimas que degradam os polissacarídeos não somente coloca os sistemas enzimáticos em íntima aproximação com o substrato como pode proporcionar a ruptura de pontes de hidrogênio entre a celulose e os polissacarídeos não celulolíticos, tão bem como na própria fibrila de celulose (WHITE et al., 1993).

ENARI & NIKU-PAAVOLA (1987) relataram que a seqüência de degradação dos polissacarídeos é resultado da topologia celular da planta e da digestibilidade relativa. Alguns fatores importantes a serem considerados são: quantidade e composição química de substâncias associadas, como lignina e polissacarídeos não celulolíticos, superfície de área, grau de polimerização e de substituições da cadeia lateral e estádio de hidratação.

Segundo COUGHLAN (1991), a orientação espacial da celulose e da xilana na parede primária e secundária e as ligações covalentes entre lignina e polissacarídeos não celulolíticos são os maiores obstáculos a hidrólise das forragens. De acordo com os autores, a degradação, pelos sistemas de enzimas, da hemicelulose, pectina, parte da celulose e lignina ocorre provavelmente ao

mesmo tempo, à medida que as ligações são encontradas na parede celular. Os polissacarídeos podem se unir a lignina por ligações glicosídicas, ligações éter, ligações cruzadas de éster ou por pontes de ácido cinâmico.

As ligações entre lignina e polissacarídeos não celulolíticos podem ser hidrolisadas por atividades de ácido ferúlico esterase e ácido ρ-cumárico esterase produzidas por bactérias ruminal e fungos anaeróbicos. Ação de α-L-arabinofuranosidase pode liberar polissacarídeos da lignina periférica. A atividade lignolítica reduz a intensidade de substituições das cadeias laterais e aumenta a superfície de área efetiva, favorecendo a degradação da parede no rúmen (BORNEMAN et al., 1989).

Quanto à xilana, a substituição extensiva da cadeia principal por ésteres de acetil e vários açúcares como arabinose, fucose, ácido glucurônico, manose e ramnose é um fator limitante a sua hidrólise. A cadeia de xilana pode também se associar à celulose, β-1,3 e β-1,3-β-1,4-glucanas por pontes de hidrogênio, formando uma estrutura muito complexa. A substituição da cadeia secundária pode ser também obstáculo à hidrólise e ação das enzimas (WHITE et al., 1993).

Segundo BIELY (1985), o tipo e não o tamanho do substituinte é o principal obstáculo a degradação, que poderá impedir o movimento molecular dos elétrons tão necessário a ação hidrolítica das enzimas. De qualquer modo, a remoção das cadeias laterais eleva a taxa de hidrólise dos polissacarídeos não celulolíticos. Os mecanismos, a seqüência e os aspectos limitantes da ruptura da xilana ainda não são totalmente compreendidos.

Sabe-se que o polímero pode formar pontes de hidrogênio com as cadeias de celulose e que a hidrólise da cadeia linear da xilana amplia a área de superfície efetiva das fibrilas de celulose, aumentando sua digestibilidade. A ruptura das ligações β-1,3 e β-1,3-β-1,4-glucanas eleva a degradação da celulose (WHITE et al., 1993).

Existem vários modelos de hidrólise da celulose que se fundamentam basicamente nos sistemas enzimáticos encontrados em fungos aeróbicos. Essencialmente, os modelos se apóiam em dados cinéticos ou aos relacionados às especificidades enzimáticas. Embora diferenças existam, eles servem para facilitar o entendimento do processo hidrolítico da celulose (BIELY, 1985).

Segundo LYND et al. (2002), a natureza insolúvel e recalcitrante da celulose representa um desafio aos sistemas de celulases. Um aspecto geral de várias celulases é a estrutura modular que inclui freqüentemente domínios catalíticos e módulos de ligação a carboidratos (CBM). O CBM se liga a superfície do carboidrato para facilitar a sua hidrólise, colocando o domínio catalítico em íntima associação com o substrato. De acordo com STAHLBERG et al. (1991), a presença de CBMs é particularmente importante para dar início e continuidade a atividade de exoglucanases.

Revisando o modelo original de degradação da celulose sugerido por REESE et al. (1950), uma função adicional não catalítica do CBM foi proposta: o desprendimento de fragmentos das superfícies de celulose, aumentando a hidrólise do carboidrato.

O sistema de enzimas celulolíticas é o somatório de atividades de enzimas individuais, fenômeno conhecido como sinergismo. São relatadas quatro formas de ação sinérgica: endo-exo, que ocorre entre endo e exoglucanases; exo-exo, atividades de exoglucanases que atuam na porção redutora e não redutora da cadeia de celulose; exoglucanases e β-glucosidases que removem celobiose e celodextrinas e sinergismo intramolecular entre domínios catalíticos e CBMs (TEERI, 1997).

LYND et al. (2002) relataram que os sistemas de celulases são conjunto de enzimas, representado por endoglucanases, exoglucanases e β-glucosidase, com ou sem CBMs, que hidrolisam de maneira coordenada e eficiente a celulose.

Os fungos filamentosos celulolíticos são hábeis em penetrar substratos celulósicos por meio de extensões das hifas, colocando freqüentemente seus sistemas de celulases em regiões restritas da celulose. As celulases livres, com ou sem CBMs, podem clivar a celulose sob essas condições. Nesses sistemas, as enzimas não formam um complexo estável de alto peso molecular e são designadas de sistemas não complexados (LYND et al., 2002).

Em oposição, as bactérias anaeróbicas não penetram de forma efetiva o polímero e por isso, na presença de microrganismos competitivos e com baixa disponibilidade de ATP para síntese de celulases, desenvolveram mecanismos alternativos de degradação e de acesso aos produtos da hidrólise, conhecidos

como celulossoma. São sistemas complexos que posicionam as células produtoras de celulases no sítio de hidrólise, observado em clostrídio e bactéria ruminal (LYND et al., 2002).

De acordo com WHITE et al. (1993), as diferenças entre os modelos se baseiam na ordem de ação das enzimas e no seu requerimento cinético. MARSDEN & GRAY (1986) descreveram um tipo alternativo, o mecanismo paralelo, que exibe maneiras diferentes de hidrólise da celulose amorfa e cristalina. Esse mecanismo é mais aplicável na degradação da parede celular das forragens pelos microrganismos do rúmen.

Ainda que existam controvérsias, parece que a região amorfa e a cristalina, área altamente organizada da celulose, são hidrolisadas simultaneamente. Supõe-se que a primeira etapa é o ataque das regiões amorfas pela endo-β-1,4-glucanase que produz extremidades livres para ação da exo-β-1,4-glucanase, liberando celobiose. Esta é hidrolisada pela β-glicosidase em glicose (MARSDEN & GRAY 1986).

Conforme mencionado por KNOWLES et al. (1987), a adsorção da enzima à celulose é mediada pelo CBM. Pouco se sabe sobre as interações moleculares dos CBMs, porém a massa molecular e a força de interação do domínio com o substrato devem ser maiores com o rompimento das pontes de hidrogênio entre as cadeias de celulose adjacentes. Isso pode formar regiões amorfas permanentes ou transitórias, próximas ao sítio de hidrólise das ligações β-1-4. Assim, os domínios de ligação desempenham importante papel na hidrólise da celulose por mediar à aderência e porque deixam o substrato mais acessível a futuros ataques (WHITE et al., 1993).

2.6 Microrganismos Termofílicos

Uma das mais surpreendentes propriedades dos microrganismos, em contraste com outros organismos vivos, é a capacidade que eles têm de se adaptar a ambientes extremos, em que outras formas de vida não seriam viáveis, como os ambientes geotérmicos, onde fatores como pH, temperatura, pressão e concentração de sal ultrapassam os valores padrões para a maioria dos seres vivos (GOMES et al., 2007).

Dentre os fatores, a temperatura é o que mais interfere na função das biomoléculas e na manutenção das estruturas biológicas. De fato, a maioria dos organismos cresce somente dentro de uma faixa estreita de temperatura. Entretanto, a existência de ambientes geotermicamente estáveis permite a seleção ou a persistência de microrganismos que resistem e necessitam de altas temperaturas para sobreviver. A adaptação de um determinado microrganismo à termofilia envolve a adaptação da membrana citoplasmática, das proteínas e do DNA às temperaturas acima da faixa mesofílica. São denominados de termófilos ou termofílicos (MAHESHWARI et al., 2000).

Os termofílicos moderados são aqueles que crescem entre 20 e 55°C, com temperatura ótima na faixa de 40 a 50°C. Fazem parte desse grupo os procariotos dos domínios Bactéria e Archaea e eucariotas do domínio Eukarya-fungos filamentosos. Os termófilos extremos, representados por procariotos dos domínios Bactéria e Archaea, crescem em temperaturas ótimas de no mínimo 65 e máximo 85°C. No grupo dos hipertermófilos incluem os procariotos do domínio Archaea, exibindo temperaturas ótimas de crescimento entre 85 e 110°C. Poucas são as espécies de eucariotos que crescem entre 45 e 55°C. Dentre as 50.000 espécies de fungos descritas, aproximadamente 30 se desenvolvem na faixa de 40° a 45°C, embora existam aquelas que se multiplicam entre 60 e 62°C (MAHESHWARI et al., 2000).

Na natureza, em ambiente mesofílico, organismos termofílicos moderados se desenvolvem em processo de compostagem em alta temperatura, sucedendo a microflora mesofílica. No processo, se distinguem três fases: na primeira, a microbiota mesofílica cresce rapidamente, absorvendo, preferencialmente, as fontes de carbono prontamente assimiláveis e solúveis como os açúcares, aminoácidos e ácidos orgânicos ou polímeros de acesso mais fácil, gerando calor por reações metabólicas exotérmicas com elevação da temperatura por volta de 40°C. O aumento da temperatura inibe o crescimento de mesófilos, iniciando a segunda fase do processo (GOMES et al., 2007).

A elevação da temperatura estimula a germinação dos esporos dos fungos e endósporos das bactérias termófilas. Nessa etapa, as fontes de carbono assimiláveis já estão esgotadas, restando aos microrganismos os componentes estruturais da biomassa como celulose, hemicelulose e pectina, cuja hidrólise

requer intensa liberação de enzimas extracelulares. O resultado é a degradação do material vegetal em polímeros menores e o aumento da temperatura em torno de 60°C (GOMES et al., 2007).

A terceira fase caracteriza-se pela inibição do crescimento dos fungos e redução da atividade bioquímica no material, ainda que existam atividades das bactérias extremófilas e hipertermófilas (MAHESHWARI et al., 2000).

Assim, espera-se que fungos e bactérias termófilos moderados sejam produtores potenciais de enzimas despolimerizantes. No entanto, alguns fungos termofílicos como *Thermomyces lanuginosus, Talaromyces duponte* não utilizam celulose como fonte de carbono, o que não significa que não possuam enzimas que hidrolisem outros polímeros. Alguns fungos, como *Humicola insolens*, não degradam celulose, mas utilizam e crescem rapidamente em meios contendo xilana como fonte de carbono. Do mesmo modo, fungos pectinolíticos termófilos nem sempre são bons produtores de enzimas hemicelulolíticas. Por outro lado, organismos que não despolimerizam a matéria orgânica podem crescer comensalmente, utilizando açúcares liberados por outros organismos (GOMES et al., 2007).

2.7 O Fungo *Humicola grisea var. thermoidea*

O fungo *H. grisea* var. *thermoidea* apresenta a seguinte classificação taxonômica: Fungi, Eumycota, Deuteromiceta, Hypomicetidae, Moniliales, Dermatiaceae, *Humicola, Humicola grisea* var. *thermoidea (*ARAÚJO et al*.*, 1983*)*.

A colônia apresenta cor acinzentada (anverso), daí o nome *grisea*, fundo branco (reverso), em meio de esporulação (Meio Agar Aveia completo – MAAC), aspecto filamentoso e plano; na microscopia exibe conidióforos simples ou pouco ramificados, com aleuriósporos com esporos arredondados (conídios unicelulares globosos).

Os fungos da espécie são organismos heterotróficos e saprofíticos, que decompõem a celulose, hemicelulose amido, gomas vegetais e parafinas presentes em substratos naturais como a lignocelulose, componente maior da biomassa vegetal. Crescem a expensas dos produtos de degradação (açúcares e radicais), incorporando as moléculas nutricionais e adquirindo massa protéica

(micélio). São aeróbicos, dependentes de componentes orgânicos e inorgânicos (substâncias nitrogenadas, sais minerais – fosfatos e sulfatos de potássio, magnésio, ferro, zinco, manganês, principalmente), com requerimento de tiamina e ácido pantotênico (ARAÚJO et al., 1983).

O fungo é um microrganismo extremófilo, termofílico (*thermoidea*) e cresce entre 20 e 50°C (ideal 40-42 °C) e pH entre 5,0 e 7,0.

Com base em trabalhos realizados no Brasil com linhagens obtidas a partir desse isolado, o microrganismo *H. grisea* tem capacidade de produzir várias enzimas termoestáveis - celulases, β-glicosidases, xilanases, amilases, trealases, β-xilosidase – com aplicações em processos biotecnológicos (ALMEIDA et al., 1995; CARVALHO et al., 2003; DE PAULA et al., 1999; PERALTA et al., 1997).

2.8 Enzimas fibrolíticas

As forragens são as maiores e geralmente as mais baratas fontes de energia para os ruminantes, sendo celulose e hemicelulose seus principais componentes químicos, que são hidrolisados no rúmen pela ação de enzimas de bactérias, fungos e protozoários (SCHINGOETHE et al., 1999). No entanto, a degradação dos substratos fibrosos é lenta e incompleta, o que diminui a disponibilidade de energia e proteínas para os ruminantes, prejudicando o desempenho animal, com conseqüências no custo de produção (COLOMBATTO et al., 2003a; YANG et al., 2000)

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

O uso de enzimas exógenas é uma tecnologia em desenvolvimento (NSEREKO et al., 2000). Iniciou-se no final da década de 60 e durante os últimos tempos vem avançando graças ao seu amplo campo de aplicação, maior estabilidade de celulase e hemicelulase à ação das proteases do rúmen (KUNG,

2002), alto custo de produção nos confinamentos e disponibilidade de melhores produtos no mercado (BEAUCHEMIN et al., 1995; 2003).

Enzimas são moléculas protéicas, produzidas pelas células, que catalisam reações químicas específicas nos sistemas biológicos (KUNG, 1997; McALLISTER et al., 2001). São essenciais aos ruminantes porque estão envolvidas na hidrólise dos alimentos complexos em suas moléculas orgânicas mais simples como glicose, celobiose, xilose, aminoácidos, ácidos graxos, que são então usadas pelos microrganismos do rúmen e/ou pelo animal (KUNG, 2002; McALLISTER et al., 2001).

Segundo BEAUCHEMIN et al. (1998), os aditivos enzimáticos são produzidos principalmente por quatro espécies de bactérias (*Bacillus subtilis, Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus plantarum e Streptococcus faecium*), duas espécies de leveduras (*Aspergillus oryzae e Saccharomyces cerevisiae*) e pelo fungo *Trichoderma reesei* (MUIRHEAD, 1996). *Humicola insolens* e *Thermomyces anuginosus* são utilizados como fontes de enzimas fibrolíticas, mas em menor proporção (BEAUCHEMIN et al., 1998).

As enzimas são produzidas por fermentação a partir de uma cultura específica de microrganismos em meio de crescimento (COWAN, 1994). Uma vez que o processo se completa, são separadas dos resíduos de fermentação e dos organismos que lhes deram origem. Ainda que a fonte de organismo entre os produtos enzimáticos seja geralmente semelhante, o tipo e a atividade de enzimas produzidas podem variar amplamente, a depender da linhagem selecionada, do substrato de crescimento e do meio de cultura usado (CONSIDINE & COUGHLAN, 1989; GASHE, 1992; LEE et al., 1998). Os produtos enzimáticos em comparação aos extratos de fermentação são relativamente concentrados e purificados, contendo atividades de enzimas controladas e específicas (PENDLETON, 2000).

Segundo McALLISTER et al. (2001), os aditivos enzimáticos são classificados normalmente com base nos compostos sobre os quais agem. No caso dos ruminantes, são designados de celulase e xilanase, enzimas que degradam celulose e xilana, respectivamente. É importante ressaltar que os produtos de enzimas fibrolíticas, geralmente, são combinações de atividades enzimáticas. Atividades secundárias de amilases, proteases e/ou pectinases

podem se associar as de celulases e hemicelulases, consideradas primárias ou essenciais às dietas de bovinos (McALLISTER et al., 2001). Ainda que no rúmen a quantidade de enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas seja alta, atividades de enzimas fibrolíticas exógenas podem expor sítios da parede celular à aderência bacteriana, o que permitiria digestão mais completa da dieta (BEAUCHEMIN et al., 2000a).

Entre os complexos celulolíticos de bactérias e fungos, o mais estudado é do *Trichoderma reesei,* formado por três enzimas hidrolíticas que trabalham em conjunto na hidrólise da celulose: endo-β-1,4-glucanases (EG I, EG II, EG III e EG V; EC 3.2.1.4), que hidrolisam ao acaso as ligações glicosídicas na fibra de celulose: as exo-β-1,4-glucanases ou celobiohidrolases (CBH I e CBH II; EC 3.2.1.91), que atuam nas extremidades redutoras de polímeros produzidos pelas endoglucanases, liberando celobiose; as β-1,4-glicosidases (BG I e BG II. EC 3.2.1.21) que clivam oligossacarídeos e celobiose a glicose (DILLON, 2004).

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

A degradação completa da hemicelulose requer enzimas que hidrolisem cadeias principais, como as exo e endo-hidrolases, e laterais. As exo-hidrolases atuam nas ligações glicosídicas terminais e liberam unidades de monossacarídeos das extremidades não redutoras. Endo-hidrolases clivam ligações localizadas no interior da molécula de modo aleatório ou específico. Segundo FILHO (1994), várias enzimas atuam na degradação da cadeia principal, tais como: β-D-xilanase (1,4-β-D-xilana xilanohidrolase, EC 3.2.1.8), β-D-xilosidase (1,4-β-D-xilana xilohidrolase, EC 3.2.1.37), β-D-manosidase (1,4-β-D-manopiranosídeo hidrolase, EC 3.2.1.25), α-L-arabinase (1,5- α-L-arabinase, EC 3.2.1.99) e β-D-galactanase (1,4-β-D-galactana galactanohidrolase, EC 3.2.1). De acordo com o mesmo autor, as cadeias laterais são hidrolisadas pelas seguintes enzimas: acetil xilana esterase (EC 3.1.1.6), α-D-galactosidase (α-D-galactosídeo galactohidrolase, (EC 3.2.1.22), α-L-arabinofuranosidase (α-L-arabinofuranosídeo arabinohidrolase, EC 3.2.1.55) e α-D-glucoronidase (EC 3.2.1.131).

Por se tratar de um heteropolissacarídeo, a conversão enzimática da xilana em seus componentes monoméricos requer a participação sinérgica de várias enzimas, que agem na cadeia principal e nas ramificações. As endo-β-D-xilanases, que hidrolisam aleatoriamente a cadeia principal em xilooligossacarídeos de vários tamanhos, são subdivididas em quatro tipos: endoxilanases que agem nos resíduos L-arabinofuranosídeos, tendo xilobiose e xilose como produtos finais. Tais enzimas podem ainda clivar xilooligossacarídeos; endoxilanases do tipo que não atua nas ramificações α-(1→2) e α-(1→3), produzindo moléculas de xilooligossacarídeos maiores do que xilobiose; endoxilanases que hidrolisam a cadeia principal nos pontos de ramificações com formação principalmente de xilobiose, xilose e arabinose; endoxilanases que atuam nos pontos de ramificações, gerando arabinose e xilooligossacarídeos de tamanhos intermediários. As atividades das endo-xilanases são importantes para atuação de outras enzimas xilanolíticas, pois a grande quantidade de substituintes dificulta a formação do complexo enzima-substrato. As xilanases hidrolisam partes internas da cadeia principal, liberando substrato para β-xilosidases que atuam sobre oligossacarídeos e nas extremidades não redutoras da xilana (ação exo). Esterases hidrolisam as ligações éster entre resíduos de xilose e grupamentos acetil ou entre cadeias laterais de arabinosil e ácidos fenólicos, como o ácido ferúlico e o ácido coumárico.

As pectinases formam um grupo de enzimas que degradam substâncias pécticas, hidrolisando ligações glicosídicas ao longo da cadeia carbônica. Podem ser despolimerizantes ou desesterificantes e são produzidas por plantas, fungos filamentosos, bactérias e leveduras (UENOJO & PASTORE, 2007). Segundo ALKORTA et al. (1998), a classificação das enzimas pécticas está baseada no ataque ao esqueleto galacturônico, pela preferência do substrato (pectina, ácido péctico ou protopectina), ação por transeliminação ou hidrólise e por clivagem randômica (enzima endo-liqüidificante ou despolimerizante) ou terminal (enzima exo ou sacarificante).

Existem basicamente três tipos de pectinases: esterase (desesterificante ou desmetoxilante) remove os grupos metil éster; as despolimerizantes (enzimas hidrolíticas e liases) catalisam a clivagem das

ligações glicosídicas das substâncias pécticas e as protopectinases que solubilizam protopectina para formar pectina (JAYANI et al., 2005). Tais enzimas foram classificadas e nomeadas de acordo com a "Enzyme Comission" (EC), segundo as recomendações da IUPAC-IUB (GUMMADI & PANDA, 2003).

Amilases constituem o grupo de enzimas que possuem ação sobre o amido liberando diversos produtos, incluindo dextrinas e progressivamente pequenos polímeros compostos de unidades de glicose (GUPTA, et al., 2003). Existem basicamente quatro tipos de enzimas conversoras de amido: endoamilases, exoamilases, enzimas desramificadoras e transferases. As endoamilases, como as α-amilases (E.C.3.2.1.1), são capazes de quebrar ligações glicosídicas presentes na parte interna (endo) das cadeias de amilose ou amilopectina, formando oligossacarídeos ramificados de tamanhos variados com configurações α e α-dextrinas limites (MORAES 2004).

As exoamilases hidrolisam exclusivamente ligações glicosídicas α-1 e 4 (β-amilase, EC 3.2.1.2) ou ambas as ligações α-1,4 e α-1, 6, como as amiloglicosidase (EC 3.2.1.3) e α-glicosidase (EC 3.2.1.20). Outros exemplos de exoamilases são a ciclodextrina glicosiltransferase (EC 2.4.1.19) e α-amilase maltogênica (glicano 1,4-α-glicanohidrolase, EC 3.2.1.133)

O terceiro grupo de enzimas conversoras de amido são as amilases desramificadoras que hidrolisam exclusivamente ligações α-1,6, incluindo as isoamilases (EC 3.2.1.68), que clivam amilopectina em polissacarídeos lineares de cadeia longa e as pululanases tipo I (EC 3.2.1.41) com habilidade de hidrolisar ligações α-1,6 em pululana e amilopectina. Pululanases do tipo II (α-amilase-pululanase ou amilopululanase) atuam sobre ligações α-1,4 e α-1,6, produzindo maltose e maltotriose (MORAES 2004).

