



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA - UESB  
CENTRO DE ENSINO PESQUISA E EXTENSÃO SOCIOAMBIENTAL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS – PPGCA

**FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO DO FARELO DE PALMA  
FORRAGEIRA: OBTENÇÃO DE ENZIMAS INDUSTRIAIS E  
ENRIQUECIMENTO PROTÉICO PARA UTILIZAÇÃO NA  
ALIMENTAÇÃO DE RUMINANTES**

TAMIRES CARVALHO DOS SANTOS

Itapetinga-BA

Março de 2013

TAMIRES CARVALHO DOS SANTOS

**FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO DO FARELO DE PALMA  
FORRAGEIRA: OBTENÇÃO DE ENZIMAS INDUSTRIAIS E  
ENRIQUECIMENTO PROTÉICO PARA UTILIZAÇÃO NA  
ALIMENTAÇÃO DE RUMINANTES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Campus de Itapetinga - BA, Área de concentração em Meio Ambiente e Desenvolvimento para obtenção do título de mestre.

Orientador: Prof. Marcelo Franco

Coorientadores: Aureliano José Vieira Pires e  
Renata Cristina Ferreira Bonomo

Itapetinga-BA

Março de 2013

636.08 Santos, Tamires Carvalho dos.

5 Fermentação em estado sólido do farelo de palma forrageira: obtenção de  
S239f enzimas industriais e enriquecimento protéico para utilização na alimentação  
de ruminantes. / Tamires Carvalho dos Santos. - Itapetinga: UESB, 2013.  
128f.

Dissertação de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – UESB – Campus de Itapetinga. Sob a orientação do Prof. D.Sc. Marcelo Franco e coorientação do Prof. D.Sc. Aureliano José Vieira Pires e Profa. D.Sc. Renata Cristina Ferreira Bonomo.

1. Farelo de palma forrageira - Fermentação em estado sólido - Alimentação de ruminantes. 2. Suplementação protéica unicelular – Produção de enzimas industriais. 3. Bioconversão fúngica - Fungos filamentosos. I. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais. II. Franco, Marcelo. III. Pires, Aureliano José Vieira. IV. Bonomo, Renata Cristina Ferreira. V. Título.

CDD (21): 636.085

Catálogo na fonte:

Adalice Gustavo da Silva – CRB/5-535

Bibliotecária – UESB – Campus de Itapetinga-BA

Índice Sistemática para Desdobramento por Assunto:

1. Farelo de palma forrageira - Fermentação em estado sólido - Alimentação de ruminantes
2. Suplementação protéica unicelular – Produção de enzimas industriais
3. Bioconversão fúngica - Fungos filamentosos

TAMIRES CARVALHO DOS SANTOS

**FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO DO FARELO DE PALMA  
FORRAGEIRA: OBTENÇÃO DE ENZIMAS INDUSTRIAIS E  
ENRIQUECIMENTO PROTÉICO NA ALIMENTAÇÃO DE RUMINANTES**

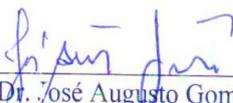
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Campus de Itapetinga, BA. Área de Concentração: Meio Ambiente e Desenvolvimento.

Aprovada em: 27 / 03 /2013

**BANCA EXAMINADORA**



Prof. Dr. Marcelo Franco – UESC  
Presidente



Prof. Dr. José Augusto Gomes Azevedo – UESC



Prof.ª Dr.ª Sandra Aparecida de Assis - UEFS

*“Alegro-me grandemente no Senhor, porque finalmente vocês renovaram o seu interesse por mim. De fato, vocês já se interessavam, mas não tinham oportunidade para demonstrá-lo.*

*Não estou dizendo isso porque esteja necessitado, pois aprendi a adaptar-me a toda e qualquer circunstância.*

*Sei o que é passar necessidade e sei o que é ter fartura. Aprendi o segredo de viver contente em toda e qualquer situação, seja bem alimentado, seja com fome, tendo muito, ou passando necessidade.*

*Pois, tudo posso em Deus que me fortalece.”*

*(Filipenses 4: 10-13)*

*“No que diz respeito ao desempenho, ao compromisso, ao esforço, à dedicação, não existe meio termo. Ou você faz uma coisa bem-feita ou não faz.”*

*(Ayrton Senna)*

*A Maria Santissima e a Ivanei dedico.*

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus por ter iluminado meu caminho sempre.