Enzimas transferases constituem o quarto grupo de enzimas conversoras ou modificadoras de amido. Quebram ligações glicosídicas α-1, 4 da molécula doadora e transferem para um aceptor glicosídico com a formação de uma nova ligação glicosídica. Enzimas como amilomaltase (EC 2.4.1. 25) e ciclodextrina glicosiltransferase (EC 2.4.1.19) formam uma nova ligação α-1, 4 e ao mesmo tempo liga a extremidade redutora à não redutora. Amilomaltases são similares as ciclodextrinas glicosiltransferases em relação ao tipo de reação enzimática. A maior diferença é que a ação da amilomaltases origina produto

linear enquanto que ciclodextrinas glicosiltransferases formam produto cíclico (MORAES 2004).

2.8.1 Caracterização e modo de ação das enzimas

Segundo COLOMBATTO et al. (2003c), a completa caracterização das atividades enzimáticas deve ser o primeiro passo na seleção de um produto enzimático. As propriedades bioquímicas das enzimas geralmente são mal avaliadas ou não são determinadas, o que pode afetar a natureza das respostas. A análise deve ser conduzida sob condições definidas de tempo, pH, temperatura, concentração e tipo de enzimas e de substratos, pois esses fatores, em conjunto ou isoladamente, afetam a atividade enzimática (KUNG, 2002; BEUCHEMIN et al., 2003). Adicionalmente, a fonte (bactérias ou fungos) e o tipo de enzimas variam consideravelmente entre os produtos comerciais. A homogeneidade dos produtos deverá também ser analisada, pois o aditivo comercial é um conjunto de várias enzimas que deverão trabalhar em combinação para hidrolisar o alimento. É necessário, portanto determinar a proporção correta de cada atividade enzimática em relação ao substrato para otimizar o seu efeito no alimento (KUNG, 2002).

Tradicionalmente, as atividades enzimáticas são determinadas com base na produção de açúcar redutor liberado da hidrólise enzimática sobre o substrato, tal como celulose ou xilana pura; pelo desaparecimento de um substrato específico ou pela formação de um produto (aminoácidos ou peptídeos) da reação bioquímica catalisada pela enzima (McALLISTER et al., 2001; BEUACHEMIN et al., 2003; KUNG, 2002), sob condições ótimas e padronizadas (BEAUCHEMIN & RODE 1997). No entanto, altas atividades de enzimas não necessariamente aumentam a taxa de digestão de um substrato complexo.

Segundo COUGHLAN (1985), as atividades enzimáticas geralmente são avaliadas em temperatura de 60°C e pH 4,0-5,0, condições ótimas de atuação da maioria das enzimas comerciais. Porém, não representam as condições do rúmen com pH na faixa de 6,0 a 6,7 e temperatura próxima de 39°C (VAN SOEST, 1994). Assim, as atividades cotadas para os produtos comerciais são maiores do que aquelas medidas sob condições fisiológicas (BHAT &

HAZLEWWOOD, 2001; BEAUCHEMIN et al*.,* 2003). No passado, pouca atenção era dada a esses fatores e, evidentemente, a observação da temperatura e pH é inquestionável, pois a eficiência de um produto pode variar amplamente em condições diferentes daquelas consideradas ótimas para sua atuação (COLOMBATTO et al., 2003b).

As pesquisas têm demonstrado que a adição de misturas enzimáticas pode melhorar a digestão de nutrientes e o desempenho animal. Contudo, o modo de ação das enzimas, como hidrolisam os carboidratos estruturais não estão completamente identificados e evidências sugerem que o mecanismo de ação não é simples e pode ser o efeito de vários fatores (BEAUCHEMIN et al., 1998; McALLISTER et al., 2001).

As enzimas exógenas de maneira geral melhoram a utilização do alimento antes do seu consumo e/ou aumentam a sua digestão no rúmen e/ou no trato digestivo pós-ruminal. Na realidade, esses mecanismos estão interligados e as alterações mediadas pelas enzimas antes da ingestão provavelmente têm conseqüências no trato digestivo (McALLISTER et al., 2001).

As enzimas, quando adicionadas às dietas, promovem a liberação de carboidratos solúveis e removem barreiras estruturais que limitam a digestão dos alimentos pelos microrganismos ruminais (BEUACHEMIN et al., 2000). A suplementação no alimento confere maior estabilidade às enzimas graças à formação do complexo enzima-substrato (MORGAVI et al., 2000). Assim, aumenta-se a resistência das enzimas à proteólise e o seu tempo de permanência no ambiente ruminal. Uma vantagem adicional é que essa forma de aplicação proporciona a liberação lenta das enzimas no rúmen (BEAUCHEMIN et al., 1999). Quanto maior for a proporção da dieta tratada com enzimas, maior será a chance das proteínas permanecerem ativas no compartimento ruminal. Na falta do complexo enzima-substrato estável, as enzimas se solubilizam no líquido ruminal e fluem rapidamente para o intestino (BEAUCHEMIN et al., 2003).

No rúmen, as enzimas exógenas podem agir diretamente nos alimentos ou estimular indiretamente a digestão, por potencializar as atividades das enzimas microbianas (McALLISTER et al., 2001). MORGAVI et al. (2000) verificaram sinergismo entre enzimas exógenas e microbianas pelo aumento do potencial hidrolítico no meio ruminal.

BEAUCHEMIN et al. (2003) reconheceram que a colonização e penetração limitadas dos microrganismos celulolíticos e suas enzimas à superfície exposta das partículas alimentares são os principais fatores que impedem a digestão efetiva. Aumentos da taxa de degradação da fibra no rúmen estão relacionados à melhora na colonização dos alimentos em função do tratamento enzimático (COLOMBATTO et al., 2003a). Os aditivos enzimáticos aumentam a disponibilidade de carboidratos fermentáveis que contribuem para o adicional crescimento e multiplicação dos microrganismos. Maior número de bactérias significa digestão mais extensiva da dieta total (LEWIS et al., 1996; BEAUCHEMIN et al., 2000).

Algumas enzimas são estáveis o suficiente para deixarem o rúmen e permanecerem ativas no abomaso e intestino, auxiliando a digestão dos materiais que escapam à fermentação ruminal (HRISTOV et al., 1998).

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

2.8.2 Respostas obtidas com adição de enzimas

MORGAVI et al. (2000) estudaram o efeito da interação entre diferentes proporções de xilanases e celulases e enzimas endógenas ruminal sobre a degradação da fibra. Os autores observaram aumentos de degradação em torno de 35, 100 e 40% para celulose, xilana e silagem de milho, respectivamente. Outro estudo avaliou um produto comercial contendo xilanases, endocelulases e β-glucanases sobre a ingestão, digestibilidade no trato digestivo total e produção de leite em vacas lactantes. A baixa e a alta concentração de enzimas aumentaram a ingestão alimentar, mas somente o baixo nível elevou a digestibilidade no trato digestivo total (BEUACHEMIN et al., 2000).

BROWAN et al. (2002) trabalharam com oito vacas holandesas em lactação, quatro canuladas, para investigar um aditivo enzimático com atividades de xilanases e celulases. Eles observaram que a proporção da dieta tratada com as enzimas influenciou a digestibilidade da matéria orgânica, da FDN e da FDA no trato digestivo. MANDEBVU et al. (1999) não observaram diferenças da

composição química da parede celular, dos produtos finais da fermentação e da digestão, quando da adição de enzimas fibrolíticas por ocasião da ensilagem de capins coastcross e Tifton. KUNG Jr. & MUCK (1997) observaram que enzimas fibrolíticas diminuíram o conteúdo da fibra de silagens de gramíneas, sem alterar a de silagens de alfafa e de milho.

As respostas ao uso de enzimas fibrolíticas exógenas são variáveis, podendo ser influenciadas por inúmeros fatores como: método de aplicação, complexo enzimático específico, tempo e duração da aplicação das enzimas, estabilidade, atividade e nível enzimático, composição da dieta, teor de água dos alimentos, estado fisiológico dos animais (BEAUCHEMIN et al., 1998).

Segundo BEAUCHEMIN et al. (1997), para se obter resultado satisfatório é necessário que ocorra interação entre enzima e alimento. Isso significa que um produto nem sempre produzirá a mesma resposta a diferentes tipos de alimentos. Contudo, um bom aditivo deverá ter diferentes concentrações de atividades enzimáticas que atuem em vários alimentos (BEAUCHEMIN et al., 1998). Pelo fato das dietas terem composições diferentes em volumosos e concentrados, a especificidade enzima-substrato é grande dilema na formulação de produtos destinados a bovinos. De acordo com BEAUCHEMIN et al. (2003), para se obter o máximo de benefício, diferentes tipos de enzimas deverão ser usados em uma dieta típica.

Outro fator importante a ser considerado é a dosagem enzimática. De acordo com KUNG et al. (2002), respostas *in vivo* ao uso de enzimas fibrolíticas tipicamente não são lineares, com alto níveis de enzimas sendo menos eficazes do que dosagens mais baixas. BEAUCHEMIN et al. (1998) relataram que enzimas em excesso restringem a ligação microbiana ao alimento, limitando a digestibilidade dos nutrientes, sendo importante determinar a taxa ótima de aplicação do suplemento para cada substrato.

Quanto à composição da dieta, espera-se que enzimas exógenas sejam mais efetivas em alimentos com maior teor de umidade, como nas silagens. O requerimento de água para hidrólise de polímeros complexos é um princípio bioquímico fundamental. No entanto, na prática, enzimas exógenas se mostram mais efetivas quando adicionadas a alimentos secos (BEAUCHEMIN et al., 1998). FENG et al. (1996), utilizando gramíneas secas, frescas ou reidratadas,

observaram maior digestibilidade *in vitro* e *in vi*vo da MS e da FDN em gramíneas secas tratadas com enzimas fibrolíticas. YANG et al. (2000) relataram aumento da digestibilidade da dieta quando enzimas foram adicionadas ao concentrado, não observando efeito para mistura total.

A eficácia das enzimas pode ser reduzida pela presença de componentes inibitórios nas silagens. NSEREKO et al. (2000) observaram que a presença desses componentes inibiu a atividade de 1,4-β-endoxilanases, sem interferir na atividade de celulase. A aplicação de enzimas às silagens pode também acelerar sua deterioração aeróbica. O crescimento da microbiota epifítica é estimulado pelos açúcares solúveis liberados pelo tratamento enzimático, podendo diminuir a qualidade da silagem se o tempo entre a aplicação da enzima e o consumo da silagem for longo (WANG et al., 2002a).

A eficiência catalítica das enzimas depende das características do meio, no qual inclui o fator temperatura. BEAUCHEMIN et al. (1998) não verificaram diferenças na eficácia de produtos enzimáticos, na faixa de temperatura de 30 a +35°C, aplicados em grãos de cevada secos.

A elucidação dos mecanismos pelos quais enzimas aumentam a digestão e utilização das dietas dos ruminantes é complicada por três principais motivos. Primeiro, os alimentos são estruturalmente complexos, contendo diversos polissacarídeos, proteínas, lipídeos, ligninas e ácido fenólico, muitas vezes, em íntima associação (HATFIELD, 1993). Segundo, os produtos enzimáticos contêm diversas enzimas que podem diferir em suas condições ótimas e especificidades. Finalmente, o fluido ruminal é por natureza um ecossistema microbiano extremamente complexo que contém diferentes espécies de microrganismos e de suas enzimas secretadas. A composição do líquido ruminal e de suas enzimas variam com a dieta, tipo de animal, estado fisiológico e dentro de um único animal (WILLIAMS et al., 1989; WEIMER et al., 1999).

Desta forma, é necessário desenvolver metodologias que considerem o modo de ação, a composição, a especificidade e a eficiência dos complexos enzimáticos provenientes de fungos ou bactérias, que, posteriormente, possam ser utilizados comercialmente na alimentação animal. Neste trabalho, objetivou-se produzir, caracterizar e avaliar o potencial de soluções enzimáticas de *Humicola grisea* var. *thermoidea* na alimentação de bovinos.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Produzir e caracterizar quatro soluções enzimáticas, utilizando o fungo *Humicola grisea* var. *thermoidea* e avaliar seus efeitos por meio da digestibilidade verdadeira *in vitro* da matéria seca (DIVMS) dos substratos: capim Marandu, casquinha de soja, feno de Tifton-85 e forragem de milho.

3.2 Objetivos Específicos

- Produzir quatro soluções enzimáticas (SM) por meio do crescimento do *Humicola grisea* var. *thermoidea* em diferentes substratos fibrosos: capim Marandu, casquinha de soja, feno de Tifton 85 e forragem de milho
- Caracterizar bioquimicamente as SM: temperatura ótima, pH ótimo e termoestabilidade;
- Avaliar os efeitos dos tempos de reação enzima-substrato sobre a DIVMS;
- Avaliar os efeitos das SM sobre a DIVMS.

REFERÊNCIAS

1. AGUIAR, A. P. A. Possibilidades de intensificação do uso da pastagem através de rotação sem ou com uso mínimo de fertilizantes. In: Simpósio sobre manejo da pastagem: fundamentos do pastejo rotacionado, Piracicaba, 1999. **Anais**... Piracicaba: FEALQ, Piracicaba, 1999. p. 85-138.

2. AKIN, D. E. Histological and physical factors affecting digestibility of forages. **Agronomy Journal**, v. 81, p. 17-25, 1989.

3. AKIYAMA, Y.; KATO, K**.** Structure of hydroxyproline-arabinoside from tobacco cells**. Agricultural and Biological Chemistry**, v. 41, p. 79-81, 1977.

4. ALBERSHEIM, P.; DARVILL, A. G.; O' NEILL, M.A. An hypothesis: the same mix polysaccharides are components of the primary cell walls higher plants. In: **Pectins and Pectinases.** Amsterdan: VISSER, J.; VORAGEN, A. G. J, 1996. v. 14, p. 47- 45.

5. ALKORTA, I.; GARBISU, C.; LLAMA, M. J.; SERRA, J. L. Industrial applications of pectic enzymes : a review. **Process Biochemistry,** v. 33, p. 21-28, 1998.

6. ALMEIDA, E. M.; POLIZELI, M. L.; JORGE, J. A. & TERENZI, H. F. Purification and biochemical characterization of ß-xylosidase from *Humicola grisea* var. *thermoidea*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 130, p. 171-176, 1995.

7. ARAÚJO, E. F.; BARROS, E. G.; CALDAS, R. A.; SILVA, D. O. Beta-glycosidase activity of a thermophilic cellulolytic fungus *Humicola* sp. **Biotechnology Letters**, v. 5, p. 781- 784, 1983.

8. ASPINALL, G. O. Constituents of plant cell walls. In: Encyclopedia Plant Physiology. 1981. v. 13 B: p. 3-8.

9. ATALLA, R. H.; HACKNEY, J. M.; UHLIN, I.; THOMPSON, N. S. Hemicelluloses as structure regulators in the aggregation of native cellulose. **Journal Biology Macromolecular,** v. 15, p. 109-112, 1993.

10. BACIC, A.; HARRIS, P. J.; STONE, B. A. Structure and function of plant cell walls. In: The biochemistry of plants. Preiss, J., ed. Academic Press, New York London, 1988. p. 297–371.

11. BASTAWED, K.B. Xylan structure, microbial xylanases, and their mode of action. **World Journal of Microbiology and Biotechnology,** v. 8, p. 353-368, 1992.

12. BEAUCHEMIN, K. A.; RODE, L. M.; SEWALT, V. J. H. Fibrolytic enzymes increase fiber digestibility and growth rate of steers fed dry forages. **Canadian Journal Animal Science,** v. 75, p. 641-644, 1995.

13. BEAUCHEMIN, K. A.; RODE, L. M. Use of feed enzymes in ruminant nutrition. In: RODE, L. M. **Animal Science Research and Development, Meeting Future Challenges.** Ottawa: Minister of Supply and Services, 1996. cap. 2, p. 103-130.

14. BEAUCHEMIN, K. A.; RODE, L. M. Feed enzymes for ruminants. **Feed Mix**, v. 5, n. 3. p. 17-21, 1997.

15. BEAUCHEMIN, K. A.; RODE, L. M.; W, Z. YANG.; McALLISTER, T. A. Use of feed enzymes in ruminant nutrition. In: PACIFIC NORTHWEST NUTRITION CONFERENCE, 33rd, 1998. Vancouver. **Proceedings...** Vancouver, 1998. 14 p.

16. BEAUCHEMIN, K. A.; JONES, S. D. M.; RODE, L. M.; SEWALT, V. J. H. Effects of grain source and enzyme additive on site and extent of nutrient digestion in dairy cows. **Journal of Dairy Science,** v. 82, n. 2, p. 378-390, 1999.

17. BEAUCHEMIN, K. A.; RODE, L. M.; W, Z. YANG. et al. Enzymes and direct fed microbials in diets for dairy cows, 2000 In: PROCEEDINGS OF THE TRI-STATE NUTRITION CONFERENCE, 2000. 10 p.

18. BEAUCHEMIN, K. A.; RODE, L. M.; MAEKAWA, M.; MORGAVI, D. P.; KAMPEN, R. Evaluation of a nonstarch polysaccharidase feed enzyme in dairy cow diets. **Journal of Dairy Science**, v. 83, n. 3, p. 543-553, 2000a.

19. BEAUCHEMIN, K. A.; COLOMBATTO, D.; MORGAVI, P. D.; YANG, Z. W. Use of exogenous fibrolytic enzymes to improve feed utilization by ruminants. **Journal of Animal Science,** v. 81, suppl. 2, p. 37-47, 2003.

20. BEG, Q.K.; KAPOOR, M.; MAHAJAN, L. & HOONDAL, G.S. Microbial xylanases and their industrial applications: a review. **Applied Microbiology Biotechnology,** v. 6, p. 326-338, 2001.

21. BHAT, M.; HAZLEWWOOD, G. P. Enzymology and other characteristics of cellulases and xylanases. In: M,BEDFORD.; G,PARTRIDGE. **Enzymes in Farm Animal Nutrition**. ed. CABI Publishing. Oxon, 2001. cap. 2, p. 11-60.

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

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

24. BORNEMAN, W.S.; AKIN, D.E.; LJUNGDAHL, L.G. Fermentation products and plant cell wall-degrading enzymes produced by monocentric and polycentric anaerobic ruminal fungi. **Applied and Environmental Microbiology,** v. 55, p. 1066-1073, 1989.

25. BRETT, C. T.; WALDRON, K. W. The molecular components o the wall. In: BRETT, C.T.; WALDRON,K. W. **Physiology and Biochemistry of Plant Cell Walls**. 2. ed. London: Chapman & Hall, 1996. cap. 2, p. 5-43.

26. BROWMAN, G. R.; BEAUCHEMIN. K. A.; SHELFORD, J. A. The proportion of the diet to which fibrolytic enzymes are added affects nutriente digestion by lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 85, n. 12, p. 3420-3429, 2002.

27. BROWN, M. A.; SAXENA, I. M. Cellulose biosynthesis: a model for understanding the assembly of biopolymers. **Plant Physiology Biochemistry,** v. 38, p. 57-67, 2000.

28. BURTON, G. W.; GATES, R. N.; HILL, G. M. Registration of 'Tifton 85' bermudagrass. **Crop Science**, v. 33, n. 3, p. 644645, 1993.

29. CARVALHO, W. R. **Produção e purificação de xilanase do fungo termofílico *Humicola grisea***. 2003. 111 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) – Departamento de Biotecnologia – Faculdade de Engenharia Química de Lorena, Lorena.

30. COLOMBATTO, D.; MORGAVI, D. P.; FURTADO, BEAUCHEMIN, K. A. Screening of exogenous enzyme for ruminant diets: relationship between biochemical characteristics and *in vitro* ruminal degradation. **Journal Animal Science**, v. 81, p. 2628 – 2638, 2003.

31. COLOMBATTO, D.; MOULD, F. L.; BHAT, M. K.; PHIPPS, R. H.; OWEN, E. In vitro evaluation of fibrolytic enzymes as additives for maize (*Zea mays* L.) silage. I. Effects of ensiling temperature, enzyme source and addition level or thermophilic sources. **Animal Feed Science and Technology,** v. 111, p. 111-128, 2003a.

32. COLOMBATTO, D.; MOULD, F. L.; BHAT, M. K.; PHIPPS, R. H.; OWEN, E. In vitro evaluation of fibrolytic enzymes as additives for maize (*Zea mays* L.) silage II. Effects on rate of acidification, fibre degradation during ensiling and rumen fermentation thermophilic sources. **Animal Feed Science and Technology,** v. 111, p. 129-143, 2003b.

33. COLOMBATTO, D.; MOULD, F. L., BHAT, M.K.; PHIPPS, R. H.; OWEN, E. In vitro evaluation of fibrolytic enzymes as additives for maize (*Zea mays* L.) silage. III. Comparison of enzymes derived from psychrophilic, mesophilic or thermophilic sources. **Animal Feed Science and Technology,** v. 111, p. 145-159, 2003c.

34. CONSIDINE, P J.; COUGHLAN, M. P. Production of carbohydrate-hydrolyzing enzyme blends by solid-state fermentation. In: M. Coughlan. **Enzyme Systems for Lignocellulose Degradation.** ed. Elsevier Applied Science, 1989. p. 273-281.

35. COSTA, K. A. D. P.; ROSA, B.; OLIVEIRA, I. P. D.; CUSTÓDIO, D. P.; SILVA, D. C. E.; Efeito da estacionalidade na produção de matéria seca e composição bromatológica da *Brachiaria brizantha* cv. Marandu. **Ciência Animal Brasileira,** v. 6, n. 3, p. 187-193, 2005.

36. COUGHLAN, M.P. The properties of fungal and bacterial cellulases with comment on their production and application. **Biotechnology and Genetic Engeering Reviews,** v. 3, p. 39-109, 1985.

37. COUGHLAN, M. P. Mechanisms of cellulose degradation by fungi and bacteria. **Animal Feed science and Technology,** v. 32, p. 77-100, 1991.

38. COWAN, W. D. Factors affecting the manufacture, distribution, application and overall quality of enzymes in poultry feeds. In: **Joint Proc. 2nd Int. Roundtable on Animal. Feed Biotechnology-Probiotics, and Workshop on Animal, Feed Enzymes**,1994, Ottawa. p.175-184.

39. D'ALMEIDA, M. L. O. Celulose e Papel: Tecnologia de fabricação do papel. São Paulo: Instituto de Pesquisas Tecnológicas – IPT. 2ª ed (ISBN: 85-09-00039-5 – obra completa), 1988.

40. DE PAULA, E. H.; RAMOS, L. P. AZEVEDO, M. O. The potencial of *Humicol grisea* var*. thermoidea* for bioconversion of sugar cane bagasse. **Bioresource Technology,** v**.** 68, p. 35-41, 1999.

41. DE VRIES, J. A.; ROMBOUTS, F. M.; VORAGEN, A. G. J.; PILNIK, W. Enzymatic degradation of apple pectins. **Carbohydrate polymers**, v.2, p.25-33, 1982.

42. DE VRIES, J. A.; ROMBOUTS, F. M.; VORAGEN, A. G. J.; PILNIK, W. Distribution of methoxil groups in apple pectic substances. **Carbohydrate polymers**, London, v.3, p.245-258, 1983.

43. DILLON, A. Celulases. In*:* SAID, S.; PIETRO, R. C. L. **Enzimas como agentes biotecnológicos.** Ribeirão Preto: Legis Summa, 2004, cap. 14, p. 243-270.

44. ENARI, T.M.; NIKU-PAAVOLA, M. L. Enzymatic hydrolysis of cellulose: is the current theory of the mechanisms of hydrolysis valid. **Critical Reviews in Biotechnology,** v. 5, p. 1844-1850, 1987.

45. ESQUERRÉ-TUGAYÉ, M. T.; LAMPORT, D. T. A. Cell surfaces in plant-microorganism interactions. **Plant Physiology**, v. 64, p. 314-319, 1979.

46. EVANGELISTA, A. R.; REZENDE, A. V.; AMARAL, P. N. C. Produção de feno de gramíneas. In: Forragicultura e Pastagens Temas em Evidência, 2005, Lavras. **Anais...**Lavras: Universidade Federal de Lavras, 2005. p. 247-276.

47. FENG, P.; HUNT, C. W.; PRITCHRD, G. T.; JULIEN, W. E. Effect of enzyme preparations on in situ and in vivo additives degradation and in vivo digestive characteristics of mature cool-season grass in beef steers. **Journal of Animal Science**, v.74, n.6, p. 1349-1357, 1996.

48. FILHO, E. X. F. The xylan-degrading enzyme system. **Brazilian Journal Medical and Biological Research**, v.27, p. 1093 –1109, 1994.

49. FILHO, E. X. F. Pectinases. In: SAID, S.; PIETRO, R. C. L. R. **Enzimas como agentes Biotecnológicos**. Ribeirão Preto: Legis Summa, 2004. cap. 17, 307-325.

50. FINCHER, G. B.; STONE, B.A.; CLARKE, A. E. Arabinogalactan-Proteins: **Structure, Biosynthesis, and Function, Annual Review of Plant Physiology**, v. 34, p. 47-70, 1983.

51. FORSBERG, C. W.; FORANO, E.; CHESSON, A. Microbial adherence to the plan Ruminant Physiology: Digestion, Metabolism, Growth, and Reproductiont cell wall and enzymatic hydrolysis. In: CRONJÉ, PIERRE.; BOOMKER, E. A. **Ruminant Physiology: Digestion, Metabolism, Growth, and Reproduction**. CABI Publishing, 2000. cap. 5, p. 79-98.

52. GASHE, B. A. Cellulase production and activity by *Trichoderma* sp. A-001. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 73, p. 79-82, 1992.

53. GOMES, E.; UEZ, U. A. M.; MARTIN, N.; S, D. R. Enzimas termoestáveis: fontes, produção e aplicação industrial. **Química Nova**, v. 30, n. 1, p. 136 – 145, 2007.

54. GONÇALVES, D. G.; SANTOS, T. G.; JOBIM, C. C. DAMASCENO, C J.; CECATO, U.; BRANCO, F. A**.** Determinação do Consumo, Digestibilidade e Frações Protéicas e de Carboidratos do Feno de Tifton 85 em Diferentes Idades de Corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 32, n. 4, p. 804 – 813, 2003.

55. GRENET, E.; BESLE, J. M. Microbes and fibre degradatio. In: JOUNAY, J.P. Rumen microbial metabolism and ruminal digestion. Paris, 1991. p. 107-129.

56. GUMMADI, S. N.; PANDA, T. Purification and biochemical properties of microbial pectinases - a review. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 987-996, 2003.

57. GUPTA, R.; MOHAPATRA, H.; GOSWAMI, V. K.; CHAUHAN, B**.** Microbial α-amylases: a biotechnological perspective. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 1599-1616, 2003.

58. HATFIELD, R. D. Cell wall polysaccharide interactions and degradability. In: JUNG, H.G.; BUXTON, D.R.; HATFIELD, R.D. **Forage cell wall structure and digestibility**. ed. ASA-CSSA_SSSA: WI,1993, p. 285-314.

59. HIGUCHI, T. Lignin biochemistry: Biosynthesis and degradation. **Wood Science Technology,** v. 24, p. 23-63. 1990.

60. HISAMATSU, M.; YORK, W. S.; DARVILL, A. G.; ALBERSHEIM, P. Characterization of seven xyloglucan oligosaccharides containing from seventeen to twenty glycosyl residues. **Carbohydrate Research**, n. **227**, p. 45–71, 1992.

61. HRISTOV, A. N.; McALLISTER, T. A.; CHENG, K. J. Stability of exogenous polysaccharide-degrading enzymes in the rumen. **Animal Feed Science and Technology**, v. 76, p. 161-168, 1998.

62. 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.

63. JAYANI, R. S.; SAXENA, S.; GUPTA, R. Microbial pectinolytic enzymes: a review. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 2931-2944, 2005.

64. JUNG, H. G.; DEETZ, D. A. Cell wall lignification and degradability. In: JUNG, H. G.; BUXTON, D. R.; HATIFIELD, R. D. et al. **Forage cell wall structure and digestibility.** Madison: America Society of Agronomy, Crop Science Society of America, Soil Science Society of America, 1993. p.315-46.

65. KAMRA, D. N. Rumen microbial ecosystem. **Current Science**, v. 89, n.1, p. 124 – 134, 2005.

66. KNOWLES, J.; LEHTOVAARA, P.; TEERI, T. Cellulase families and their genes. **Trends Biotechnology**, v. 5, p. 255-261, 1987.

67. KOZLOSKI, V. G. Bioquímica microbiana ruminal. In: Bioquímica dos ruminantes. 1 ed. Santa Maria: UFMS, 2002, cap. 1, p. 140p.

68. KULKAMI, N.; SHENDYE, A. & RAO, M. Molecular and biotechnological aspects of xylanases. **FEMS Microbiology**. Reviews, v. 23. p. 411- 456, 1999.

69. KUNG, L. Jr.; MUCK, R. E. Animal response to silage additives. In: The Silage: Field to Feed Bunk North American Conference, 1997, Hershey. **Proceedings**… Hershey: National Regional Agricultural Engineering Service, 1997. p. 200-210.

70. KUNG, L. Jr. Enzymes for lactating dairy cows: News theories and applications. In: 12th Annual Florida Ruminant Nutrition Symposium, 2002, Florida. **Proceedings**… Florida: 2002. p. 29-43.

71. LANA, R. P. Nutrição e alimentação animal. 1 ed. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2005, p. 343p.

72. LEE, R. W.; BOTTS, R. L. Evaluation of a single oral dosing and continuous feeding of *Streptococcus faecium* M74 (Syntabac) on the performance of incoming feedlot cattle. **Journal of Animimal Science**, v. 66, suppl. 1, p. 460, 1998.

73. LEWIS, G. E.; HUNT, C. W.; SANCHEZ. Effect of direct-fed fibrolytic enzymes on the digestive characteristics of a forage-based diet fed to beef steers. **Journal of Animal Science,** v. 74, n. 12, p. 3020-3028, 1996.

74. LYND, L. R.; WEIMER, P. J.; VAN ZYL, W. H.; PRETORIUS, I. S. Microbial Cellulose Utilization: Fundamental and Biotechnology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews.** v. 6, p. 506-577, 2002.

75. MALAFAIA, P. A. M.; VALADARES FILHO, S. C.; VIEIRA, R. A. M.; SILVA, J. F. C.; PEDREIRA, J. C. Determinação cinética ruminal das frações protéicas e nitrogenada de alguns alimentos para ruminantes. **Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 26, n. 6, p. 1243-1251,1997.

76. MAHESHWARI, R.; BHARADWAJ, G.; BHAT, K. M. Thermophilic Fungi: Their Physiology and Enzymes. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, n. 3, p. 461 – 488, 2000.

77. MANDEBVU, P.; WEST, J. W.; FROETSCHEL, M. A., HATFIELD, R.D.; GATES, R.N.; HILL, G.M. Effect of enzyme or microbial treatment of bermudagrass forages before ensiling on cell wall composition, end products of silage fermentation and in situ digestion kinectics. **Animal Feed Science and Technology**, v. 77, p. 317-319, 1999.

78. MARCON, M.V. **Extração e caracterização de pectinas obtidas de farinha de bagaço de maça.** 2004, 150f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) Universidade Estadual de Ponta Grossa.

79. MARSDEN, W. L.; GRAY, P. P. Enzymatic hydrolysis of cellulose in lignocellulosic materials**. Critical Review Biotechnology**, v. 3, n. 3, p. 235-276, 1986.

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

81. McALLISTER, T. A.; HRISTOV, A.N.; BEAUCHEMIN, K.A. et al. Enzymes in ruminant diets. In: BEDFORD, M. R.; PARTRIDGE, G. G. **Enzymes in farm animal nutrition**. Oxon: Cab International, 2001. cap 11, p.273-298.

82. McNEILL, M.; DARVILL, A. G.; FRY, C. S.; ALBERSHEIM, P. Structure and function of the primary cell wall of plants. **Annual Review of Biochemistry,** v. 53, p. 625-663, 1984.

83. MELO, M. A. F. D.; **Avaliação do desempenho e do fator econômico de novilho nelore, sob quatro suplementos, da desmama ao abate, em pastagens de *Brachiaria brizantha* cv. Marandu**. 2006. 42 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária – Universidade federal de Goiás, Goiânia.

84. MORAES, L. M. P. Amilases. In: SAID, S.; PIETRO, R. **Enzimas como agentes Biotecnológicos**. Ribeirão Preto: Legis Summa, 2004, cap. 13, 222 - 242.

85. MORGAVI, D. P.; NEWBOLD, C. J.; BEEVER, D. E. et al. Stability and stabilization of potential feed additive enzyme sin rumen fluid. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, n. 1, p. 171-177, 2000a.

86.MUIRHEAD, S. Direct fed microbial, enzyme and forage additive **Compendium.** 3 ed. Minetonka: Millier Publishing ,1996. 391p.

87. NEWBOLD, J. Proposed mechanisms for enzymes as modifiers of ruminal fermentation. In: FLORIDA RUMINANT NUTRITION SYMPOSIUM, 16., 1997, Gainesville. **Proceedings…** Gainesville, 1997. 14 p.

88. NSEREKO, V. L.; MORGAVI, D. P.; RODE, L. M.; BEAUCHEMIN, K. A.; McALLISTER, T. A. Effects of fungal enzyme preparations on hydrolysis and subsequent degradtion of alfa hay fiber by mixed rumen microorganisms in vitro**. Animal Feed Science and Technology**, v. 88, p. 153-170, 2000.

89. OLIVEIRA, S. J.; ZANINE, M. D. A.; SANTOS, M. E. Diversidade microbiana no ecossistema ruminal. **Revista Eletrônica de Veterinária**, v. III, n. 6, p. 1-12, 2007. Disponível em: http: ww.veterinaria.org/revistas/redvet/n060607/060703.pdf. Acesso em 04 de junho de 2008.

90. O'NEILL, M. A.; WARRENFELTZ , D. W.; KATES, K.; PELLERIN, P.; DOCO, T.; DARVILL, A. G.; ALBERSHEIM, P. Rhamnogalacturonan-II, a pectic polysaccharide in the walls of growing plant cell, forms a dimmer that is covalently cross-linked by a borate ester. In vitro conditions for the formation and hydrolysis of the dimmer. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, p. 22923-22930, 1996.

91. PAROLIZ, A. F. P.; BRANCO, A. F.; NEVES, C. A. Digestibilidade *in vitro* da casquinha de soja, resíduo de soja e casca de algodão . In REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 41, 2004, Campo Grande, **Anais.**

92. PEDREIRA, C. G. S. Avaliação de novas gramíneas do gênero *Cynodon* para a pecuária do sudeste dos Estados Unidos. In: WORKSHOP SOBRE O POTENCIAL FORRAGEIRO DO GENERO CYNODON, 1996, Juiz de Fora. **Anais...** Juiz de Fora: Embrapa-CNPGL, 1996. p. 111-125.

93. PENDLETON, B. The regulatory environment. In: MUIRHEA, S**. Direct fed microbial, Enzyme and forage Additive Compendium.** Minnetonka: Miller Publishing, 2000. p. 49.

94. PERALTA, R. M.; KADOWAKI, M. K.; TERENZI, H. F. & JORGE, J. A. A highly thermostable ß-glycosidase activity from the thermophilic fungus *Humicola grisea* var. *thermoidea*: purification and biochemical characterization. **FEMS Microbiology Letters** v.146, p. 291- 295, 1997**.**

95. REESE, E. T.; SUI, R. G.; LEVINSON, H. S. The biological degradation of soluble cellulose derivatives and its relationship to the mechanism of cellulose hydrolysis. **Journal of Bacteriology** . v. 59, p. 485-497, 1950.

96. REID, J. S. G. Carbohydrate metabolism: structural carbohydrates. In: **Pant Biochemistry.** New York: Academic Press, 1997.

97. SANTANA, A. C. M.; CAVALI, J. Fundamentos e avaliação comparativa de métodos para análise de lignina em forragens**. Revista Electrónica de Veterinária,** v. VII, n. 11, p. 1-13, 2006. Disponível em: http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/111106.html. Acesso em 26 de agosto de 2007.

98. SCHINGOETHE, D. J.; G, A. STEGEMAN.; TREACHER, R. J. Response of lactanting dairy cows to a cellulase and xylanase enzyme mixture applied to forages at the time of feeding. **Journal of Dairy Science**, v. 82, n. 5, p. 996-1003, 1999.

99. SILVA, V. A.; PEREIRA, G. O.; GARCIA, R. et al. Composição bromatológica e digestibilidade *in vitro* da matéria seca de silagens de milho e sorgo tratadas com inoculantes microbianos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 34, n.6, p.1881 – 1890, 2005.

100. STAHLBERG, J.; JOHANSSON, G.; PETTERSON, G. A new model for enzymatic hydrolysis of cellulose based on the two-domain structure of cellobiohydrolase-1. **Bio Tecchnology.** v. 9, p. 286-290, 1991.

101. TEERI, T.T. Crystalline cellulose degradation: new insight into the function of cellobiohydrolases. **Trends biotechnology**. v 15, p. 160-167, 1997.

102. TUNCER, M.; BALL, A. S.; ROB, A.; WILSON, M. T. Optimization of extracelullar lignocellulolytic enzyme production by a thermophilic actinomycete *Thermomonospora fusca* BD 25. **Enz. Microb. Technol**. v. 25, p. 38-47, 1999.

103. UENOJO, M.; PASTORE, G. M. Pectinases: aplicações industriais e perspectivas. Revisão. **Química nova,** v.30, p. 388-394, 2007.

104. VALLE, C. B.; EUCLIDES, V. P. B.; MACEDO. M.C.M. Características das plantas forrageiras do gênero *Brachiaria.* In: Simpósio SOBRE MANEJO DE PASTAGENS, 17., Piracicaba, 2000*.* **Anais***...* Piracicaba: FEALQ, 2000. p. 65-108.

105. VAN SOEST, P. J. **Nutritional Ecology of the Ruminant**. 2.ed. Ithaca: Cornell University Press, 1994. 476p.

106. VARNER, J. E.; LIN, L.S. Plant cell wall architecture: **Review Cell**, v. 56, p. 231-239, 1989.

107. WANG, Y.; McALLISTER, T. A. Rumen microbes, enzymes and feed digestion. **Journal of Animimal Science**, v. 15, n. 11, p. 1659-1676, 2002.

108. WANG, Y.; MCALLISTER, T. A.; RODE, L., BEAUCHEMIN,K.; MORGAVI, D.; NSEREKO, V.; IWAASA**, A.;** YANG, W. Effect of exogenous fibrolytic enzymes

on epiphytic microbial populations and in vitro silage digestion. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 82, p. 760-768, 2002a.

109. WEIMER, P. J.; WAGHORN, C. L.; MERTENS, D. R.; Effect of diet on populations of three species of ruminal cellulolytic bacteria in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 82, n. 1, p. 122-134, 1999.

110. WHITE, B. A.; MACKIE, R.I.; DOERNER, K. C. Enzymatic Hydrolysis of Forages Cell Walls. In: JUNG, H. G.; BUXTON, D. R.; HATFIELD, R.; RALPH, J. **Forage Cell Wall Structure and Digestibility**. Madson: WI, 1993. p. 455-484.

111. WILKIE, K. C. B. The hemicelluloses of grasses and cereals. **Advance Carbohydrate Chemical Biochemistry**, v. 36, p 215-264, 1979.

112. WILLATS, W. G. T.; KNOX, J. P.; MIKKELSEN, J. D. Pectin: new insights into an old polymer are starting to gel. **Trends in Food Science & Tecnology**, v. 17, p. 97-104. 2006.

113. WILLIAMS, A. G.; WITHERS, S. E.; STRACHAN, N. H. Postprandial variations in the activity of polysaccharide-degrading enzymes in microbial populations from the digesta solids and liquor fractions of rumen contents. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 66, p. 15-26, 1989.

114. YANG, W. Z.; BEAUCHEMIN, K. A.; RODE, L. M. A Comparison of methods of adding fibrolytic enzymes to lactating cow diets. **Journal of Dairy Science**, v. 83, n. 11, p. 2512-2520, 2000.

CAPÍTULO 2 – PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ENZIMAS HIDROLÍTICAS DE *Humicola grisea* var. *thermoidea*

RESUMO

O presente estudo teve por objetivo produzir e caracterizar quatro soluções enzimáticas do fungo *Humicola grisea* var. *thermoidea,* em meios de culturas contendo diferentes fontes de carbono, a saber: capim Marandu, casquinha de soja, feno de Tifton 85 e forragem de milho, durante 96 horas de cultivo, a 42°C. Verificou-se que o fungo produziu as enzimas celulases, xilanase e β-glicosidase em diferentes quantidades, o que foi dependente da fonte de carbono. A celulase produzida apresentou maior atividade em temperatura entre 40ºC e 50°C. A temperatura ótima de xilanase e β-glicosidase foi entre 50 e 60°C. O pH ótimo da enzima celulase foi 6,0, quando o fungo cresceu em feno de Tifton, forragem de milho e casquinha de soja. No meio contendo capim Marandu, a enzima apresentou atividade ótima em pH 5,5. Para as quatro fontes de carbono, xilanase produzida exibiu pH ótimo de 6,0. Em relação a β-glicosidase, a atividade enzimática foi maior em pH 5,5, no meio com feno de Tifton. Para capim Marandu, a atividade da enzima foi máxima na faixa de 5,5 a 6,5. Quanto à forragem de milho e casquinha de soja, a enzima exibiu maior atividade em pH 6,5. A celulase produzida, nas quatro fontes de carbono, permaneceu estável após a incubação por 60 minutos, a 39°C. Xilanase produzida apresentou estabilidade térmica durante 240 minutos de incubação, a 50°C. A enzima β-glicosidase, dependendo da fonte de carbono, manteve de 66,7 a 125,75% de sua atividade, a 50°C, durante 240 minutos.

Palavras-chave: celulase, caracterização bioquímica, fungo termofílico, xilanase, β-glicosidase

PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF HYDROLITIC ENZYMES FROM *Humicola grisea* var. *thermoidea*

ABSTRACT

The objective of this work was to produce and characterize four multi enzyme complexes from the fungus *Humicola grisea* var. *thermoidea*, maintained for 96 hours at 42°C in growth media containing different carbon sources: Marandu grass; soybean seedcoats; Tifton 85 hay; and corn forage. Different amounts of cellulase, xylanase and β-glucosidase enzymes were obtained depending on the different carbon sources. Cellulase presented increased activity in temperatures between 40ºC and 50ºC. The observed optimum temperature range for xylanase and β-glycosidase was from 50ºC and 60ºC. Optimum pH for cellulase activity was 6.0 when fungus growth occurred in Tifton hay, corn forage, and soybean seedcoats. When the enzyme was obtained from medium containing Marandu grass, optimum enzyme activity occurred at pH 5.5. Regardless of the carbon source, xylanase activity was higher at pH 6.0. As for β-glucosidase, optimum activity was observed at pH 5.5 for Tifton media as compared to pH 6.5 for corn and soybean containing media. For grass Marandu, the activity of the enzyme was maximum in the range 5.5 to 6.5. Cellulase produced from all growth media were maintained stable after incubation for 60 minutes at 39°C. Xylanase presented thermal stability during 240 minute incubation period at 50°C. Activity stability of β-glycosidase varied according to carbon source and presented 66.7 to 125.75% activity at 50°C for 240 minutes.

Keyword: biochemical characterization, cellulase, thermophilic fungus, xilanase, β-glicosidase

1 INTRODUÇÃO

Devido à complexidade e diversidade estrutural dos polissacarídeos da parede celular vegetal, a sua completa degradação requer um conjunto de enzimas que atuam sinergeticamente (LYND et al., 2002). Bactérias e fungos filamentosos são capazes de degradar os carboidratos estruturais da parede celular, pela produção de uma mistura de glicosil hidrolases funcionalmente distintas (POUTANEN et al., 1991).

Grande parte das pesquisas é direcionada para o desenvolvimento de processos biocatalíticos, em que a celulose é hidrolisada em unidades de glicose por um complexo sistema microbiano multicelulolítico, que envolve muitas celulases tais como: endo-1,4-β-D-glucanases, celobiohidrolases e glicosidases (WOOD et al., 1980).

A eficiência da ação sinérgica de celulases em um sistema enzimático microbiano complexo foi relatada por ser superior ao de sua ação individual. As enzimas endo-1,4-β-D-glucanases hidrolisam aleatoriamente a ligação interna β-1,4-glicosídica do polímero de celulose (CHRISTAKOPOULOS et al., 1995). Uma vez que as celobiohidrolases atacam somente a cadeia final glicosídica, suas atividades são geralmente dependentes das endo-1,4-β-D-glucanases. As β-glicosidases clivam oligossacarídeos e celobiose em unidades de glicose.

Alguns dos microrganismos celulolíticos produzem outras glicosil hidrolases, como as pectinases, xilanases e endo-1,3-1,4-β-D-glucanases, que podem facilitar o acesso de celulases aos seus substratos, por hidrolizarem os polissacarídeos associados às plantas.