Aos meus pais Ivanei Carvalho e Sinaldo Lima e a meu irmão Danrlei Carvalho, pelo amor, apoio e confiança durante essa caminhada.

Aos meus “irmãos de alma” que ganhei ao longo da caminhada acadêmica, Ana Carolina Oliveira, George Abreu Filho, Gleiza Alves Diniz, Graziella Marques e Thiago José Onório Rocha, pelo carinho, apoio e fé em todos os momentos.

Aos amigos e companheiros de laboratório Alexsandra Ferreira, Adriana Ferreira, Clissiane Soares, Devson Gomes, Gleydison Amarante, Ingrid Calvacante, Ismaycon Carvalho, Julia Lacerda, Nathilla Deyse, Zanon Gonçalves, pelos momentos memoráveis vividos no grandioso LABRA.

Ao meu orientador Marcelo Franco, não só pela orientação e aprendizagem durante o período de pesquisas, mas principalmente da confiança e por toda a motivação com vistas ao meu crescimento profissional.

Aos meus coorientadores Aureliano José Vieira Pires e Renata Cristina Fereira Bonomo, pela orientação, auxílio e transmissão de conhecimentos.

Ao professores Paulo Bonomo por todo apoio e disponibilidade durante toda parte experimental.

Aos meu professores da pós graduação, Cristiane Martins Veloso, Daniela Deitos Fries, Flávia Mariani Barros, Genebaldo Sales Nunes, Janaína Silva De Freitas, Luciano Brito Rodrigues Marcondes Viana Da Silva, Sandra Lúcia Da Cunha E Silva, pela oportunidade de aprimorar meus conhecimentos a partir das suas disciplinas.

Aos meus amigos e colegas da pós-graduação, especialmente a Camila Willers, Melquesedeque Oliveira e Samanta Perreira, pela força e apoio.

“Tudo o que um sonho precisa para ser realizado é alguém que acredite que ele possa ser realizado (Roberto Shinyashiki)”. Por isso muito obrigado a todos que acreditaram na construção do meu sonho.

SANTOS, T. C. **FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO DO FARELO DE PALMA FORRAGEIRA: OBTENÇÃO DE ENZIMAS INDUSTRIAIS E ENRIQUECIMENTO PROTÉICO PARA UTILIZAÇÃO NA ALIMENTAÇÃO DE RUMINANTES**. Itapetinga - BA: UESB, 2013. 128 p. (Dissertação:Mestrado em Ciências Ambientais – Área de Concentração em Meio Ambiente e Desenvolvimento).

## Resumo

Para aumentar a eficiência de utilização dos alimentos pelos ruminantes, pesquisadores têm estudado a utilização de produtos biotecnológicos, destacando-se o uso de enzimas fibrolíticas exógenas, extraídas de fungos, que em conjunto com as enzimas produzidas pelos microrganismos ruminais, potencializam a degradação dos polissacarídeos estruturais da biomassa vegetal alimentícia fornecida aos animais. Dos vegetais possíveis a serem cultivados na região semi-árida do Nordeste, destaca-se a palma doce (*Nopalea cochenillifera*). Planta resistente, à seca, sobrevivendo com pluviosidade baixa, importante recurso forrageiro para o rebanho durante os períodos críticos do ano, porém com um baixo índice de proteína bruta. O objetivou-se avaliar a utilização da palma como principal substrato para a produção de enzimas celulignolíticas (endoglucanase, celulasas totais, xilanase,  $\beta$ -glucosidase, lacase, lignina peroxidase e Mn peroxidase) e enriquecimento protéico unicelular, através da fermentação em estado sólido (FES) com o auxílio dos fungos filamentosos *Aspergillus niger* e *Rhizopus sp.* Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Resíduos Agroindustriais (UESB). A amostra foi coletada no campo Agrostológico da UESB – Campus de Itapetinga. Para as atividades enzimáticas foi utilizada a metodologia de Superfície de Resposta (SR) e o Delineamento de Box e Behnken (DBB), com três variáveis independentes atividade de água (0,827, 0,892 e 0,949), o tempo de fermentação (24, 72 e 120 h) e temperatura (25, 30 e 35 °C), que constitui no fatorial  $2^{3-1}$ , em dois níveis (-1 e +1) e quatro repetições no ponto central, os modelos desenvolvidos foram ajustados em segunda ordem. Para a verificação do enriquecimento proteico foi analisado o perfil químico-bromatológico através do delineamento inteiramente casualizado com bioconversão da palma com as espécies *A. niger* e *Rhizopus sp.* com seis repetições amostrais e variação de tempo fermentativo de zero a 240 horas, com teor de água da palma mantido a 85 % (mm/m). A partir dos melhores valores de proteína bruta em relação ao tempo fermentativo, foi examinado os fatores de degradabilidade ruminal da matéria seca, fibra em detergente neutro, fibra em detergente ácido e proteína bruta. Para estas análises foi aplicado o teste de Tukey a 1% de probabilidade para comparar as médias de degradabilidade da MS, da FDN e da PB de acordo com os períodos de incubação (0, 3, 6, 12, 24, 48, 72, 96 e 120). A importância de todos os modelos descritos foram examinados pelo teste estatístico de Fisher, através do teste de diferenças significativas entre as fontes de variação nos resultados experimentais. Com este experimento é possível obter dados relativos a otimização com vistas a produção e enzimas industriais de alto valor agregado e a possível suplementação protéica da palma forrageira, de grande interesse para os produtores agropecuários da região semiárida.