Os fungos são os mais importantes microrganismos utilizados pela indústria na produção de enzimas e os principais celulolíticos produtores de celulases e xilanase incluem: *Trichoderma viride*, *T. reesei*, *Aspergilus niger, Penicillium funiculosum* e *Humicola* sp (HASPER et al., 2002). No entanto, a eficiência dos sistemas enzimáticos produzidos por *T. viride* e *T. reesei* foi limitada pela atividade celulolítica relativamente baixa e termoestabilidade (CASTELLANOS et al., 1995). Além disso, a baixa atividade de β-glicosidase, obtida de *T. reesei,* foi induzida por forte inibição da enzima, como resultado do acúmulo de celobiose. *P. funiculosum* é reconhecido como uma fonte potencial e

importante de sistemas celulolíticos de alta atividade (WOOD et al., 1980). *Aspergillus niger* é fonte de celulases destinada ao uso alimentício e é considerado, algumas vezes, superior a outros fungos, reconhecidamente bons produtores dos complexos celulolíticos e hemicelulolíticos, como *Trichoderma viride. H. grisea* tem a capacidade de produzir várias enzimas termoestáveis, como celulases, β-glicosidases, xilanases, amilases, trealases, β-xilosidases (AZEVEDO et al., 1990), que podem ser empregadas na hidrólise enzimática de diversos substratos lignocelulósicos.

Este trabalho teve por objetivo produzir e caracterizar quatro soluções enzimáticas produzidas pelo fungo *H. grisea* em meios de cultura contendo capim Marandu, casquinha de soja, feno de Tifton-85 e forragem de milho como fontes de carbono.

2 **MATERIAL E MÉTODOS**

2.1 Local e período experimental

Os experimentos foram conduzidos no período de março de 2006 a outubro de 2007, no Laboratório de Enzimologia do Instituto de Ciências Biológicas/ICB II, da Universidade Federal de Goiás, localizado no município de Goiânia – Goiás.

2.2 Linhagem utilizada e manutenção do fungo

A amostra do fungo *Humicola grisea* var. *thermoidea* utilizada no presente trabalho foi isolada de compostagem na Universidade Federal de Viçosa (MG). O fungo foi cultivado em Meio Ágar Aveia [farinha de aveia infantil Quaker - 4,0% (p/v) e Ágar 1,5% (p/v)], autoclavado a 120°C durante 20 minutos. A cultura foi mantida por quatro dias a 42ºC, e posteriormente, à temperatura ambiente por mais três dias. As placas foram estocadas a 4º C.

2.3. Produção das soluções enzimáticas

Dez discos de cultura (5 mm), contendo esporos do *Humicola grisea* var. *thermoidea*, retirados das placas de 7 dias de cultivo, foram inoculados em erlenmeyers de 1,0 L, contendo 250 mL de meio de indução (fonte de carbono 5 g/L; extrato de levedura 3 g/L; sulfato de amônia 1,4 g/L; $CaCl_2.6H_2O$ 0,3 g/L; sulfato de magnésio 0,3 g/L; elementos traços $CuSO_4$, $FeSO_4$ e glicose, na concentração: zero; 0,025; 0,075 e 0,15%). Capim Marandu, feno de Tifton 85, casquinha de soja e forragem de milho, moídos em moinho com peneira de crivo de 1 mm, foram utilizados como fonte de carbono. Os frascos com suas respectivas fontes de carbono (4) e diferentes concentrações de glicose (4) foram incubados em agitador rotatório (Controlled Environment Incubator Shacker, Brunswick Scientific Co. Inc., U.S.A) à 42 °C e velocidade de 120 rpm.

A cinética de produção foi realizada após 24, 48, 72 e 96 h de cultivo. Alíquotas foram coletadas e centrifugadas, a 4000 rpm por 10 minutos, para determinação da atividade de celulase total e xilanase, conforme item 2.4.2, nas diferentes condições de cultivo.

2.4. Caracterização enzimática

2.4.1 Dosagem de Proteínas Totais

A concentração de proteína foi determinada pelo método colorimétrico descrito por BRADFORD (1976), utilizando albumina sérica bovina (Sigma) como padrão. A reação foi conduzida pela mistura de 100μl de amostra a 1 mL do reagente de Bradford e incubada a temperatura ambiente por 15 minutos. A leitura foi feita em espectrofotômetro a 595nm.

2.4.2 Determinação da atividade enzimática

2.4.2.1 Celulase Total

Atividade de celulase em papel de filtro (Fpase) foi determinada utilizando-se uma tira de 1,0 x 6,0 cm de papel de filtro Whatman nº1 (50mg), como substrato, 150 µl do extrato enzimático e 350 µl de tampão. No controle, o extrato enzimático foi substituído por 150 µl de água. O ensaio foi realizado em três tampões diferentes: tampão acetato de sódio 50 $mmol.L^{-1}$, pH 5,5, tampão citrato fosfato 50 $mmol.L^{-1}$, pH 6,8 e tampão de Kansas 50 $mmol.L^{-1}$, pH 6,8 (SILVA & QUEIROZ et al. 2002. A mistura de reação foi incubada em banho-maria a temperatura de 39°C, durante 60 minutos. Posteriormente 1 mL de ácido **3,5-**dinitrosalicílico (ADNS) foi adicionado e o material fervido por 10 minutos (MILLER, 1959).

A concentração de açúcar redutor liberado foi determinada espectrofotometricamente a 550 nm pelo método do ADNS, utilizando glicose como padrão. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para formar um µmol de açúcar redutor por minuto da reação.

2.4.2.2 Xilanase

A atividade de xilanase foi determinada nos tampões acetato de sódio 50 mmol. L^{-1}, pH 5,5, citrato fosfato 50 mmol.L^{-1}, pH 6,8 e Kansas 50 mmol.L^{-1}, pH 6,8. A mistura de reação foi incubada a 50°C por 30 minutos.

O ensaio enzimático realizado foi: teste: 50 µl do extrato enzimático, 100 µl de xilana (oat spelts - sigma), 350 µl de tampão, 500 µl de DNS; a mistura da reação foi incubada por 10 minutos em água fervente, com posterior adição de 1000 µl de água; controle 1: 50 µl do extrato enzimático, 450 µl de tampão, 500 µl de ADNS; a mistura de reação foi incubada por 10 minutos em água fervente, com posterior adição de 1000 µl de água; controle 2: 100 µl de xilana, 400 µl de tampão, 500 µl de ADNS; a mistura de reação foi incubada por 10 minutos em água fervente, com posterior adição de 1000 µl de água.

A concentração de açúcar redutor liberado foi determinada espectrofotometricamente a 540 nm pelo método do ADNS, utilizando xilose como padrão. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para formar um µmol de açúcar redutor por minuto da reação.

2.4.2.3 β-Glicosidase

Determinou-se a atividade de β-glicosidase usando como substrato ρ-nitro-fenil-β-glicopiranosideo (ρ-NPG). A mistura de reação consistiu de 50 µl do extrato enzimático, 350 µl de tampão e 100 µl de substrato. O ensaio enzimático foi realizado em 10 minutos de incubação a 39ºC, sendo a reação interrompida com a adição de 1 mL de solução carbonato de sódio (0,5 M). A quantidade de ρ-nitro-fenil liberada foi determinada espectrofotometricamente a 405 nm.

O ensaio foi realizado nos tampões acetato de sódio 50 mmol.L^{-1}, pH 5,5, citrato fosfato 50 mmol.L^{-1}, pH 6,8 e Kansas 50 mmol.L^{-1}, pH 6,8.

Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para formar um µmol de ρ-nitro-fenil por minuto da reação.

2.4.2.4 CMCase

A 200 µl de solução de carboximetilcelulose 1% (média viscosidade - Sigma), dissolvido nos tampões acetato de sódio 50 mmol.L^{-1}, pH 5,5, citrato fosfato e Kansas, 50 mmol.L^{-1}, pH, 6,8, foram acrescentados 200 µl do extrato enzimático. Após incubação da mistura a 39º C por 1 hora, a reação foi interrompida pela adição de 1 mL de ADNS e aquecida por 10 minutos.

A concentração de enzima foi estimada após a quantificação espectrofotométrica a 550 nm de açúcar redutor liberado. A curva padrão foi feita com utilização de glicose. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para formar um µmol de açúcar redutor por minuto da reação.

2.4.2.5 Exocelulase

A 200 µl de solução de celulose microcristalina Avicel, 1%, dissolvido em tampão citrato fosfato, 50 mmol.L^{-1}, pH, 6,8 e Kansas, 50 mmol.L^{-1}, pH, 6,8 foram acrescentados 200 µl do extrato enzimático. Após incubação da mistura a 39º C por 1 hora, a reação foi interrompida pela adição de 1 mL de ADNS e aquecida por 10 minutos.

A concentração de enzima foi estimada após a quantificação de açúcar redutor liberado, a 550 nm. A curva padrão foi feita com utilização de glicose. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para formar um µmol de açúcar redutor por minuto da reação.

2.4.2.6 Pectinase

A atividade de pectinase foi determinada utilizando pectina (citrus peel - Sigma) como substrato. A mistura da reação consistiu de 50 µl da amostra enzimática (pré-incubada em banho Maria, por 3 minutos a 39º e 50º C), 100 µl de pectina 0,5% (dissolvida em tampão acetato de sódio 50 mmol.L^{-1}, pH 5,5 e citrato fosfato, 50 mmol.L^{-1}, pH, 6,8). Após 30 minutos de incubação a 50º C, a reação foi

interrompida com 300 µl de ADNS e a solução mantida em água fervente por 10 minutos, com posterior adição de 1,5 mL de água destilada.

A concentração de enzima foi estimada após a quantificação espectrofotométrica a 540 nm, de açúcar redutor liberado. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para formar um µmol de açúcar redutor por minuto da reação.

2.4.2.7 Amilase

A amilase foi determinada pela atividade dextrinizante que se baseia na variação da intensidade da cor do complexo iodo-amido (FUWA, 1954). A 40 µl de tampão (acetato de sódio, 50 mM pH 5,5; citrato fosfato, 50 mM pH 6,8 e Kansas, 50 mM pH 6,8) foram adicionados 60 µl de amostra enzimática e 100 µl de solução de amido 0,5%. A mistura foi incubada a 50ºC por 60 minutos e a reação interrompida com adição de 200 µl de ácido acético (1,0 $mol.L^{-1}$) e 200 µl de solução de iodo-iodeto a 1%, iodeto de potássio e água destilada na proporção de (1v:1v:3v). O volume foi completado com água destilada para 10 mL, homogeneizado e a absorvância determinada a 660 nm.

A quantidade de amido consumido foi determinada conforme curva padrão construída com quantidades crescentes de amido solúvel (0-0,5 $mg.mL^{-1}$).

Uma unidade de atividade amilolítica dextrinizante foi definida como a quantidade de enzima necessária para hidrolisar 0,1 mg de amido por minuto de reação (FUWA, 1954).

2.5. Caracterização bioquímica

Foram avaliados a temperatura ótima, pH ótimo e termoestabilidade para as enzimas celulase total, xilanase e β-glicosidase, conforme os protocolos descritos no item 2.4.2.

2.5.1 pH ótimo

Para determinação do pH ótimo, amostras enzimáticas foram incubadas nos pHs: 5,0; 5,5; 6,0; 6,5; e 7,0. Os ensaios foram realizados em tampão fosfato dissódico 50 mmol. L^{-1}.

2.5.2 Temperatura ótima

Amostras enzimáticas foram incubadas em banho-maria a 30, 40, 50 e 60ºC para avaliação da temperatura ótima. Os ensaios foram realizados em tampão fosfato dissódico 50 mmol. L^{-1}, pH 5,5.

2.5.3 Termoestabilidade

A atividade de celulase total foi determinada após incubação das amostras enzimáticas a 39°C e as atividades de xilanase e β-glicosidase foram avaliadas a 50°C, em banho-maria, durante 60, 120, 180 e 240 minutos. Os ensaios foram realizados em tampão fosfato dissódico 50 mmol. L^{-1}, pH 5,5.

2.6. Concentração das soluções enzimáticas

Após avaliação cinética das enzimas, as soluções enzimáticas produzidas pelo fungo *H. grisea*, após 96 h de cultivo, nos meios de cultura com suas respectivas fontes de carbono sem glicose, foram concentradas (3 vezes) em aparelho de ultrafiltração (Stirred Ultrafiltration Cells, modelo 8400 – Millipore), membrana poro 10. Após o processo, alíquotas foram coletadas para determinação de proteínas e dosagens de celulase total, xilanase, CMCase, exocelulase e β-glicosidase, conforme item 2.4.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Produção de soluções enzimáticas

O potencial do *H grisea* como produtor de enzimas hidrolíticas, em diferentes meios e períodos de cultivo, é mostrado nas Figuras 1 e 2.

Os resultados indicaram que o *H. grisea* produziu enzimas fibrolíticas nos meios de cultivo, com maior atividade de celulase em relação à xilanase. Quanto à celulase, verificou-se pico máximo de atividade em 96 horas, nos meios sem e com 0,025 g de glicose. A atividade máxima, na ausência de glicose, foi de 80,3; 47,4 e 81,0 U/mL para capim Marandu, forragem de milho e casquinha de soja, respectivamente. Em meio contendo feno de Tifton 85, a atividade máxima foi de 65,0 U/mL e obtida na presença de 0,025 g de glicose.

No caso da xilanase, foi observada, para feno de Tifton e forragem de milho, atividade máxima em 48 horas, com 0,025 g de glicose no meio de cultivo. Foram obtidos valores de 8,4 e 7,6 U/mL, respectivamente. Os picos da enzima para casquinha de soja e capim Marandu ocorreram com 96 e 72 horas de cultivo, sem e com 0,075 g de glicose no meio, com atividade de 3,7 e 7,9 U/mL, respectivamente.

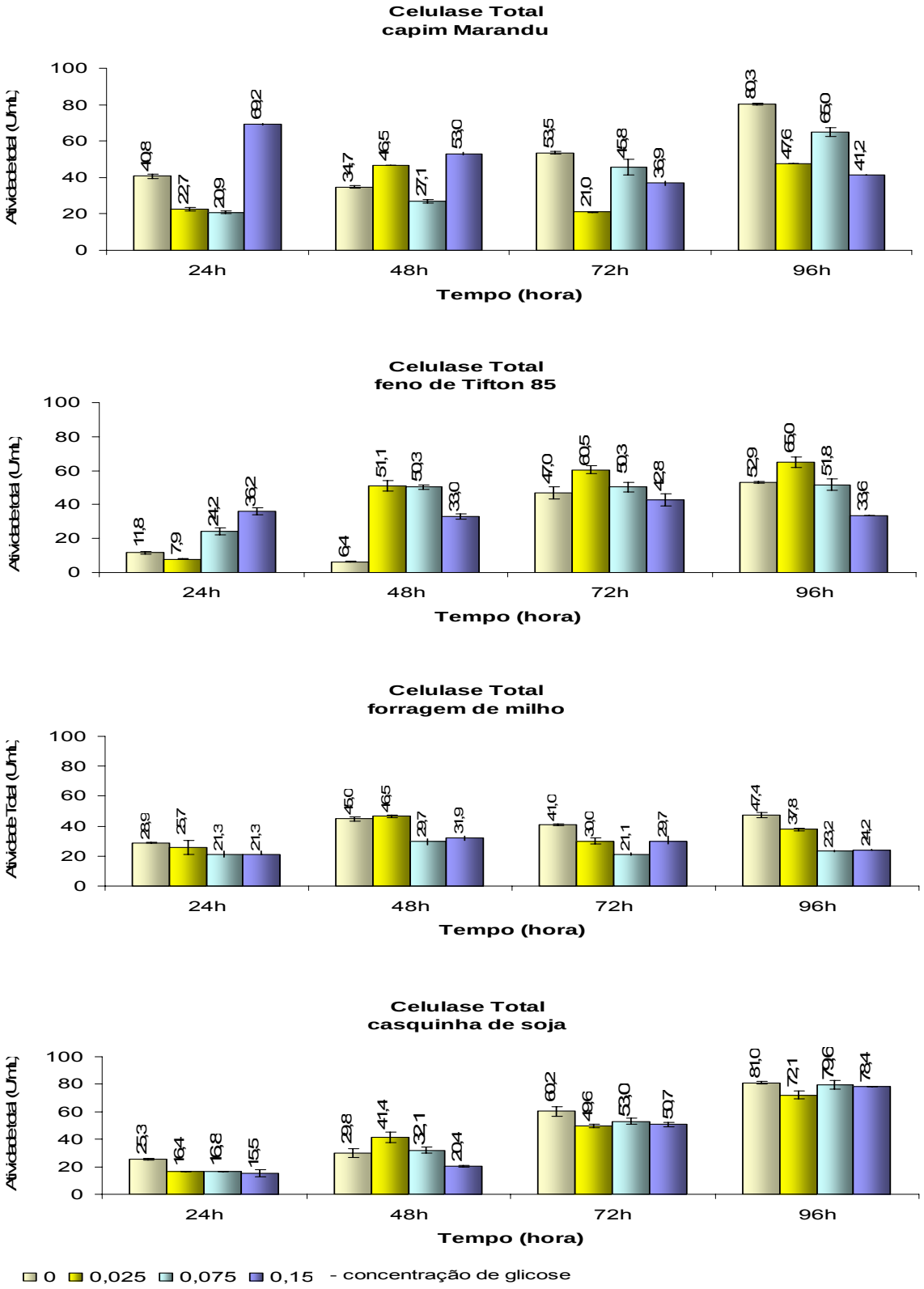

FIGURA 1 - Atividade de celulase total, em tampão fosfato dissódico, pH 5,5, nos meios de indução com diferentes concentrações de glicose, em quatro períodos de cultivo

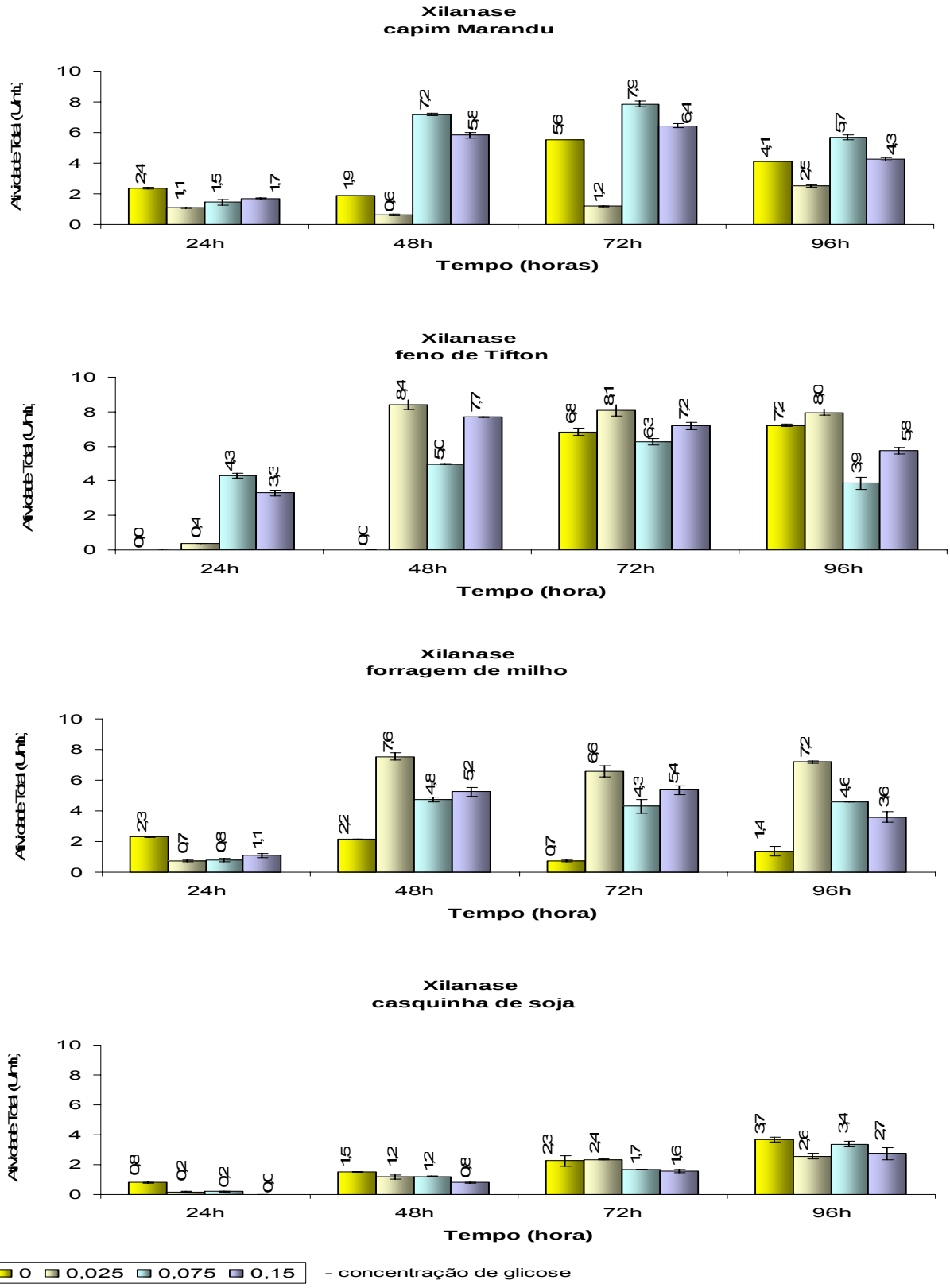

FIGURA 2 - Atividade de xilanase, em tampão fosfato dissódico, pH 5,5, nos meios de indução com diferentes concentrações de glicose, em quatro períodos de cultivo

A quantidade em excesso de glicose ou outra fonte de carbono facilmente fermentável pode inibir a produção de enzimas hidrolíticas por alguns microrganismos (GIESE, 2003). Repressão catabólica em fungos filamentosos é um evento muito discutido na literatura, principalmente quando estes organismos crescem na presença do monossacarídeo facilmente metabolizável.

Entretanto, DEL REY et al. (1979) verificaram que a síntese de β-glucanases de *Trichoderma viride* não foi diminuída na presença de glicose. Na presença do monossacarídeo, as enzimas são produzidas durante o crescimento do microrganismo. Segundo o autor, as β-glucanases devem participar do processo de formação da parede celular, pois há aumento da atividade específica das enzimas durante o crescimento exponencial do microrganismo.

Atividade de β-glucanases (β-1,3 e 1,6) de *Sclerotium glucanicum* foi reprimida na presença de maior quantidade de glicose ou xilose no meio de cultura (RAPP, 1989). Resultados semelhantes foram demonstrados para β-1,3-glucanases de isolados de *Trichoderma harzianum* (NORONHA et al., 2000). Segundo RAPP (1989), a síntese de β-glucanases por determinados microrganismos é regulada por repressão catabólica, ou seja, a glicose deve reprimir a expressão de genes que codificam enzimas que estão envolvidas no catabolismo de outras fontes de carbono.

Estudo realizado por LEMOS et al. (2002) com *Aspergillus awamori*, cultivado em bagaço de cana, mostrou repressão gradual da atividade de endo-xilanase na presença de concentrações crescentes de glicose e xilose (1, 2, 4, 6 e 8 g do carboidrato/4 g de bagaço de cana).

SOUZA et al. (2001) verificaram que 1% de açúcares metabolizáveis, como glicose, xilose, frutose, maltose, celobiose e lactose, promoveu repressão sobre xilanase de *Aspergillus tamarii*, em meios de cultivos com bagaço de cana de açúcar e sabugo de milho. Na presença de farelo de trigo, atividade da enzima foi detectada com adição de até 10% de glicose no meio.

Resultados semelhantes aos encontrados neste trabalho foram descritos por DE PAULA et al. (1999). Esses autores verificaram repressão de celulases de *H. grisea* em meio com glicose, entretanto quando o fungo foi cultivado em substratos lignocelulósicos a produção da enzima foi altamente estimulada.

3.2 Caracterização bioquímica

3.2.1 Temperatura ótima

A influência da temperatura sobre a atividade da celulase, xilanase e β-glicosidase está demonstrada na Figura 3. Este experimento foi realizado para avaliar se as enzimas produzidas mantêm atividade na faixa de temperatura do rúmen (39-42ºC). Verificou-se que a temperatura ótima da celulase produzida no meio com capim Marandu e casquinha de soja foi de 40ºC, com feno de Tifton e forragem de milho foi de 50ºC. A temperatura ótima para atividade da xilanase foi de 60°C nos meios com capim Marandu e casquinha de soja e de 50°C para feno de Tifton e forragem de milho. A atividade de β-glicosidase produzida foi maior na temperatura de 60°C em feno de Tifton e casquinha de soja, entre 50 e 60°C para forragem de milho e de 50°C para o capim Marandu. A variação da temperatura ótima nos diferentes substratos pode estar relacionada com a produção de isoenzimas diferentes, não caracterizadas neste trabalho. Por exemplo, a xilanase produzida em feno de Tifton apresentou temperatura ótima de 50ºC, enquanto que aquela produzida em capim Marandu foi de 60ºC.

Segundo MAHESHWARI et al. (2000), maior atividade de endoglucanases e exoglucanases de fungos termofílicos foi observada em temperatura entre 55 e 80º C e de 50 a 75 ºC, respectivamente. Para β-1,4-exoglucanases e β-1,4-endoglucanases de *Humicola insolens*, a temperatura ótima foi de 50º, permanecendo estáveis a 65ºC, valores semelhantes ao verificado para *Thermoascus aurantiacus* (MAHESHWARI et al., 2000).

YOSHIOKA et al. (1982) verificaram que CMCase de *H. grisea* var. *thermoidea* YH-78 apresentou maior atividade a 50 ºC. Os pesquisadores LOWE et al. (1987) e EMTIAZI et al. (2000), em trabalhos realizados com *Cellulomonas* sp e *Neocallimastix* sp, respectivamente, registraram atividade ótima de celulase a 45ºC.

LUCENA-NETO et al. (2004), trabalhando com xilanase de *H. grisea*, observaram maior atividade enzimática entre 55 e 60ºC. CARVALHO (2003) verificou que xilanase do fungo *H. grisea* foi mais ativa na faixa de 60 a 75ºC, com valor máximo de atividade a 65ºC, semelhante ao verificado para *H. lanunginosa*

(KITPREECHAVANICH et al., 1984), *H. insolens* (DUSTERHOFT et al., 1997) e para xilanase do *H. grisea* (MONTI et al., 1991).

Pesquisas com *H. grisea, H. lanunginosa e H. insolens* mostraram atividade ótima de β-glicosidase entre 50 e 60º C (MAHESHWARI et al., 2000), resultados similares aos obtidos por FILHO et al. (1996), com *H. grisea* var. *thermoidea.* LIN et al. (1999) observaram que β-glicosidase de *Thermomyces lanuginosus*-SSBP apresentou temperatura ótima de 65°C.

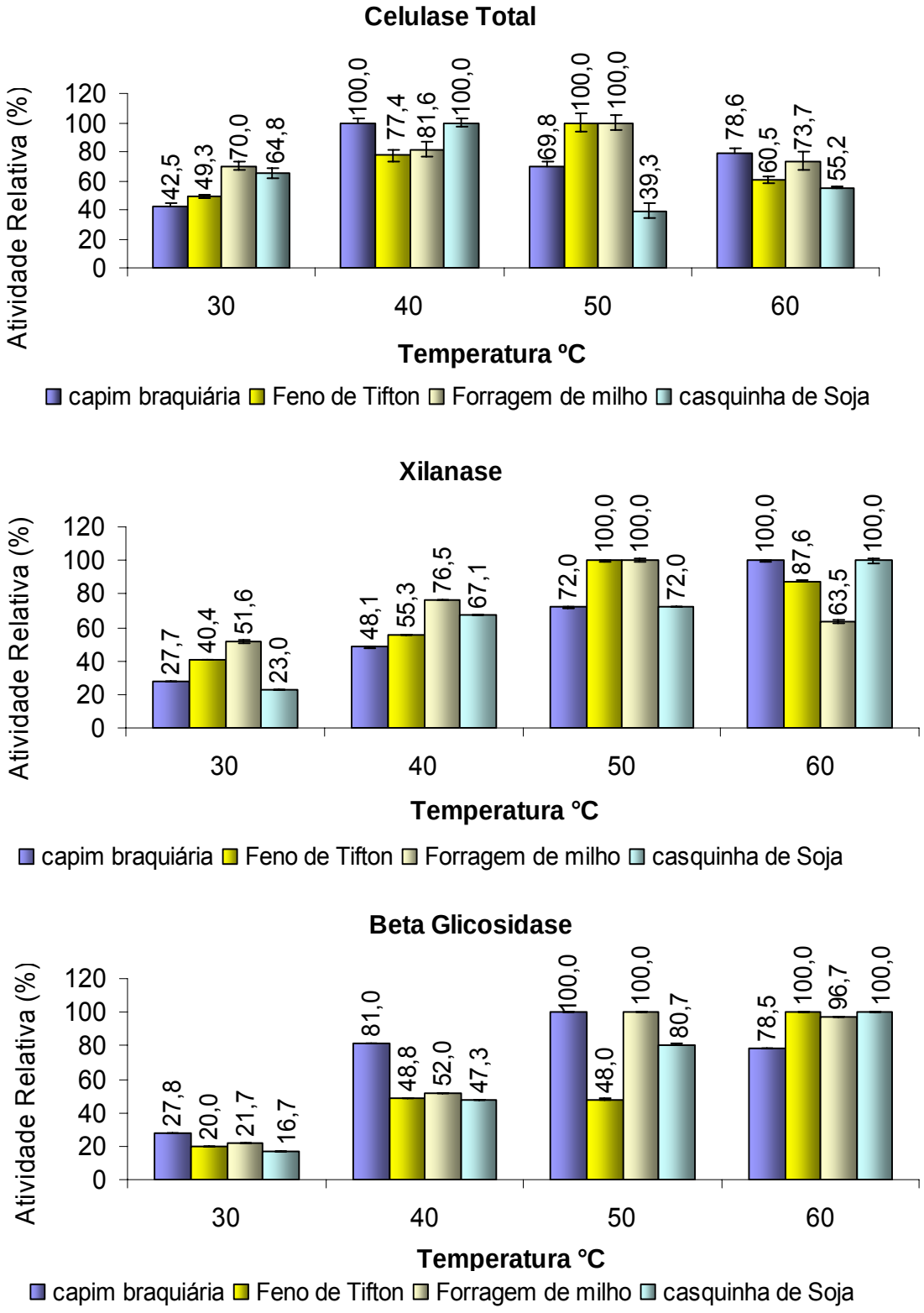

FIGURA 3 - Temperatura ótima das enzimas produzidas em 96 horas de cultivo, em meios de indução sem glicose

3.2.2 pH ótimo

Este experimento foi realizado para avaliar se as enzimas produzidas mantem atividade numa faixa de pH compatível com as condições do rúmen (6,0-7,0). Os resultados da influência do pH sobre a atividade das enzimas celulase, xilanase e β-glicosidase estão demonstrados na Figura 4. Foi observado que a celulase produzida no meio com capim Marandu apresentou atividade ótima em pH 5,5. Em casquinha de soja, feno de Tifton e forragem de milho, a enzima exibiu maior atividade em pH 6,0. Xilanase produzida, nas quatro fontes de carbono, apresentou maior atividade em pH 6,0. Em relação a β-glicosidase, a atividade enzimática foi maior em pH 5,5, no meio contendo feno de Tifton. Para forragem de milho e casquinha de soja, a enzima produzida apresentou maior atividade em pH 6,5. Quanto ao capim Marandu, a atividade da enzima foi máxima na faixa de pH de 5,5 a 6,5.

O pH ótimo de celulases, xilanases e β-glicosidase é também amplamente discutido na literatura e depende do microrganismo produtor. Segundo MAHESHWARI et al. (2000), a atividade ótima de endo e exoglucanases de fungos termofílicos está entre 5,0 e 6,0. SILVA et al. (2005) verificaram valor ótimo de 5,0 para CMCase de *T. aurantiacus*. Resultados obtidos por EMTIAZI et al. (2000) mostram que celulase de *Cellulomonas* sp foi mais ativa em pH 6,0, semelhante ao obtido por LOWE et al. (1987) para CMCase e celulase de *Neocallimastix* sp.

CARVALHO (2003) observou que xilanase de *H. grisea* teve maior atividade na faixa de pH de 5,0 a 7,5, apresentando atividade ótima em 5,5, similar aos de outras xilanases microbianas (DEKKER et al., 1976; WONG et al., 1988). As xilanases de *H. grisea* (purificada) e de *Aspergillus awamori* exibiram pH ótimo de 5,5 (KORMELINK et al., 1993; MONTI et al. 1991). Atividade ótima de xilanase de *Humicola lanunginosa* (KITPREECHAVANICH et al., 1984) e de *H. insolens* (DUSTERHOFT et al., 1997), foi detectada em pH 6,0.

FILHO (1996), trabalhando com *H. grisea* var. *thermoidea*, verificou maior atividade de β-glicosidase em pH entre 4,0 e 4,5. LIN et al. (1999), caracterizando β-glicosidase de *T. lanuginosus*-SSBP, obtiveram 6,0 como pH

ótimo. MAHESHWARI et al., (2000) observaram atividade ótima de β-glicosidase na faixa de 4,5 a 5,0, para *H. lanuginosa e H*. *insolens*, respectivamente.

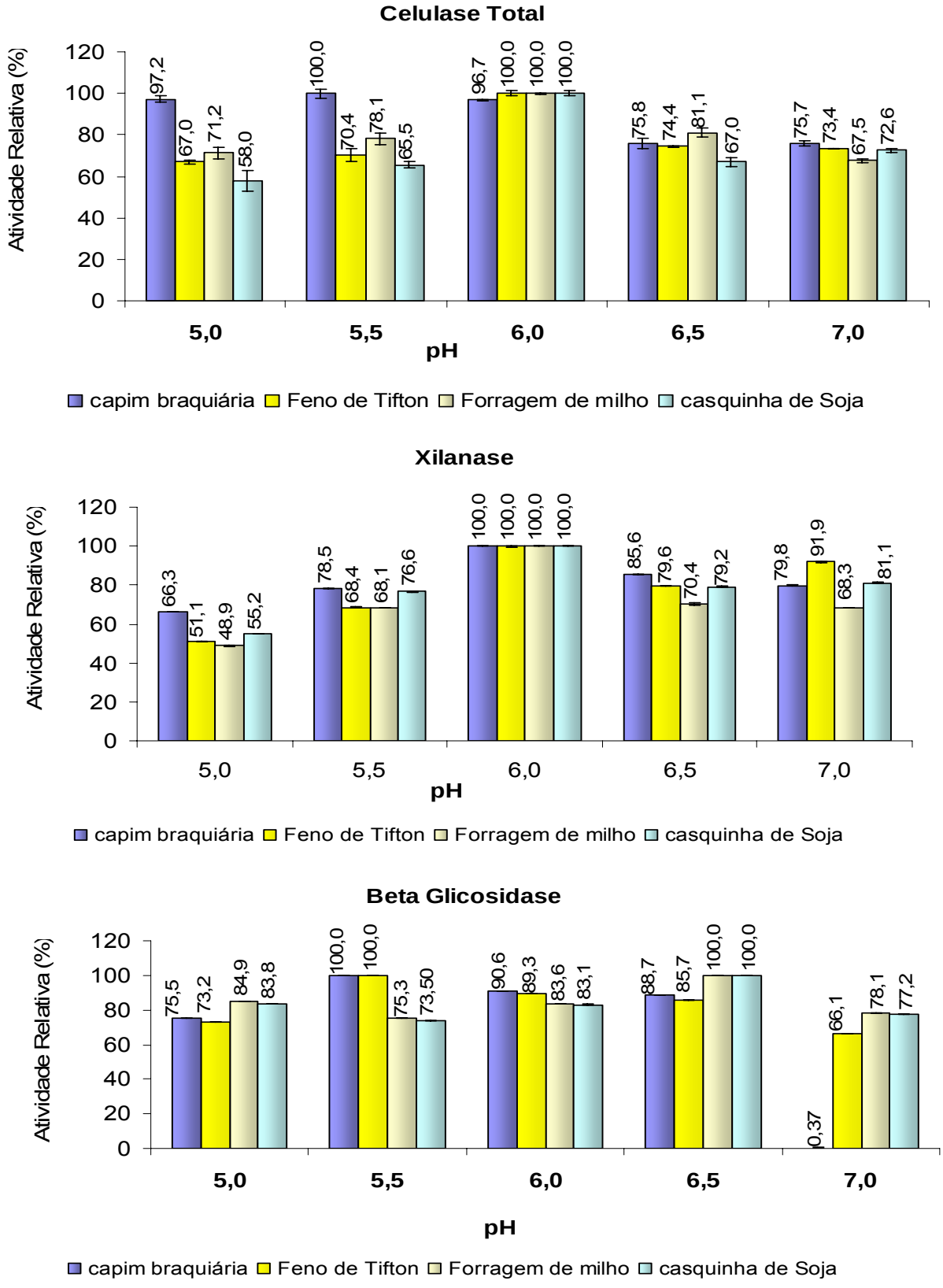

FIGURA 4 - pH ótimo das enzimas produzidas em 96 horas de cultivo, em meios de indução sem glicose

3.2.3 Termoestabilidade

A Figura 5 mostra a influência do tempo de incubação sobre atividade das enzimas produzidas em 96 h de cultivo. A termoestabilidade da celulase produzida foi avaliada em 39ºC e de xilanase e β-glicosidase a 50ºC. Observou-se que a celulase produzida nos meios contendo qualquer das fontes de carbono permaneceu estável após a incubação por 60 min. Verificou-se que a enzima é relativamente termoestável após 60 minutos, por apresentar atividade relativa maior que 70%. No caso da xilanase, a enzima produzida apresentou estabilidade térmica durante 240 minutos de incubação. A β-glicosidase, dependendo da fonte de carbono, manteve de 66,7 a 125,75% de sua atividade, durante 240 minutos. .

SIQUEIRA (2006) verificou que endoglucanase produzida por *H. grisea* apresentou redução de 36% da atividade na temperatura de 70ºC, em comparação à atividade em 50ºC. Na temperatura de 80ºC, esse valor diminuiu para 21%. MARQUES (2007) observou que celulase e xilanase produzidas por *Trichoderma harzianum* manteve aproximadamente 100% de sua atividade relativa a 40 e 45ºC durante 240 minutos.

DAMASO et al. (2002) verificaram que xilanase produzida pelo *T. lanuginosus* IOC-4545 permaneceu estável durante o intervalo de tempo de 0 - 400 minutos, a 50ºC. CARVALHO (2003) observou que xilanase produzida por *H. grisea* var. *thermoidea* se mostrou relativamente estável a 65ºC, com meia-vida de 23 minutos. A enzima foi mais estável a 60ºC, com meia-vida de 38 min, exibindo acentuada queda de atividade quando incubada a 70ºC e meia-vida de 4 min. Xilanase purificada por MONTI et al. (1991) manteve boa estabilidade em temperaturas entre 40 e 60ºC, apresentando meia-vida de 20 minutos a 60ºC.

Em estudo desenvolvido por FILHO (1996), a enzima β-glicosidase produzida por *H. grisea* var. *thermoidea* foi termoestável a 60ºC por uma hora, apresentando meia vida de 15 minutos a 65ºC. LIN et al. (1999) observaram que β-glicosidase do fungo *T. lanuginosus-SSBP* manteve sua atividade total depois de 30 minutos de incubação a 50ºC, mas foi inativa a 70ºC.

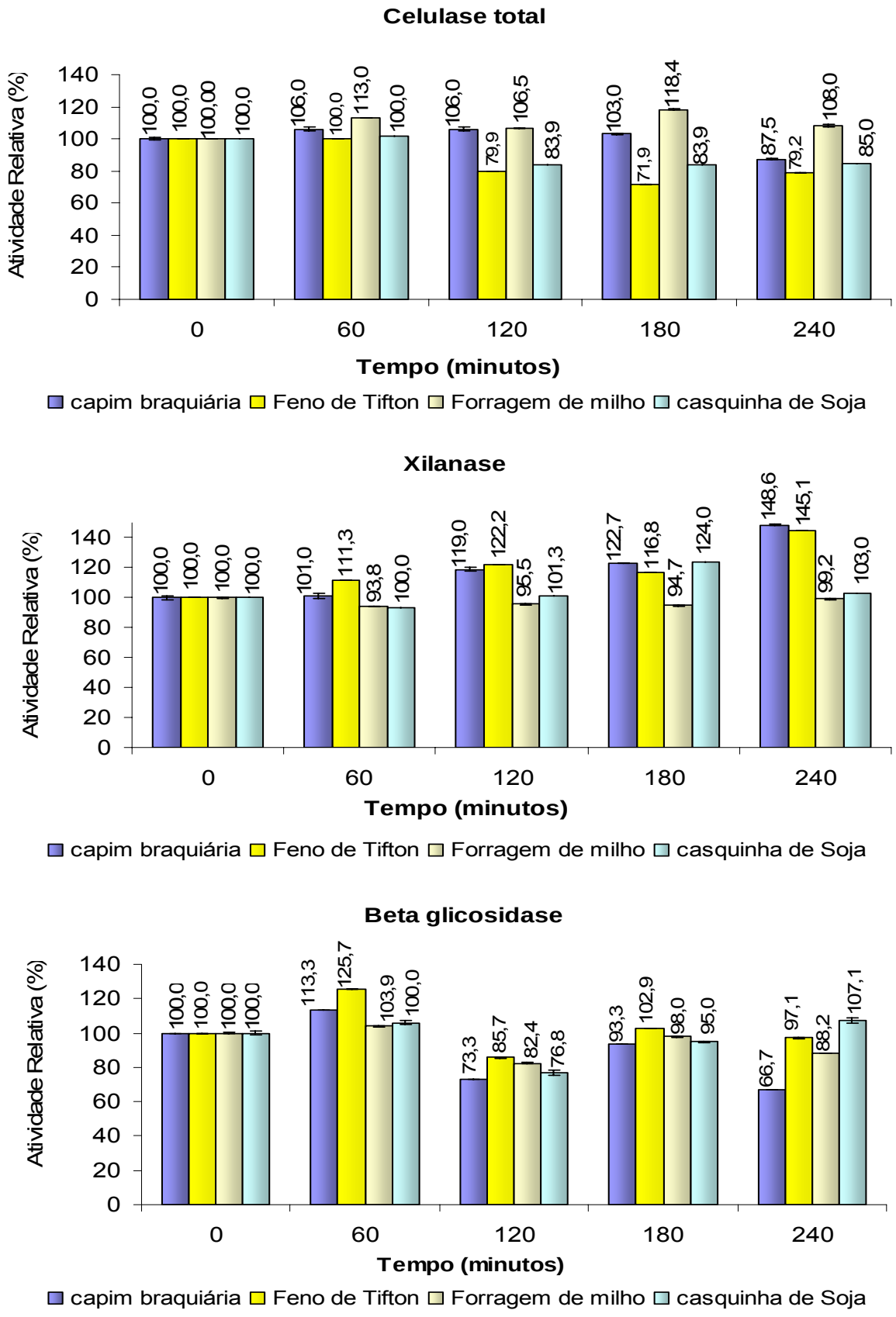

FIGURA 5 – Experimento de termoestabilidade: celulase (39ºC), xilanase e β-glicosidase (50ºC)

3.3 Atividade enzimática após concentração por ultrafiltração

Nas Figuras 6 e 7, são observados os resultados das atividades enzimáticas após submeter as soluções enzimáticas à técnica de ultrafiltração (concentração rápida de soluções). Esta técnica foi usada para obtenção de amostras enzimáticas com alta atividade, para utilização nos experimentos de digestibilidade *in vitro*.

Verificou-se alta atividade das enzimas produzidas, nos três tampões utilizados, para as quatro fontes de carbono. No entanto, as atividades das enzimas produzidas foram maiores no meio com casquinha de soja. Em relação à xilanase, maior atividade foi observada para forragem de milho.

A concentração protéica das soluções produzidas após processo de ultrafiltração foi: 0,30; 0,42; 0,38 e 0,30 mg/mL, nos meios com feno de Tifton 85, capim Marandu, forragem de milho e casquinha de soja, respectivamente.