**Palavras-chave:** Bioconversão fúngica, fungos filamentosos, metodologia de superfície de resposta, suplementação proteica unicelular

SANTOS, T. C. **SOLID STATE FERMENTATION OF FORAGE CACTUS MEAL: PROCUREMENT OF INDUSTRIAL ENZYMES AND PROTEIN ENRICHMENT FOR USE IN FEEDING RUMINANTS.** Itapetinga - BA: UESB, 2013. 128 p. (Dissertação: Mestrado em Ciências Ambientais – Área de Concentração em Meio Ambiente e Desenvolvimento).

### Abstract

To increase the efficiency of feed utilization by ruminants, researchers have studied the use of biotech products, highlighting the use of exogenous fibrolytic enzymes, derived from fungi, which together with the enzymes produced by ruminal microorganisms, enhance the degradation of polysaccharides structural biomass plant food given to the animals. Vegetables possible to be cultivated in semi-arid region of the Northeast, there is the sweet cactus (*Nopalea cochenillifera*). Plant resistant, drought, surviving with low rainfall, important forage resource for livestock during the critical periods of the year, but with a low level of crude protein. The objective was to evaluate the use of the palm as the main substrate for the production of enzymes celulignolíticas (endoglucanase, total cellulase, xylanase,  $\beta$ -glucosidase, laccase, lignin peroxidase and manganese peroxidase) and single cell protein enrichment by solid state fermentation (FES) using the filamentous fungi *Aspergillus niger* and *Rhizopus sp.* The experiments were conducted at the Laboratory of Agro-Industrial Wastes (UESB). The sample was collected in the field Agrostológico UESB - Campus Itapetinga. For the enzymatic activities methodology was used Response Surface (SR) and Design of Box and Behnken (DBB), with three independent variables water activity (0.827, 0.892 and 0.949), fermentation time (24, 72 and 120 h) and temperature (25, 30 and 35 °C), which is the factor  $2^{3-1}$ , on two levels (-1 and +1) and four replications at the center point, the models developed will be adjusted second order. For verification of protein enrichment profile was analyzed by chemical-bromatológico completely randomized design with bioconversção palm species with *A. niger* and *Rhizopus sp.* with six replicates sample and fermentation time varying from zero to 240 hours, with water content maintained at 85% palm (mm / m). From the best values of crude protein compared to fermentation time was examined factors rumen degradability of dry matter, neutral detergent fiber, acid detergent fiber and crude protein. For these analyzes will be applied the Tukey test at 1% probability to compare mean degradability of DM, NDF and CP according to incubation periods (0, 3, 6, 12, 24, 48, 72, 96 and 120). The importance of all models described will be examined by Fisher's statistical test, by testing for significant differences between the sources of variation in the experimental results. With this experiment hi can obtain data with a view to optimizing industrial enzymes and production of high added value and possible protein supplementation of cactus, of great interest to agricultural producers of the semiarid region.