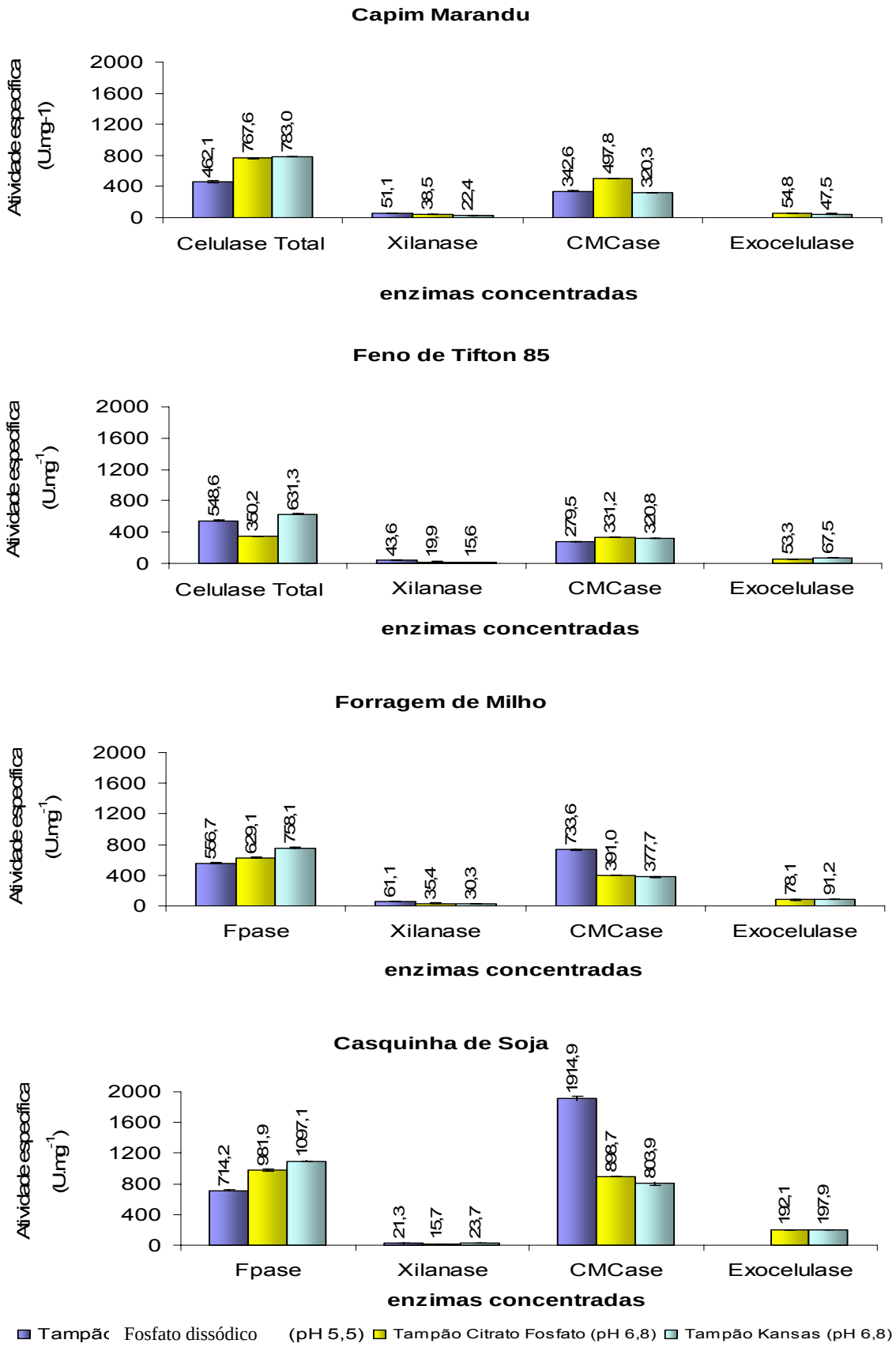

FIGURA 6 - Atividade da celulase total, xilanase, CMCase e exocelulase, após ultrafiltração das soluções enzimáticas

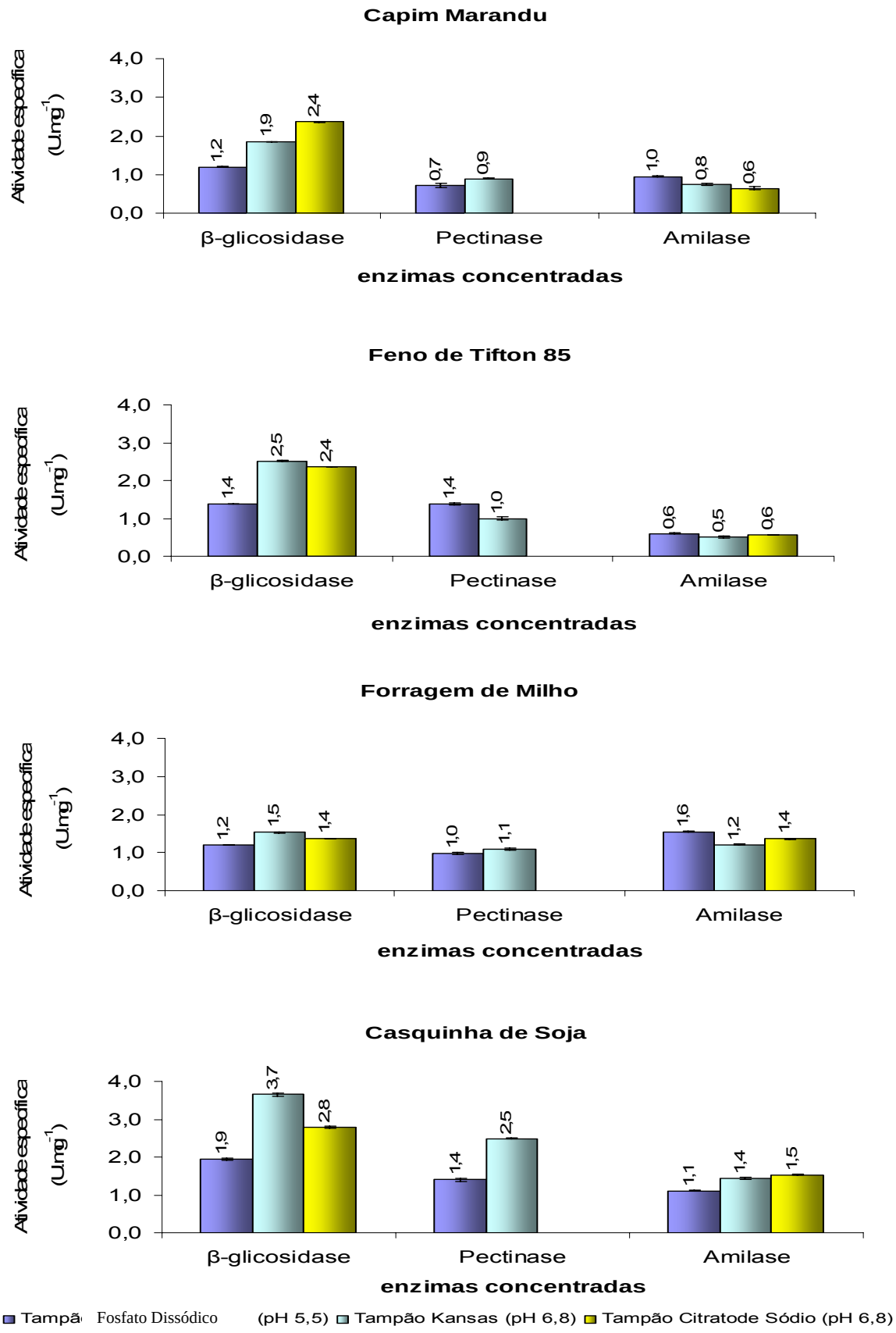

FIGURA 7 - Atividade de β-glicosidase, pectinase e amilase, após ultrafiltração das soluções enzimáticas

4 CONCLUSÃO

- O fungo *Humicola grisea* var. *thermoidea* é um produtor de enzimas fibrolíticas de interesse na alimentação de ruminantes;

- As enzimas celulase total, xilanase e β-glicosidase, produzidas pelo *H. grisea*, apresentaram máximas atividades em temperaturas e pHs de incubação específicos, que foram dependentes das fontes de carbono empregadas nos meios de cultivo. Estas podem interferir no tempo de estabilidade térmica das enzimas produzidas.

REFERÊNCIAS

1. AZEVEDO, M.O.; FELIPE, M. S. S.; ASTOLFI, S. F. & RADFORD, A. Cloning, sequencing and homologies of the *cbh*-1 (exoglucanase) gene of *Humicola grisea* var. *thermoidea*. **Jounal of General Microbiology**, v. 136, p. 2569-2576, 1990.

2. BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-glye binding. Analytical Biochemistry, v. 72: p. 248-254, 1976.

3. CARVALHO, W. R. **Produção e purificação de xilanase do fungo termofílico *Humicola grisea***. 2003. 111 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) – Departamento de Biotecnologia – Faculdade de Engenharia Química de Lorena, Lorena.

4. CASTELLANOS, O. F.; SINITSYN, A. P.; VLASENKO, E. Y. Comparative evaluation of hydrolytic efficiency toward microcrystalline cellulose of *Penicillium* and *Trichoderma* cellulases. **Bioresource Technology**, v. 52, p. 119-124, 1995.

5. CHRISTAKOPOULOS, P.; KEKOS, D.; MACRIS, B. J.; CLAEYSSENS, M.; BHAT, M. K. Purification and characterization of a less randomly acting endo-1,4-β-D glucanase from the culture filtrates of *Fusarium oxysporum*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 1995, *316*, 428–433.

6. DAMASO, M. C. T.; ANDRADE, C. M. M. C.; JÚNIOR, P. N**.** Production and properties of the cellulase-free xylanase from *Thermomyces lanuginosus* ioc-4145. **Brazilian Journal of Microbiology,** v. 33, p. 333 – 338, 2002.

7 DE PAULA, E. H.; RAMOS, L. P. AZEVEDO, M. O. The potencial of *Humicol grisea* var*. thermoidea* for bioconversion of sugar cane bagasse. **Bioresource Technology,** v**.** 68, p. 35-41, 1999.

8. DEKKER, R. F. H.; RICHARDS, G. N. HEMICELLULASES: THEIR OCCURRENCE, PURIFICATION, properties, and mode of action. **Adv. Carbohydrate. Chemistry and Biochemistry**, v. 32, p. 277-352, 1976.

9. DEL REY, F.; GARCÍA-ACHA, I.; NOMBELA, C. The regulation of β-glucanase synthesis in fugi and yeast. **Journal of General Microbiology,** v. 110, p. 83 – 89, 1979.

10. DUSTERHOFT, E. M.; LINSSEN, V. A. J. M.; VORAGEN, A. G. J.; BELDMAN, G. Purification, characterization, and properties of two xylanases from *Humicola insolens*. **Enzyme Microb. Technol.** v.20, p. 437 – 445, 1997.

11. EMTIAZI, G.; NAHVI, I.; Multi-enzyme production by *Cellulomonas* sp. grown on wheat straw. **Biomass and Bioenegry,** v. 19, p. 31-37, 2000.

12. FILHO, E. X. F. Purification and characterization of a β-glucosidase from solid state cultures of *Humicola grisea* var. *thermoidea*. **Canadian Journal Microbiology**. v. 42, p. 1-5, 1996.

13. FUWA, H. A new method for microdetermination of amylase activity by the use of amylose as the substrate. **The Journal of Biochimistry** v, 41, p.583-603, 1954.

14. GIESE, C. E. Glucanases fúngicas. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, n. 30, p. 97- 104, 2003.

15. HASPER, A. A.; DEKKERS, E.; VAN MIL, M.; VAN DE VONDERVOORT, P. J. I.; DE GRAAFF, L. H. EGLC. A new endoglucanase from *Aspergillus niger* with major activity towards xyloglucan. Applied and Environmental Microbiology, v. 68, p. 1556-1560, 2002.

16. KITPREECHAVANICH, V.; HAYASHI, M.; NAGAI, S. Purification and properties of endo-1,4-β-xylanase from *Humicola lanuginose*. Journal Ferment. Technol, v.5, p. 415 – 420, 1984.

17. KORMELINK, F. J. M.; SEARLE-VAN, LEEUWEN, M. J. F.; WORD, T. M.; VORAGEN, A. G. J. Purification and characterization of three endo-(1,4)-β-xylanases and one β-xylosidase from Aspergillus awamori. **Journal Biotechnology**, v. 27, p. 249-265, 1993.

18. LEMOS, J. L. S.; PEREIRA, J, N. Influence of some sugars on xylanase production by *Aspergillus awamori* in solid state fermentation. **Brasilian Archivies of Biology and Technology**, v. 45, n. 4, p. 431-437, 2002.

19. LIN J.; NDLOVU, L. M.; SINGH, S.; PILLAY, B. Purification and biochemical characteristics of beta-D-xylanase from a thermophilic fungus, *Thermomyces* lanuginosus – SSBP. **Biotechnology Applied Biochemistry,** v. 30, p. 73- 79, 1999.

20. LOWE, S. E.; THEODOROU, M. K.; TRINCI, A. P. J.; Cellulases and xilanase of an aerobic rumen fungus grown on wheat straw, wheat straw holocellulose, cellulose, and xylan. **Applied and Environmental Microbiology**, v.53, n. 6, p. 1216 – 1223, 1987.

21. LUCENA-NETO, A. D. S.; FILHO, E. X. F. Purification and characterization of a new xylanase from *Humicola grisea* var. *thermoidea*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, p. 86 – 90, 2004.

22. LYND, L. R.; WEIMAR, P. J.; VAN ZYL, W. H.; PRETORIUS, I. S. Microbial cellulose utilization: Fundamentals and biotechnology.**Microbiology and Molecular Biology Reviews**.v. 66, p. 506-577, 2002.

23. MAHESHWARI, R.; BHARADWAJ, G.; BHAT, K. M. Thermophilic Fungi: Their Physiology and Enzymes. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, n. 3, p. 461 – 488, 2000.

24. MARQUES, S. F. F.; **Biotecnologia Enzimática: Produção de complexo multienzimático de *Trichoderma harzianum* e sua aplicação na alimentação de frango de corte**. 2007. 79 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária – Universidade federal de Goiás, Goiânia.

25. MILLER, G. L. Use of dinitosalicylic acid reagent for the determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry,** v. 31, p. 426-428,1959.

26. MONTI, R..; TERENZI, H. F.; JORGE, J. A. Purification and properties of an extracellular xylanase from the thermophilic fungus *Humicola grisea* var. *thermoidea.* **Can. J. Microbiol,** v, 37, p. 675 – 681, 1991.

27. NORONHA, E. F.; KIPNIS, A.; JUNQUEIRA-KIPNIS, A. P.; ULHOA, C. J. Regulation of a 36-KDa β-1,3-glucanase synthesis in *Trichoderma harzianum*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 188, p. 19-22, 2000.

28. POUTANEN, K.; TENKANEN, M.; KORTHE, H.; PULS, J. Accessory enzymes involved in the hydrolysis of xylans. In: Enzymes in Biomass ConVersion, ACS Symposium Series 460; Leatham, G. F., Himmel, M. E., Eds.; American Chemical Society: Washington, D.C., 1991; p. 426–436.

29. RAPP, P. 1,3-β-glucanase, 1,6-β-glucanase and β-glucosidase activities of *Sclerotium glucanicum*: Synthesis e properties. **Journal of General Microbiology**, v. 135, p. 2847 – 2858, 1989.

30. SILVA, D. J.; QUEIROZ, A. C. **Análise de alimentos - Métodos químicos e biológicos**. 3.ed. Viçosa: UFV, 2002. cap. 10, p. 129-142.

31. SILVA, R. D.; LAGO, E. S.; MERHEB, C.W.; MACCHIONE, M. M.; PARK, Y. K.; GOMES, E. Production of xylanase and CMCase on solid state fermentation in different residues by *Thermoascus aurantiacus miehe.* **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 36, p. 235 -241, 2005.

32. SIQUEIRA, S. J. L**. Clonagem do cDNA da endoglicanase 2 de *Humicola grisea* var. *thermoidea* e sua expressão em *Saccharomyces cerevisiae***, 2006. 89 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular) - Universidade de Brasília – Instituto de Ciências Biológicas, Brasília.

33. SOUZA, D.F.; SOUZA, C. G. M.; PERALTA, R. M. Effect of easily metabolizable sugars in the production of xylanase by *Aspergillus tamarii* in solid-state fermentation. **Process Biochemistry,** v. 36, p. 835-838, 2001.

34. WOOD, T. M.; MCCRAE, S. I.; MACFARLANE, C. C. The isolation, purification and properties of the cellobiohydrolase component of *Penicillium funiculosum* cellulase. **Biochemistry Journa**l, v. 189, p. 51-65, 1980.

35. WONG, K. K. Y.; TAN, L. U. L.; SADDLER, J. N. Multiplicity of β-1,4-Xylanase in microorganisms: function and applications. **Microbiol. Rev**. v. 52, p. 305-317, 1988.

36. YOSHIOKA, H.; ANRAKU, S.I, HAYASHIDA, S. Production and purification of a novel type of CMCase from *Humicola grisea* var. *thermoidea* YH-78**. Agricultural Biologic Chemistry**, v. 46, p. 75 – 82, 1982.

CAPÍTULO 3 POTENCIAL DE ENZIMAS FIBROLÍTICAS PRODUZIDAS POR *Humicola grisea* var. *thermoidea* SOBRE A DIGESTIBILIDADE *IN VITRO* DA MATÉRIA SECA DO CAPIM MARANDU, CASQUINHA DE SOJA, FENO DE TIFTON 85 E FORRAGEM DE MILHO

RESUMO

Para avaliar o potencial de enzimas fibrolíticas, produzidas por *H. grisea*, sobre a digestibilidade verdadeira *in vitro* do capim Marandu, casquinha de soja, feno de Tifton 85 e forragem de milho, 2,5; 5,0 e 10 mL das soluções de enzimas foram aplicados, por aspersão, em 17 g dos seus respectivos substratos, moídos em moinho tipo Willey provido de peneira com malha de 1 mm de diâmetro. Posteriormente, os substratos ficaram em contato com as enzimas por 2 e 24 h (tempo de reação enzima-substrato), antes de serem colocados nos jarros de vidro da Incubadora TE -150 (TECNAL). A digestibilidade *in vitro* da matéria seca (MS) foi avaliada em líquido ruminal tamponado, durante o período de 12, 24, 48 e 96 h, usando a metodologia ANKOM, modificada. Para cada substrato, foram incubados 34 sacos (4 níveis x 4 períodos x 2 repetições x 1 branco x 1 testemunha). Os dados da digestibilidade da MS foram submetidos à análise de variância (ANOVA – Split Plot) pelo procedimento GLM do SAS. As soluções enzimáticas, nos níveis de enzimas, em relação ao tratamento controle, aumentaram a digestibilidade da MS dos quatro substratos, nos tempos de reação enzima-substrato e período de incubação no rúmen. Este estudo mostrou que enzimas fibrolíticas exógenas produzidas por *H. grisea* tem potencial para uso como aditivos em dietas de ruminantes.

Palavras – chave: ANKOM, forragens, fungo termofílico, resíduo agroindustrial, soluções enzimáticas

POTENCIAL OF FIBROLYTIC ENZYMES PRODUCED BY *Humicola grisea* var. *thermoidea* ON THE DIGESTIBILITY *IN VITRO* OF DRY MATTER OF MARANDU GRASS, SOYBEAN HULLS, TIFTON 85 HAY, AND CORN FORAGE

ABSTRACT

To evaluate the potential effects of fibrolytic enzymes produced by *H. grisea* on the *in vitro* true digestibility of Marandu grass, soybean hulls, Tifton 85 hay, and corn forage, 2.5, 5.0, and 1.0 mL of each solution of enzymes were sprinkled on 17 g of their respective substrates, ground in Willey mill type, provided with a sieve mesh of 1 mm in diameter. Subsequently, substrates and enzymes were kept in contact for 2 and 24 hours (enzyme-substrate reaction time), before being placed in glass jars of Incubator TE -150 (TECNAL). The *in vitro* digestibility of dry matter (DM) was evaluated in a buffered rumen liquid for periods of 12, 24, 48, and 96 h, using ANKOM methodology. For each substrate, 34 bags were incubated (4 levels x 4 periods x 2 replications x 1 blank x 1 control). Data for digestibility of DM were subjected to analysis of variance (ANOVA - Split Plot) by the GLM procedure of SAS. When compared to the control treatments, solutions of enzymes at the respective enzymes levels, increased digestibility of DM of substrates, at the enzyme-substrate reaction time and period of incubation in the rumen. This study showed that exogenous fibrolytic enzymes produced by H. grisea has potential for use as additives in diets of ruminants.

Keyword: agroindustrial byproducts, ANKOM, forage, solutions of enzymes, thermophylic fungus

1 INTRODUÇÃO

O uso de enzimas fibrolíticas nas dietas de ruminantes tem atraído interesse, após experimentos em que respostas positivas de digestão dos alimentos e desempenho animal foram observadas (BEAUCHEMIN et al., 1995; SCHINGOETHE et al., 1999). No entanto, o modo de ação destas enzimas não tem sido claramente identificado, deste modo, a resposta à suplementação enzimática parece depender de fatores tais como atividade enzimática, dieta e estado fisiológico dos animais (BEAUCHEMIN et al., 1995).

Produtos enzimáticos atualmente utilizados na alimentação animal são misturas de enzimas com características diferentes (VAHJEN E SIMON, 1999). As propriedades bioquímicas dessas enzimas podem ditar a natureza das respostas, mas são muitas vezes negligenciadas ou mal definidas antes de serem usadas (McALLISTER et al., 2001). É ainda incerto que a atividade enzimática favorece a taxa e extensão de degradação no rúmen. A correta caracterização enzimática deve, portanto, ser o primeiro passo para a seleção de uma solução enzimática. No entanto, as atividades enzimáticas são geralmente determinadas com base na liberação de produtos da hidrólise de substratos padrões, que não se assemelham aos substratos naturais. Assim, a determinação da capacidade hidrolítica de enzimas sobre substratos naturais é também necessário (COLOMBATTO et al., 2003).

Finalmente, os produtos enzimáticos devem ser avaliados na presença do líquido ruminal. Devido à impossibilidade de testar todas as enzimas *in vivo*, sistemas *in vitro* são alternativas adequadas para a identificação de enzimas mais promissoras (COLOMBATTO et al., 2003).

O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial de enzimas fibrolíticas, produzidas por *H. grisea*, sobre a digestibilidade verdadeira *in vitro* da matéria seca (MS) do capim Marandu, casquinha de soja, feno de Tifton 85 e forragem de milho.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Local e período experimental

O experimento foi realizado nos Laboratórios de Enzimologia e de Fisiologia da Digestão do Instituto de Ciências Biológicas/ICB, no Laboratório de Nutrição Animal/EV/UFG, localizados no município de Goiânia – GO, e no Laboratório de Nutrição Animal, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FAMEZ), da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, município de Campo Grande - MS.

O período experimental foi de julho de 2007 a agosto de 2008.

2.2 Substratos utilizados no experimento

Os substratos utilizados no experimento foram: capim Marandu, milho (planta inteira), casquinha de soja e feno de Tifton 85, sendo os dois últimos comerciais. A composição química dos substratos tratados é apresentada no Quadro 1.

QUADRO 1 – Composição química dos susbtratos utilizados no experimento

Substrato	Composição química na base seca (%)		
	MS	PB	FDN
Capim Marandu	40,3	3,2	78,0
Casquinha de soja	92,6	8,7	71,0
Feno de Tifton 85	89,3	7,0	69,6
Forragem de Milho	34,6	7,9	49,1

A análise química dos substratos foi determinada conforme descrito em SILVA & QUEIROZ (2002).

2.3 Tratamentos dos substratos com enzimas fibrolíticas

Os substratos foram tratados com 2,5, 5,0 e 10 mL de amostra enzimática. Os volumes de 2,5 e 5,0 foram completados para 10 mL com água esterilizada. Como controle, utilizou-se 10 mL de água. A atividade de cada enzima está representada no Quadro 2.

QUADRO 2 – Atividade enzimática total das amostras de enzimas aplicadas aos respectivos substratos

Substrato	Atividade enzimática (U/mL)				
	Celulase Total	CMCase	Exocelulase	Xilanase	B-glicosidase
Capim Marandu	330,09	179,34	26,60	9,41	0,78
Casquinha de Soja	207,41	202,6	49,89	4,47	0,69
Feno de Tifton	189,38	128,33	27,02	4,70	0,76
Forragem de milho	288,09	143,53	34,66	11,53	0,45

As amostras enzimáticas forram aspergidas, de forma uniforme, em 17 g dos respectivos substratos, moídos em peneira com crivos de 1 mm. Em seguida, os substratos tratados foram incubados a temperatura ambiente por duas e 24 horas, antes de serem colocados nos jarros da incubadora TE-150 (TECNAL). Esse tempo corresponde ao tempo de reação enzima-substrato.