**Keywords:** Bioconversion fungal, fungi, response surface methodology, protein supplementation unicellular

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.1</b> – <i>Nopalea cochenillifera</i> (L.) Lyons - Cactaceae.....	20
<b>Figura 1.2</b> – Modelo sinérgico da ação das enzimas endoglucanase (endocellulase), exaglucanase (exocellulase) e $\beta$ -glucosidase.....	22
<b>Figura 1.3</b> – Esquema estrutural proposto para a lignina.....	23
<b>Figura 1.4</b> – Ciclo catalítico da Lacase.....	25
<b>Figura 1.5</b> – Ciclo catalítico da Lignina Peroxidase.....	26
<b>Figura 1.6</b> – Ciclo catalítico da Manganês Peroxidase.....	27
<b>Figura 1.7</b> – Modelo sinérgico da ação das enzimas endoxilanses, exoxilanase e $\beta$ -xilosidase.....	28
<b>Figura 1.8</b> – Fermentação em estado sólido.....	29
<b>Figura 1.9</b> – <i>Aspergillus niger</i> .....	31
<b>Figura 1.10</b> – <i>Rhizopus sp.</i> .....	33
<b>Figura 1.11</b> - Enriquecimento proteico da palma doce: a) palma <i>in natura</i> , b) palma fermentada com <i>A. niger</i> , c) palma fermentada com <i>Rhizopus sp.</i> .....	32
<b>Figura 2.1</b> – Pareto gráfico mostrando o significado das variáveis tempo de fermentação (T), atividade de água (aw) e temperatura (TP), em que E1 endoglucanase produzida pelo <i>A. niger</i> , E2 celulases totais produzidas pelo <i>A. niger</i> , E3 endoglucanase produzida pelo <i>Rhizopus sp.</i> , E4 celulases totais produzidas pelo <i>Rhizopus sp.</i> .....	46

**Figura 2.2** – Superfície de resposta das atividades enzimáticas em função do tempo de fermentação e temperatura: a) endoglucanase produzida pelo *A. niger*, b) celulases totais produzidas pelo *A. niger*, c) endoglucanase produzida pelo *Rhizopus sp.*, d) celulases totais produzidas pelo *Rhizopus sp.*..... 47

**Figura 2.3** – Termoestabilidade enzimática: a) endoglucanase produzida pelo *A. niger*, b) celulases totais produzidas pelo *A. niger*, c) endoglucanase produzida pelo *Rhizopus sp.*, d) celulases totais produzidas pelo *Rhizopus sp.*..... 51

**Figura 2.4** – Estabilidade enzimática ao pH: a) endoglucanase produzida pelo *A. niger*, b) celulases totais produzidas pelo *A. niger*, c) endoglucanase produzida pelo *Rhizopus sp.*, d) celulases totais produzidas pelo *Rhizopus sp.*..... 52

**Figura 2.5** – Cinética de desativação enzimática. a) - 25 °C e b) 4 °C. E1 endoglucanase produzida pelo *A. niger*, E2 celulases totais produzidas pelo *A. niger*, E3 endoglucanase produzida pelo *Rhizopus sp.*, E4 celulases totais produzidas pelo *Rhizopus sp.*..... 53

**Figura 3.1** – Pareto gráfico mostrando o significado das variáveis tempo de fermentação (T) e temperatura (TP), em que E1 endoglucanase produzida pelo *A. niger*, E2 celulases totais produzidas pelo *A. niger*, E3 endoglucanase produzida pelo *Rhizopus sp.*, E4 celulases totais produzidas pelo *Rhizopus sp.*..... 66

**Figura 3.2** – Superfície de resposta das atividades enzimáticas em função do tempo de fermentação e temperatura: a) endoglucanase produzida pelo *A. niger*, b) celulases totais produzidas pelo *A. niger*, c) endoglucanase produzida pelo *Rhizopus sp.*, d) celulases totais produzidas pelo *Rhizopus sp.*..... 70