2.4 Digestibilidade verdadeira *in vitro* da matéria seca (DVIVMS)

Para avaliar a digestibilidade verdadeira *in vitro* da MS dos quatro substratos, foi utilizada a técnica adaptada ao rúmen artificial, desenvolvida pela ANKOM (03/05).

2.4.1 Preparação dos sacos de filtro F57 e dos substratos

Os sacos de filtro F57 (filtro-náilon), tecnologia ANKOM, porosidade de 25 microns, com dimensões de 5,0 cm x 5,5 cm, foram lavados com acetona por

três a cinco minutos. Após o escoamento do produto, foram colocados em estufa com circulação forçada de ar a 55ºC por dois minutos e posteriormente em estufa a 105ºC, durante a noite. A lavagem com acetona remove um surfactante que pode inibir a digestão microbiana.

Após serem colocados em dessecador por 40 minutos e marcados com lápis permanente, os sacos tiveram seu peso registrado (W1). Em cada saco, foram adicionados 0,5 g dos substratos tratados com as soluções enzimáticas (W2). Posteriormente, 34 sacos (32 amostras, um branco e uma testemunha) foram selados e acondicionados nos jarros de vidro (4) da incubadora TE-150 (TECNAL). O branco (bolsa lacrada vazia) levará ao fator de correção (F). Os tratamentos foram feitos em duplicata.

2.4.2 Preparação das soluções tampões

Inicialmente, as soluções tampões A (10 g de KH_2PO_4; 0,5 g de $MgSO_4.7$ H2O; 0, 5 g de NaCl; 0,1 g de $CaCl_2.H_2O$ e 0,5 g de uréia, em 1L de água destilada) e B (15 g de Na_2CO_3 e 1 g de $Na_2S_9H_2O$, para 1L de água destilada) foram pré-aquecidas (39ºC). Posteriormente, foram misturados 266 mL da solução B a 1330 mL da solução A (1:5). A exata quantidade de A em relação a B foi ajustada para obter pH final de 6,8 a 39ºC. Aproximadamente 1600 mL da solução resultante (tampão Kansas) foram adicionados a cada jarro, contendo os sacos (substrato tratado, branco e testemunha).

Os jarros de digestão foram colocados na incubadora, que foi aquecida a temperatura de 39ºC, 20 a 30 minutos antes da incubação do líquido ruminal e infusão de CO_2. Nesse tempo efetuou-se a coleta e preparo do líquido ruminal.

2.4.3 Coleta, preparação do líquido ruminal e incubação

Antes da coleta do líquido ruminal, garrafa térmica, funil, provetas, recipientes de coletas e liquidificador foram aquecidos com água a 39ºC.

O líquido ruminal foi coletado às 18h de dois novilhos mestiços (pardo suíço x Jersey e Jersey x girolando), com peso médio de 370 e 327 kg, respectivamente, providos de cânula no rúmen.

Os animais, mantidos em piquetes, foram adaptados a cada dieta, por período de 14 dias, antes da coleta do líquido e tiveram livre acesso à água e sal mineral.

As dietas (base na MS), fornecidas pela manhã, foram:

A - 5 kg de feno de Tifton e 2 kg de casquinha de soja;

B - 5 kg de feno de Tifton e 2 kg de capim Marandu;

C - 5 kg de feno de Tifton e 2 kg de silagem de milho;

D - 7 kg de feno de Tifton 85.

Cerca de 2000 mL de líquido foram coletados manualmente, com retirada de diferentes locais, e colocados em garrafa térmica aquecida. O material foi enviado logo em seguida ao laboratório e adicionado, com infusão de CO_2, no liquidificador (aquecido). O líquido ruminal foi misturado à velocidade alta durante 30 segundos. A ação da mistura serve para desalojar os microrganismos que se prendem nas fibras da massa do rúmen, assegurando população microbiana adequada para análise *in vitro*. Após a mistura, o líquido foi filtrado em tecido de algodão e 400 mL foram adicionados nos jarros, contendo os sacos de incubação e solução tampão de Kansas. Todo procedimento ocorreu com infusão constante de CO_2.

As amostras foram incubadas por 12, 24, 48 e 96 horas a 39ºC, em meio anaeróbio. Até que ocorresse o tratamento das amostras com solução detergente neutra, a fim de se determinar a digestibilidade verdadeira, os sacos foram armazenados em refrigerador.

2.4.4 Determinação da fibra em detergente neutro

A determinação da fibra em detergente neutro foi realizada no Laboratório de Nutrição Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia/UFMS.

A FDN foi determinada segundo a técnica adaptada de sacos de filtro (ANKOM^{200}), com o uso do aparelho de Fibra TE-149 (TECNAL).

Os sacos de filtro, armazenados no refrigerador, foram mergulhados em água destilada fria, por 5 minutos, e submetidos à extração, 60 minutos após aquecimento de 2000 mL de solução detergente neutra (95ºC), produzida conforme mencionado em SILVA & QUEIROZ (2002). No final da extração, a solução foi escoada e 2000 mL de água destilada (70-90°C) foram adicionados no aparelho para lavagem dos sacos. Esse processo foi realizado quatro vezes durante 5 minutos.

Depois de retirado o excesso de água, os sacos foram colocados em Becker de 250 mL com acetona, por 5 minutos, e levados a estufa com circulação forçada de ar 55°C e secados completamente a 105°C, por 12 horas. Os sacos foram colocados em dessecador durante 40 minutos e tiveram seu peso registrado (W3).

A fórmula utilizada para calcular a digestibilidade verdadeira *in vitro* da MS dos substratos é mostrada abaixo (metodologia ANKOM):

- $\%\ DIVMS = \frac{100 - (W3 - (W1 \times F))}{W2} \times 100$

- W1= peso das bolsas vazias;
- W2 = peso dos substratos tratados;
- W3= peso final das bolsas após DIVMS;
- F (Fator de Correção) = peso final da bolsa em branco após degradação / W4 (peso da bolsa em branco antes da incubação).

2.5 Delineamento e análise estatística

Os dados da digestibilidade *in vitro* da MS (%) foram submetidos à análise de variância (ANOVA – Split Plot) pelo procedimento GLM do SAS (SAS, 2003).

Foram considerados no modelo os efeitos do tempo de reação enzima-substrato (2 e 24 h), tipo de substrato (capim Marandu, forragem de milho, casquinha de soja e feno de Tifiton 85), níveis de enzimas (0; 2,5; 5,0 e 10 mL) e período de incubação no rúmen (12, 24, 48 e 96 horas).

Para testar os efeitos do tempo de reação, tipo de substrato e níveis e as suas respectivas interações, adotou-se o erro (a) definido por rúmen (tempo de reação*substrato*enzima) e para o período no rúmen com as respectivas interações, foi adotado o erro (b), gerado pelo modelo.

Os resultados foram organizados, usando as médias ajustadas por mínimos quadrados (LSMEANS).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Digestibilidade verdadeira *in vitro* da matéria seca (DVIVMS)

Os resultados da digestibilidade verdadeira *in vitro* da matéria seca, por substrato, nos níveis de enzimas e tempo de reação enzima-substrato (E-S), estão demonstrados na Tabela 1. Verificou-se, para os tempos de reação E-S, que os níveis de enzimas, quando comparados ao tratamento controle, aumentaram a DVIVMS dos quatro substratos (P<0,05). Em relação ao capim Marandu e feno de Tifton 85, no nível de 2,5 mL, foi observada maior digestibilidade após 2 horas de reação E-S, com aumentos de 11,4 e 6,4%, em relação ao tratamento controle, respectivamente (P<0,05). Para casquinha de soja, o tempo de 24 horas de reação proporcionou maior digestibilidade da MS, obtendo aumentos de 7,5; 7,0 e 5,7%, nos níveis enzimáticos de 2,5; 5,0 e 10 mL, respectivamente (P<0,05). Em relação à forragem de milho, não houve diferença (P>0,05) entre os tempos de reação E-S (2 e 24 h).

TABELA 1 - Digestibilidade verdadeira *in vitro* da matéria seca (%), por substrato, nos níveis de enzimas e tempo de reação E-S*

Substrato[2]	Nível de enzimas[1] (mL)			
	0	2,5	5,0	10
Tempo de Reação E-S (2horas)				
Capim Marandu	66,7bC	74,3aD	74,4aC	76,3aC
Forragem de Milho	86,8bA	94,1aA	93,6aA	94,0aA
Casquinha de Soja	79,4bB	86,8aB	86,7aB	85,4aB
Feno de Tifton 85	78,2bB	83,2aC	83,5aB	85,5aB
Tempo de Reação E-S (24horas)				
Capim Marandu	65,6bC	71,7aC	70,8aC	71,9aC
Forragem de Milho	85,0bA	90,7aA	88,2aA	89, 7aA
Casquinha de Soja	83,8bA	90,1aA	89,7aA	88,6aA
Feno de Tifton 85	76,2bB	81,2aB	82,1aB	81,6aB

1 - Letras minúsculas, distintas, na linha; diferença significativa pelo teste T (P<0,05)

2 - Letras maiúsculas, distintas, na coluna; diferença significativa pelo teste T (P<0,05)

* Médias da DVIVMS de 12; 24; 48 e 96 h de incubação no rúmen

Para avaliar o efeito da aplicação de enzimas fibrolíticas no momento, algumas horas e 24 horas antes da incubação dos substratos no rúmen, sobre a digestibilidade da MS de diversos alimentos, pesquisas *in vivo e in vitro* foram

realizadas (LEWIS et al., 1996; WALLACE et al., 2001; COLOMBATTO et al., 2003, 2007). Os autores verificaram que existe pouca ou nenhuma diferença entre um maior ou menor período de reação entre enzimas e forragens (BEAUCHEMIN et al., 2003).

ADESOGAN (2005) avaliou o efeito de longos períodos de reação enzima-alimento (acima de um mês) sobre a degradabilidade da MS. Dependendo das condições de armazenamento da dieta tratada, a atividade enzimática pode diminuir ao longo do tempo, sem melhoras na degradação do alimento.

A adição de enzimas fibrolíticas promove mudanças estruturais nos alimentos antes da sua incubação no rúmen, tornando-os mais susceptíveis a hidrólise ruminal (NSEREKO et al., 2000). Segundo BEAUCHEMIN et al. (2003), existem evidências de que enzimas exógenas promovem a liberação de carboidratos solúveis e, em alguns casos, a solubilização parcial da FDN e FDA durante a fase de pré-incubação ruminal. Sua aplicação em materiais com maior teor de MS favorece a formação do complexo enzima-substrato bastante estável, que aumenta a eficiência das enzimas (BEAUCHEMIN et al., 2003). A constituição do complexo ocorre em poucas horas e essa estabilidade é mantida por várias semanas, como pode ser verificado em condições laboratoriais e em experimentos de desempenho animal (BEAUCHEMIN & BUCHANAN-SMITH, 1989; BEAUCHEMIN et al., 2003).

Os efeitos dos níveis de enzimas sobre a digestibilidade verdadeira *in vitro* da MS, por substrato e período de incubação no rúmen, nos tempos de reação E-S, são mostrados na Tabela 2. Verificou-se que os tratamentos enzimáticos aumentaram a DVIVMS dos substratos no rúmen ($P<0,05$).

A aplicação de 2,5 mL de enzimas, em relação ao tratamento controle, foi suficiente para aumentar a DVIVMS do capim Marandu, nos quatro períodos de incubação e nos tempos de reação E-S ($p<0,05$). Para os tempos de reação de 2 e 24 h, verificou-se, no nível de 2,5 mL, pico de digestibilidade em 48 e 96 h de incubação, respectivamente, com melhoras de 18,3 e 19,6%. Observou-se que em 48 h de incubação do substrato, houve diferença entre os tempos de reação, com maior digestibilidade da MS para o tempo de 2 h, nos níveis de enzimas.

Verificou-se, em 2 h de reação E-S, que 2,5 mL de enzimas melhoraram ($p<0,05$) a digestibilidade verdadeira da MS da forragem de milho, em relação ao tratamento controle, com aumentos de 8,3; 8,7; 8,0 e 9,1%, nos períodos de 12; 24; 48 e 96 h de incubação, respectivamente. Foi observado maior digestibilidade com 48 h de permanência do substrato no rúmen. Com 24 h de reação E-S, a DIVMS foi constatada no período de 96 h de incubação, obtendo aumentos de 9,2; 6,9; e 7,4%, nos níveis de 2,5; 5,0 e 10 mL de enzimas, respectivamente. Houve diferença ($p<0,05$) entre os tempos de reação E-S. Em 12 h de incubação, com 10 mL de enzimas, a digestililidade foi maior para 2h de reação E-S.

Em relação à casquinha de soja, para 2 h de reação E-S, o nível de 2,5 mL de enzimas aumentou a DVIVMS nos quatro períodos de incubação ($p<0,05$). Com 24 h de reação, no nível de 2,5 mL de enzimas, o pico de digestibilidade da MS foi observado em 48 h de incubação, obtendo melhoras de 23,4%. Verificou-se que em 24 e 48 h de incubação ruminal, nos três níveis enzimáticos, a digestibilidade foi maior com 24 h de reação E-S ($p<0,05$).

Para o feno de Tifton 85, em 2 e 24 h de reação E-S, no período de 12 h, a DVIVMS foi aumentada com adição de 10 mL de enzimas, em 9,2 e 8,5%, respectivamente. Quando o substrato permaneceu por 96 h no rúmen, houve aumento da digestibilidade nos níveis de 2,5; 5,0 e 10 mL de enzimas, para os dois tempos de reação E-S.

Em 24 h de reação E-S, os níveis enzimáticos 2,5; 5,0 e 10 mL melhoraram a digestibilidade em 9,9; 11,7 e 8,8%, respectivamente, para 24 h de incubação no rúmen. Entre os tempos de reação E-S, adicionando 10 mL de enzimas, obteve-se maior DIVMS em 2 h de reação E-S ($p<0,05$), no período de 24 h de incubação no rúmen.

TABELA 2. Efeito dos tratamentos enzimáticos sobre a DVIVMS, por substrato e período de incubação no rúmen, no tempo de reação E-S

Substrato e Nível de enzimas[2]	Período de incubação no rúmen (h) [1]			
	12	24	48	96
	Tempo de reação E-S - 2 h[3]			
CM controle	60,6 b[1]B[2]**a**[3]	63,6 bB**a**	71,3 aB**a**	71,4 aB**a**
CM* - 2,5	66,8 bA**a**	70,8bA**a**	79,0 aA**a**	80,6 aA**a**
CM - 5,0	63,7 cA**a**	70,0 bA**a**	77,0 aAB**a**	78,7 aA**a**
CM – 10	70,0 bA**a**	72,2 bA**a**	79,4 aA**a**	83,6 aA**a**
FM* controle	83,1bB**a**	85,2 abB**a**	88,5 aB**a**	90,2 aB**a**
FM - 2,5	90,0 bA**a**	92,6 bA**a**	95,6 aA**a**	98,4 aA**a**
FM - 5,0	89,0 bA **a**	93,2 abA**a**	96,3 aA**a**	96,1 aAB**a**
FM – 10	91,9 aA**a**	92,3 aA**a**	94,0 aAB**a**	97,4 aA**a**
CS* controle	73,2 cB**a**	72,8 cB**b**	80,2 bB**b**	91,5 aB**a**
CS - 2,5	79,3 cA**a**	80,5 cA**b**	88,9 bA**b**	98,7 aA**a**
CS - 5,0	79,3 cA**a**	80,0 cA**b**	90,4 bA**a**	97,2 aAB**a**
CS – 10	77,2 cA**a**	79,0 cA**b**	87,5 bA**a**	97,7 aA**a**
FT* controle	72,0bB**a**	78,4 aB**a**	79,8 aA**a**	82,6 aB**a**
FT - 2,5	75,0 cAB**a**	81,8 bB**a**	83,8 bA**a**	92,1 aA**a**
FT - 5,0	77,4 bAB**a**	82,8 bB**a**	84,6 abA**a**	89,1 aA**a**
FT – 10	78,6 bA**a**	90,0 bB**a**	84,5 abA**a**	88,9 aA**a**
	Tempo de reação E-S - 24 h			
CM controle	62,4 b[1]B[2]**a**[3]	61,4 bB**a**	64,5 bB**b**	74,1 aB**a**
CM - 2,5	67,8 bA**a**	67,0 bA**a**	70,9 bA**b**	81,12 a A**a**
CM - 5,0	66,7bA**a**	66,3 bA**a**	70,2 bAB**b**	80,07 a A**a**
CM – 10	67,5 bA**a**	68,0 bA**a**	70,7 bA**b**	81,4 a A**a**
FM controle	83,2 aA**a**	82,9 aA**a**	87,6 aA**a**	86,1 aB**a**
FM - 2,5	87,9 bA**a**	88,8 bA**a**	92,2 abA**a**	94,0 aA**a**
FM - 5,0	83,6 bA**a**	87,5 abA**a**	90,0 abA**a**	92,0aA**a**
FM – 10	85,3 bA**b**	87,6 abA**a**	93,3 aA**a**	92,5 aA**a**
CS controle	69,6 cB**a**	84,1 bA**a**	89,1 abB**a**	92,5 aA**a**
CS - 2,5	77,6 cA**a**	89,2 bA**a**	95,8 aA**a**	95,7 aA**a**
CS - 5,0	76,2 cAB**a**	89,4 bA**a**	95,1 abA**a**	98,2 aA**a**
CS – 10	75,6 cAB**a**	88,0 bA**a**	93,1 abAB**a**	97,7 aA**a**
FT controle	73,0 bB**a**	73,7 bB**a**	79,6 a A**a**	78,6 abB**a**
FT - 2,5	78,6 bAB**a**	81,0 bA**a**	78,0 bA**a**	87,3 aA**a**
FT - 5,0	77,8 bAB**a**	82,3 abA**a**	81,7 abA**a**	86,7 aA**a**
FT – 10	79,2 bA**a**	80,2 abA **b**	81,2 abA**a**	85,8 aA**a**

1. Na linha, letras distintas minúsculas, as médias diferem entre si pelo teste T (P<0,05);
2. Na coluna, letras distintas maiúsculas, as médias diferem entre si pelo teste T (P<0,05) – Comparação dos níveis de enzima (0; 2,5; 5,0 e 10 mL) fixando o substrato e período de incubação ruminal, no respectivo tempo de reação E-S (2 e 24);
3 Na coluna, letras distintas minúsculas, **em negrito**, as médias diferem entre si pelo teste T (P<0,05) – Comparação das médias dos tempos de reação E-S (2 e 24), fixando o substrato, nível de enzimas e período de incubação ruminal (Exemplo: substrato=Marandu, nível de enzima=0, período de incubação ruminal=12).
*CM - capim Marandu; FM - forragem de milho; CS - casquinha de soja; FT - feno de Tifton.

DEAN et al. (2005) compararam a eficácia de quatro preparações de celulase e hemicelulase sobre a digestibilidade *in vitro* de silagem de feno de Tifton-85, por dois períodos de incubação. Foi verificado que uma das soluções aumentou a degradação da MS em 6 e 48 horas de incubação no rúmen. GIRALDO et al. (2007), adicionando dois produtos enzimáticos em dieta rica em forragem (70% de feno de gramínea), observaram maior desaparecimento da MS no período de 6 e 24 h, sem nenhum efeito após 48 h de incubação.

COLOMBATTO et al. (2007) verificaram que um produto enzimático, com atividades de xilanase e celulase, aumentou linearmente a degradação da matéria orgânica de caule de alfafa, em 6; 12 e 19 h de incubação, com o aumento da adição dos níveis de enzimas. No entanto, não foi detectada diferença para os períodos de 24, 48 e 96 h.

RODRÍGUEZ et al. (2002) observaram que enzimas fibrolíticas exógenas aumentaram a digestibilidade *in situ* da MS do feno de alfafa e feno de centeio, em 3; 6; 24 e 3; 6; 12 e 24 h de incubação no rúmen, respectivamente.

COLOMBATTO et al. (2003) avaliaram o efeito de três produtos enzimáticos sobre a degradação da MS de feno de alfafa e de silagem de milho. O produto RT1184 aumentou a degradação do feno de alfafa em 6h. Após esse período, para qualquer tratamento, não se observou melhoras. Em relação à silagem de milho, RT1181 elevou a degradabilidade da MS após 6 h, com tendência de aumento em 30h. Em adição, todos os produtos aumentaram a degradação da MS em 48 h.

EUN et al. (2007) avaliaram a eficácia de cinco produtos enzimáticos sobre a degradação da MS do feno de alfafa. Com adição dos produtos P1, F1 e F2, em 12; 18 e 24 h de incubação, foram constatados aumentos de 3,3; 2,2 e 3,4%, respectivamente.

Em estudo desenvolvido por NOWAK et al. (2003), enzimas fibrolíticas (celulase e xilanase) aumentaram o desaparecimento ruminal da MS da palha de trigo após curto período de incubação, 4 e 6 h.

DAWSON & TRICARICO (1999) relataram que a ação de enzimas fibrolíticas, em estudo *in vitro*, foi maior durante as etapas iniciais de digestão. Em contraste, LEWIS et al. (1996) não verificaram efeito de enzimas fibrolíticas sobre

o desaparecimento *in situ* da MS em 8; 16 e 24h de incubação, entretanto observaram aumento após 32; 40 e 96 h.

FENG et al. (1996) constataram alto desaparecimento da MS de gramínea temperada tratada com enzimas, quando permaneceram no rúmen por 24 e 48 h. CYSNEIROS (2006, 2006a) não verificou efeito de níveis de enzimas (celulase e xilanase) sobre o desaparecimento ruminal da MS de silagens de milho e de capins tropicais, em 6; 24 e 96 h. YANG et al. (1999) verificaram que as curvas de digestibilidade ruminal *in situ* de alfa foram semelhantes para o tratamento controle e enzimático. O desaparecimento foi rápido durante as primeiras 12 h de incubação, com formação de platô próximo a 24 h.

A digestibilidade verdadeira *in vitro* da matéria seca, por substrato, tratados com diferentes níveis de enzimas, nos tempos de reação E-S, está demonstrada na Tabela 3. Verificou-se que os três níveis de enzimas aumentaram a DVIVMS dos quatro substratos, em comparação ao controle ($P<0,05$). Os aumentos obtidos com a adição de 2,5; 5,0 e 10 mL de enzimas, em relação ao tratamento controle, foram: 10,3; 10,9 e 11,9% (capim Marandu); 7,6; 5,9 e 6,9% (forragem de milho); 8,4; 8,1 e 6,6% (casquinha de soja); 6,5; 7,3 e 8,3% (feno de Tifton 85), respectivamente. Não houve diferença entre os níveis enzimáticos ($P>0,05$), constatando-se que a adição de 2,5 mL de enzimas foi suficiente para aumentar a DVIVMS. Verificou-se interação entre substrato e nível de enzimas ($P<0,05$).

TABELA 3 – Média da digestibilidade verdadeira *in vitro* da matéria seca (%), por substratos, tratados com três níveis de enzimas, nos tempos de reação E-S e períodos de incubação no rúmen

Substrato (%)[2]	Nível de enzimas (mL)[1]			
	0	2,5	5,0	10
Capim Marandu	66,2bD	73,0aD	73,4aD	74,1aD
Forragem de milho	85,9bA	92,4aA	91,0aA	91,8aA
Casquinha de Soja	81,6bB	88,5aB	88,2aB	87,0aB
Feno de Tifton 85	77,2bC	82,2aC	82,8aC	83,6aC

1.Letras minúsculas, distintas, na linha; diferença significativa pelo teste T ($P<0,05$) .

2.Letras maiúsculas, distintas, na coluna; diferença significativa pelo teste T ($P<0,05$).

EUN et al. (2007), avaliando diferentes produtos enzimáticos comerciais (polissacaridases e protease), observaram que o nível de enzimas capaz de aumentar a degradabilidade da MS de feno de alfafa foi dependente do substrato e do produto utilizado. Para a silagem de milho, verificou-se que não houve aumento na degradação da MS, para qualquer produto, independente da quantidade utilizada (0,25; 0,5; 0,75 e 1,0 mg/g de MS).

JUDKINS et al. (1988) não observaram aumento na degradação da MS de uma dieta a base de feno de alfafa e milho (10% ou 25%), suplementada com 22 e 25 g/d de uma preparação enzimática.

CYSNEIROS (2006, 2006a) não detectou diferença da aplicação de 5; 10 e 20 mg de enzimas por kg de matéria natural sobre o desaparecimento ruminal *in situ* da MS de silagem de milho e de capins tropicais. DEAN et al. (2005) verificaram maior degradação da MS de silagem de Tifton-85, quando dois produtos enzimáticos (CT e A20) foram aplicados nas doses de 178 e 29 mg/kg de matéria seca, respectivamente.

Algumas das variabilidades associadas ao uso de enzimas exógenas em dietas de ruminantes estão relacionadas à suplementação com insuficiente ou excessiva quantidade de enzimas. *In vivo*, respostas as adições de enzimas são tipicamente não lineares, o que pode ser conseqüência da super suplementação (BEAUCHEMIN et al.; 1995). Estudo realizado por KUNG et al. (2002) mostra que altas quantidades de enzimas podem ser menos efetivas do que baixas doses.

A falta de respostas à adição de pequenas quantidades de enzimas pode ser conseqüência da baixa atividade enzimática observada no produto. No entanto, a ausência de efeitos sobre a degradação da MS quando altos níveis de enzimas são incorporados nas dietas não é totalmente compreendida (KUNG et al., 2002). Fatores como nível, atividade enzimática e proporção entre enzimas (celulase e xilanase) podem afetar a digestibilidade das forragens (EUN et al., 2007a).

BEAUCHEMIN et al. (1995) observaram que enzimas, aplicadas aos alimentos de ruminantes em quantidades moderadas (4733 UI/kg de MS), romperam a estrutura superficial do alimento, antes e depois de sua ingestão. Quando fornecidas em altas taxas (12000 UI/kg de MS), o benefício foi menor

porque enzimas ligadas em excesso ao alimento podem limitar a adesão microbiana, diminuindo sua degradabilidade.

EUN et al. (2007b), aumentando o fornecimento de enzimas fibrolíticas, observaram efeito quadrático sobre a degradabilidade da MS de silagem de milho, com alta resposta em taxa moderada. Para feno de alfafa, verificaram efeito linear com aumento do nível de enzimas.

Segundo BEAUCHEMIN et al. (1998), é necessário determinar a taxa ótima de aplicação de um complexo enzimático com base no alimento a ser fornecido ao animal. A composição química diversificada das forragens e sua estrutura anatômica podem limitar a digestibilidade da parede celular. De acordo com KUNG et al. (1998), é difícil estipular a quantidade exata de enzimas a ser aplicada no alimento porque os métodos para medir a atividade enzimática não são padronizados.

4 CONCLUSÃO

- Os níveis de enzimas aumentaram a digestibilidade verdadeira *in vitro* da matéria seca dos substratos;

- A digestibilidade verdadeira *in vitro* da matéria seca aumentou com a adição dos níveis de enzimas, nos tempos de reação E-S, sendo que o nível de 2,5 mL foi suficiente para aumentar a digestibilidade.

REFERÊNCIAS

1. ADESOGAN, A.T. Improving Forage Quality and Animal Performance with Fibrolytic Enzymes. In: **Ruminant Nutrition Symposium**. Florida, 2005. p. 91-109.

2. ANKOM TECHNOLOGY – 03/05, *In vitro* true digestibility using the Daisy^{II} incubator [on line], 2007. Disponível em http://www.ankom.com. Acesso em 15 de janeiro de 2006.

3. ANKOM TECHNOLOGY METHOD, neutral detergent fiber in feeds filter bag technique (Ankom^{200}) [on line], 2007. Disponível em http://www.ankom.com. Acesso em 15 de janeiro de 2006.

4. BEAUCHEMIN, K.A.; BUCHANAN-SMITH, J.G. Effects of neutral detergent fiber concentration and supplementary long hay on chewing activities and milk production of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.72, n.9, p.2288-2300, 1989.

5. BEAUCHEMIN, K. A.; RODE, L. M.; SEWALT, V. J. H. Fibrolytic enzymes increase fiber digestibility and growth rate of steers fed dry forages. **Canadian Journal Animal Science,** v. 75, p. 641-644, 1995.

6. BEAUCHEMIN, K. A.; RODE, L. M.; W, Z. YANG.; McALLISTER, T. A. Use of feed enzymes in ruminant nutrition. In: PACIFIC NORTHWEST NUTRITION CONFERENCE, 33rd, 1998. Vancouver. **Proceedings...** Vancouver, 1998. 14 p.

7. BEAUCHEMIN, K. A.; COLOMBATTO, D.; MORGAVI, P. D.; YANG, Z. W. Use of exogenous fibrolytic enzymes to improve feed utilization by ruminants. **Journal of Animal Science,** v. 81, suppl. 2, p. 37-47, 2003.

8. COLOMBATTO, D.; MOULD, F. L., BHAT, M.K.; OWEN. Use of fibrolytic enzymes to improve the nutritive value of ruminant diets. A biochemical and in vitro rumen degradation assessment. **Animal Feed Science and Technology,** v. 107, p. 201-209, 2003.

9. COLOMBATTO, D.; MOULD, F. L.; BHAT, M.K.; OWEN, E. Influence of exogenous fibrolytic enzyme level and incubation pH on the *n vitro* ruminal fermentation of alfalfa stems. **Animal Feed Science Technology**, v. 137, p. 150-162, 2007.

10. CYSNEIROS, C. S. S.; FRANCO, G. L.; ULHOA, C. J.; DIOGO, J. M. S.; RAMOS, A. K. B. Efeito de enzimas fibrolíticas sobre a composição bromatológica de silagens de capins tropicais. **Ciência Animal Brasileira**, v. 7, n. 1, p. 1-10, 2006.

11. CYSNEIROS, C. S. S.; FRANCO, G. L.; ULHOA, C. J.; DIOGO, J. M. S.; RAMOS, A. K. B. Efeito de enzimas fibrolíticas sobre a composição química da silagem de milho. **Ciência Animal Brasileira**, v. 7, n. 4, p. 339-348, 2006a.

12. DAWSON, K. A.; TRICARICO, J. M. The use of exogenous fibrolytic enzymes in ruminants. In: Proc. Of the 15 th Annual Symposium Biotechnology in the Feed Industry. Nottingham University Press, Nottingham, UK, 303-312, 1999.

13. DEAN, D. B.; ADESOGAN, A. T.; KRUEGER, N. K.; LITTELL, R. C. Effect of fibrolytic enzymes on the fermentation characteristics, aerobic stability and digestibility of bermudagrass silage. **Journal Dairy Science**, v. 88, p. 994-1003, 2005.

14. EUN, J. S.; BEAUCHEMIN, K. A. Enhancing in vitro degradation of alfalfa hay and corn silage using feed enzymes. **Journal of Dairy Science,** v. 90, n. 6, p. 2839-2851, 2007.

15. EUN, J. S.; BEAUCHEMIN, K. A.; SCHULZE, H. Use of an in vitro fermentation bioassay to evaluate improvements in degradation of alfalfa hay due to exogenous feed enzymes, **Animal Feed Science and Technology,** v. 135, p. 315-328, 2007a.

16. EUN, J. S.; BEAUCHEMIN, K. A.; SCHULZE, H. Use of exogenous fibrolytic enzymes to enhance in vitro fermentation of alfalfa hay and corn silage, **Journal of Dairy Science,** v. 90, p. 1440-1451, 2007b.

17. FENG, P.; HUNT, C. W.; PRITCHRD, G. T.; JULIEN, W. E. Effect of enzyme preparations on in situ and in vivo additives degradation and in vivo digestive characteristics of mature cool-season grass in beef steers. **Journal of Animal Science**, v.74, n.6, p. 1349-1357, 1996.

18. GIRALDO, L. A; TEJIDO, M. L.; RANILLA, J. M.; CARRO, M. D. Effects of exogenous cellulase supplementation on microbial growth and ruminal fermentation of a high-forage diet in rusitec fermenters. **Journal Animal Science**, v. 85, p. 1962-1970, 2007.

19. JUDKINS, M. B.; STOBART, R. H. Influence of two levels of enzyme preparation on ruminal fermentation, particulate and fluid passage and cell wall digestion in wether lambs consuming either a 10% or 25% grain diet. **Journal of Animal Science,** v.66, p. 1010-1015, 1988.

20. KUNG, L. Jr.; TREACHER, R.; COHEN, M. A.; Enzyme-treated forages for lactating cows. **Journal Dairy Science**, v. 81, suppl. 1, 196 p, 1998.

21. KUNG, L. Jr. Enzymes for lactating dairy cows: News theories and applications. In: 12th Annual Florida Ruminant Nutrition Symposium, 2002, Florida. **Proceedings**… Florida: 2002. p. 29-43.

22. LEWIS, G. E.; HUNT, C. W.; SANCHEZ. Effect of direct-fed fibrolytic enzymes on the digestive characteristics of a forage-based diet fed to beef steers. **Journal of Animal Science,** v. 74, n. 12, p. 3020-3028, 1996.

23. McALLISTER, T. A.; HRISTOV, A.N.; BEAUCHEMIN, K.A. et al. Enzymes in ruminant diets. In: BEDFORD, M. R.; PARTRIDGE, G. G. **Enzymes in farm animal nutrition**. Oxon: Cab International, 2001. cap 11, p.273-298.

24. NOWAK, W.; KRUCZY`NSKA, H.; GROCHOWSKA, S. The effect of fibrolytic enzymes on dry matter, ADF and NDF ruminal disappearance and intestinal digestibility. **Czech Journal Animal Science**, v**.** 48, p. 191-196, 2003.

25. NSEREKO, V. L.; MORGAVI, D. P.; RODE, L. M.; BEAUCHEMIN, K. A.; McALLISTER, T. A. Effects of fungal enzyme preparations on hydrolysis and subsequent degradation of alfalfa hay fiber by mixed rumen microorganisms in vitro**. Animal Feed Science and Technology**, v. 88, p. 153-170, 2000.

26. RODRÍGUES, J. M. P.; GONZÁLEZ, S. S.; MENDOZA, G. D.; BÁRCENA, R.COBOS, M. A.; HERNANDEZ, A.; ORTEGA, M. E. Effect of exogenous fibrolytic enzyme on ruminal fermentation digestibility of alfalfa and rye-grass hay fed to lambs. **Journal Animal Science**, v. 80, p. 3016-3020, 2002.

27. SAS Institute Inc., System for Microsoft Windows, Release 9.1, Cary, NC, USA, 2003 - CD Room.

28. SCHINGOETHE, D. J.; STEGEMAN, G, A.; TREACHER, R. J. Response of lactating dairy cows to a cellulase and xylanase enzyme mixture applied to forage at the time of feeding. **Journal of Dairy Science**, v. 82, p.996–1003, 1999.

29. SILVA, D. J.; QUEIROZ, A. C. **Análise de alimentos - Métodos químicos e biológicos**. 3.ed. Viçosa: UFV, 2002. 235p.

30. VAHJEN, W.; SIMON, O. Biochemical characteristics of nonstarch polysaccharide hydrolyzing enzyme preparations designed as feed additives for poultry and piglet nutrition. **Archives of Animal Nutrition**, v. 52, p.1–14, 1999.

31. WALLACE, R. J.; WALLACE, S. J. A.; MCKAIN, N.; NSEREKO V. L., HARTNELL, G. F. Influence of supplementary fibrolytic enzymes on the fermentation of corn and grass silages by mixed ruminal microorganisms in vitro. **Journal Animal Science**, v. 79, p.1905-1916, 2001.

32. YANG, W. Z.; BEAUCHEMIN, K. A.; RODE, L. M. Effects of an enzyme feed additive on extent of digestion and milk production of lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 823, p. 391-403, 1999.

CAPÍTULO 4 – CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho, o fungo *Humicola grisea* var. *thermoidea* mostrou-se produtor de quatro soluções enzimáticas em diferentes meios de culturas, contendo capim Marandu, casquinha de soja, feno de Tifton 85 e forragem de milho, como fontes de carbono.

A caracterização bioquímica da celulase revelou maior atividade da enzima em temperaturas entre 40ºC e 50°C e em pH de 5,5 e 6,0. A temperatura ótima de xilanase e β-glicosidase ficou na faixa de 50 e 60°C. As enzimas exibiram pH ótimo de 6,0 e 5,5-6,5, respectivamente. A celulase produzida permaneceu estável após a incubação por 60 minutos, a 39°C. Xilanase apresentou estabilidade térmica durante 240 minutos de incubação, a 50°C. A enzima β-glicosidase manteve de 66,7 a 125,75% de sua atividade, a 50°C, durante 240 minutos.

A avaliação *in vitro* mostrou que as soluções enzimáticas aumentaram a digestibilidade verdadeira *in vitro* da MS de seus respectivos substratos, nos tempos de reação E-S.

Ficou evidente, nesta pesquisa, a importância da biotecnologia enzimática aliada ao setor de produção animal, devido à necessidade de novas alternativas que aumentem a produção de alimentos, mantendo a cadeia produtiva do agronegócio brasileiro.

Enzimas fibrolíticas produzidas por *H. grisea* tem potencial para uso nas dietas de ruminantes. No entanto, são necessárias mais pesquisas com este microrganismo, com a finalidade de entender de forma clara o modo de ação das enzimas por ele produzidas e identificar as mais promissoras para o mercado. Espera-se que a contribuição deste trabalho possa abrir novos horizontes de duas áreas aliadas: a biotecnologia enzimática e a nutrição animal.

ANEXOS

Anexo A - Coeficiente de variação, desvio padrão e média da DVIVMS dos substratos em 2 e 24 h de reação E-S (TABELA 1), página 86

Nível de enzimas	CV (%)	Desvio Padrão	Média
Tempo de reação - 2 h			
Capim Marandu			
controle	8,2	5,5	66,7
2,5	8,1	6,0	74,3
5,0	8,8	6,4	74,4
10	7,5	5,8	76,3
Forragem de Milho			
controle	3,5	3,0	86,8
2,5	4,1	3,9	94,1
5,0	3,9	3,7	93,6
10	3,3	3,1	94,0
Casquinha de Soja			
controle	10,9	8,6	79,4
2,5	9,6	8,3	86,8
5,0	9,1	7,9	86,7
10	10,3	8,8	85,4
Feno de Tifton 85			
controle	5,5	4,3	78,2
2,5	7,6	6,3	83,2
5,0	5,4	4,5	83,5
10	6,2	5,3	85,5
Tempo de reação E-S - 24 h			
Capim Marandu			
controle	8,2	5,4	65,6
2,5	8,6	6,2	71,7
5,0	8,4	6,0	70,8
10	8,2	5,9	71,9
Forragem de Milho			
controle	3,4	2,9	85,0
2,5	3,3	3,0	90,7
5,0	3,9	3,4	88,2
10	4,0	3,6	89,7
Casquinha de Soja			
controle	10,3	8,8	83,8
2,5	8,5	7,7	90,1
5,0	9,0	8,2	89,7
10	9,3	8,4	88,6
Feno de Tifton 85			
controle	5,2	4,0	76,2
2,5	4,9	4,0	81,2
5,0	5,0	4,1	82,1
10	4,1	3,3	81,6

Anexo B – Média, desvio padrão e coeficiente de variação da DVIVMS do capim Marandu (TABELA 2), página 89

Enzima	Tempo	Média	Desvio padrão	Coeficiente de variação
Tempo de reação E-S – 2 h				
controle	12	60,57	2,52	4,16
	24	63,58	2,18	3,44
	48	71,26	1,85	2,60
	96	71,40	3,71	5,19
2,5	12	66,84	1,35	2,03
	24	70,76	1,37	1,94
	48	79,03	1,38	1,75
	96	80,64	1,22	1,52
5,0	12	63,69	2,17	3,41
	24	69,96	1,37	1,95
	48	76,96	0,39	0,51
	96	78,71	2,26	2,87
10	12	69,93	2,13	3,05
	24	72,18	0,84	1,17
	48	79,45	1,91	2,40
	96	83,60	1,50	1,79
Tempo de reação E-S - 24h				
controle	12	62,38	0,66	1,05
	24	61,41	1,53	2,49
	48	64,50	1,74	2,70
	96	74,10	2,17	2,93
2,5	12	67,80	3,02	4,45
	24	67,00	0,93	1,39
	48	70,90	1,18	1,66
	96	81,12	1,79	2,21
5,0	12	66,71	0,84	1,26
	24	66,30	0,29	0,44
	48	70,21	1,61	2,29
	96	80,07	2,59	3,23
10	12	67,52	0,36	0,54
	24	68,02	1,06	1,56
	48	70,66	1,76	2,48
	96	81,36	1,16	1,43

Anexo C - Média, desvio padrão e coeficiente de variação da DVIVMS da forragem de Milho (TABELA 2), página 89

Enzima	Tempo	Média	Desvio padrão	Coeficiente de variação
Tempo de reação E-S - 2 h				
controle	12	83,14	1,67	2,01
	24	85,25	0,99	1,16
	48	88,51	1,04	1,17
	96	90,17	0,85	0,95
2,5	12	89,96	3,05	3,39
	24	92,63	2,13	2,30
	48	95,59	2,15	2,25
	96	98,35	1,70	1,73
5,0	12	88,84	1,37	1,54
	24	93,19	2,32	2,49
	48	96,30	3,12	3,23
	96	96,11	1,21	1,26
10	12	91,87	1,89	2,06
	24	92,32	3,07	3,32
	48	94,00	3,13	3,33
	96	97,40	0,95	0,98
Tempo de reação E-S - 24 h				
controle	12	83,22	0,92	1,11
	24	82,88	3,34	4,03
	48	87,58	1,80	2,06
	96	86,12	2,36	2,74
2,5	12	87,85	2,17	2,47
	24	88,80	1,41	1,60
	48	92,22	0,91	0,99
	96	93,97	0,59	0,63
5,0	12	83,57	1,37	1,64
	24	87,53	0,89	1,02
	48	89,97	0,90	1,00
	96	91,91	1,79	1,95
10	12	85,33	1,56	1,83
	24	87,57	1,19	1,36
	48	93,27	0,97	1,04
	96	92,50	0,67	0,72

Anexo D - Média, desvio padrão e coeficiente de variação da DVIVMS casquinha de soja (TABELA 2), página 89

Enzima	Tempo	Média	Desvio padrão	Coeficiente de variação
Tempo de reação E-S - 2 h				
controle	12	73,16	1,79	2,44
	24	72,79	1,04	1,43
	48	80,18	7,52	9,38
	96	91,54	2,03	2,22
2,5	12	79,25	0,77	0,97
	24	80,51	3,20	3,97
	48	88,86	3,51	3,95
	96	98,69	0,99	1,00
5,0	12	79,30	2,70	3,38
	24	79,99	3,21	4,01
	48	90,39	2,53	2,80
	96	97,15	1,44	1,48
10	12	77,17	1,76	2,28
	24	79,02	2,45	3,10
	48	87,54	5,06	5,78
	96	97,71	1,24	1,27
Tempo de reação E-S - 24 h				
controle	12	69,60	2,65	3,79
	24	84,10	0,55	0,65
	48	89,09	1,34	1,50
	96	92,50	0,72	0,78
2,5	12	77,66	0,30	0,39
	24	89,24	1,37	1,54
	48	95,84	1,29	1,34
	96	97,79	0,40	0,41
5,0	12	76,20	0,45	0,59
	24	89,35	0,99	1,11
	48	95,07	1,20	1,26
	96	98,19	0,80	0,81
10	12	75,6	0,72	0,95
	24	87,98	2,77	3,15
	48	93, 01	2,75	2,94
	96	97,67	0,39	0,40

Anexo E - Média, desvio padrão e coeficiente de variação da DVIVMS do feno de Tifton 85 (TABELA 2), página 89

Enzima	Tempo	Média	Desvio padrão	Coeficiente de variação
Tempo de reação E-S - 2h				
controle	12	72,0	2,89	3,97
	24	78,4	0,60	0,82
	48	79,8	3,42	4,28
	96	82,6	3,73	4,75
2,5	12	75,00	1,57	2,00
	24	81,8	1,58	1,95
	48	92,1	0,81	1,04
	96	82,6	1,49	1,71
5,0	12	77,40	3,10	4,02
	24	82,8	1,81	2,20
	48	84,6	0,62	0,75
	96	89,10	2,68	3,09
10	12	78,60	3,46	4,37
	24	90,0	2,62	3,26
	48	84,5	0,39	0,48
	96	88,9	1,45	1,69
Tempo de reação E-S - 24 h				
controle	12	73,0	1,73	2,41
	24	73,7	2,20	2,81
	48	79,6	1,82	2,29
	96	78,6	0,53	0,64
2,5	12	78,6	3,21	4,27
	24	81,0	2,70	3,29
	48	78,0	1,33	1,58
	96	87,3	3,66	4,01
5,0	12	77,8	1,68	2,17
	24	82,3	1,38	1,67
	48	81,7	1,16	1,37
	96	86,7	1,42	1,60
10	12	79,2	1,99	2,53
	24	80,2	3,96	4,40
	48	81,2	2,69	3,18
	96	85,8	2,08	2,34

Anexo F - Coeficiente de variação, desvio padrão e média da DVIVMS dos substratos, página 91

Nível de enzimas	CV (%)	Desvio Padrão	Média
Capim Marandu			
controle	8,11	5,37	66,2
2,5	8,37	6,12	73,0
5,0	8,49	6,09	73,4
	8,4	6,24	74,1
Forragem de Milho			
controle	3,55	3,05	85,9
2,5	4,12	3,81	92,4
5,0	4,84	4,39	90,9
10	4,22	3,87	91,8
Casquinha de Soja			
controle	10,96	8,99	81,6
2,5	9,21	8,18	88,5
5,0	9,1	8,1	88,2
10	9,97	8,7	87,0
Feno de Tifton 85			
controle	5,47	4,22	77,2
2,5	6,36	5,21	82,2
5,0	5,16	4,28	82,8
10	5,69	4,75	83,6