<b>Figura 3.3</b> – Termoestabilidade enzimática: a) $\beta$ -glucosidase produzida pelo <i>A. niger</i> , b) xilanase produzida pelo <i>A. niger</i> , c) $\beta$ -glucosidase produzida pelo <i>Rhizopus sp.</i> , d) xilanase produzida pelo <i>Rhizopus sp.</i> .....	71
<b>Figura 3.4</b> – Estabilidade enzimática ao pH: a) $\beta$ -glucosidase produzida pelo <i>A. niger</i> , b) xilanase produzida pelo <i>A. niger</i> , c) $\beta$ -glucosidase produzida pelo <i>Rhizopus sp.</i> , d) xilanase produzida pelo <i>Rhizopus sp.</i> .....	72
<b>Figura 3.5</b> – Cinética de desativação enzimática. a) - 25 °C e b) 4 °C. E1 endoglucanase produzida pelo <i>A. niger</i> , E2 celulases totais produzidas pelo <i>A. niger</i> , E3 endoglucanase produzida pelo <i>Rhizopus sp.</i> , E4 celulases totais produzidas pelo <i>Rhizopus sp.</i> .....	73
<b>Figura 4.1</b> – Pareto gráfico mostrando o significado das variáveis tempo de fermentação (T), atividade de água ( <i>A<sub>w</sub></i> ) e temperatura (TP), .....	89
<b>Figura 4.2</b> – Superfícies de respostas: a) Lacase, b) Lig. Peroxidase e c) Mn peroxidase, ambas produzidas pelo <i>A. niger</i> ; d) Lacase, e) Lig. Peroxidase e f) Mn peroxidase, produzidas pelo <i>Rhizophus sp.</i> .....	90
<b>Figura 4.4</b> - Termoestabilidade: a) Lacase, b) Lig. Peroxidase e c) Mn peroxidase, ambas produzidas pelo <i>A. niger</i> ; d) Lacase, e) Lig. Peroxidase e f) Mn peroxidase, produzidas pelo <i>Rhizophus sp.</i>	91
<b>Figura 4.4</b> - Estabilidade em pH: a) Lacase, b) Lig. Peroxidase e c) Mn peroxidase, ambas produzidas pelo <i>A. niger</i> ; d) Lacase, e) Lig. Peroxidase e f) Mn peroxidase, produzidas pelo <i>Rhizophus sp.</i> .....	92
<b>Figura 4.5</b> - Cinética de desativação das enzimas Lacase (E1), Lignina Peroxidase (E2) e Mn peroxidase (E3), a temperature de congelamento -25 °C (a) para o <i>A. niger</i> e (b) para o <i>Rhizophus sp.</i> , e a temperature de refrigeração 4 °C (c) para o <i>A. niger</i> e (d) para o <i>Rhizophus sp.</i> .....	95

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 2.1:</b> Valores codificados e valores reais para cada fator em estudo.....	43
<b>Tabela 2.2</b> – Ajuste de dados obtidos a partir da ANOVA para o modelos de superfície de respostas quadráticas.....	44
<b>Tabela 3.1:</b> Valores codificados e valores reais para cada fator em estudo.....	65
<b>Tabela 3.2</b> – Ajuste de dados obtidos a partir da ANOVA para o modelos de superfície de respostas quadráticas.....	65
<b>Tabela 4.1:</b> Valores codificados e valores reais para cada fator em estudo.....	84
<b>Tabela 4.2</b> – Ajuste de dados obtidos a partir da ANOVA para o modelos de superfície de respostas quadráticas.....	86
<b>Tabela 5.1</b> – Média dos teores de químico-bromatológicos (g/kg) durante a fermentação em estado sólido da palma forrageira, sob diferentes espécies fúngicas: <i>Aspergillus niger</i> (A) e <i>Rhizopus sp.</i> (B).....	104
<b>Tabela 5.2</b> – Média dos teores de químico-bromatológicos (g/kg) durante a fermentação em estado sólido da palma forrageira, sob diferentes espécies fúngicas: <i>Aspergillus niger</i> (A) e <i>Rhizopus sp.</i> (B).....	107
<b>Tabela 6.1</b> – Composição bromatológica das amostras utilizadas durante a incubação ruminal.....	118
<b>Tabela 6.2</b> – Fração solúvel (a), potencialmente degradável (b) e taxa de degradação da fração “b” (c) da matéria seca da palma <i>in natura</i> , palma com <i>A. niger</i> e <i>Rhizopus sp.</i> .....	120

**Tabela 6.3** – Fração solúvel (a), potencialmente degradável (b) e taxa de degradação da fração “b” (c) da fibra em detergente neutro (FDN) da palma *in natura*, palma com *A. niger* e *Rhizopus sp.* 120

**Tabela 6.4** – Fração solúvel (a), potencialmente degradável (b) e taxa de degradação da fração “b” (c) da fibra em detergente ácido (FDA) da palma *in natura*, palma com *A. niger* e *Rhizopus sp.* 120

**Tabela 6.5** – Fração solúvel (a), potencialmente degradável (b) e taxa de degradação da fração “b” (c) da proteína bruta (PB) da palma *in natura*, palma com *A. niger* e *Rhizopus sp.* 121

**Tabela 6.6** – Degradabilidade potencial (DP) e efetiva (P) da matéria seca (MS), fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente ácido (FDA) e proteína bruta (PB). 123

# SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO I</b> .....	14
1.1 – INTRODUÇÃO.....	14
1.2 – OBJETIVOS.....	16
1.2.1 – Objetivo Geral.....	16
1.2.2 – Objetivo Específicos .....	16
1.3 – REFERENCIAL TEÓRICO.....	17
1.3.1 – Palma Forrageira.....	17
1.3.2 – Celulose.....	19
1.3.2.1 – Degradação Enzimática da Celulose.....	19
1.3.3 – Lignina.....	21
1.3.3.1 – Degradação Enzimática da Lignina.....	22
1.3.4 – Hemiceluloses.....	25
1.3.4.1 – Degradação Enzimática da Hemicelulose.....	26
1.3.6 – Bioprocesso.....	26
1.3.5 – Enriquecimento Protéico.....	27
1.4 – CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	32
<b>CAPÍTULO II</b> .....	36
Produção de celulases estáveis a temperatura e pH a partir da bioconversão da palma forrageira por <i>Aspergillus niger</i> e <i>Rhizopus sp.</i> .....	36
<b>CAPÍTULO III</b> .....	56

Aplicação da metodologia de superfície de resposta na produção, otimização e caracterização de $\beta$ -glucosidase e xilanase por fungos filamentosos.....	56
<b>CAPÍTULO IV</b> .....	77
Hidrolise Enzimática do farelo de palma forrageira por enzimas lignolíticas.....	77
<b>CAPÍTULO V</b> .....	97
Enriquecimento proteico da <i>Nopalea cochenillifera</i> (L.) Lyons - Cactaceae: proteína unicelular produzida por meio da fermentação em estado sólido com vistas a alimentação de ruminantes.....	97
<b>CAPÍTULO VI</b> .....	111
Cinética ruminal de frações nutricionais da palma forrageira <i>in natura</i> e enriquecida com proteína fúngica através da fermentação em estado sólido.....	111

## CAPÍTULO I

### 1.1 – INTRODUÇÃO

O aumento da conscientização ecológica, iniciado no final do século XX, deixou claro que o grande desafio da humanidade para as próximas décadas é equilibrar a produção de bens e serviços, o crescimento econômico, a igualdade social e a sustentabilidade ambiental (PINTO *et al.*, 2005). Conseqüentemente o desenvolvimento de tecnologias limpas com vistas à produção de compostos orgânicos com aplicações industriais, a partir de recursos renováveis, tais como a biomassa vegetal, poderá vir a ser a nova matriz da produção industrial.

Normalmente a composição da biomassa pode variar de acordo com a espécie vegetal, porém, a composição média consiste em 50% de celulose, 25% de hemicelulose e 25% de lignina (TAIZ & ZEIGER, 2004). Dentre as biomassas vegetais está a palma miúda, palma forrageira ou palma forrageira (*Nopalea cochenillifera*), essa planta é resistente, à seca, sobrevivendo com pluviosidade mínima. Encontra-se amplamente difundida na região semi-árida da Bahia, onde residem 48% da população estadual.

O setor biotecnológico apresenta muitas iniciativas de pesquisa e desenvolvimento no estudo das enzimas, resultando na obtenção de diversos produtos além do melhoramento dos processos e do desempenho dos produtos já existentes no mercado. No entanto, o custo de produção dessas enzimas está diretamente ligado à economia de processos e corresponde ao principal fator que limita sua aplicação em grande escala. Por esta razão, reduzir os custos de produção é fundamental para se ampliar sua aplicação (PARK *et al.*, 2002). Nesse sentido estudar a utilização da palma forrageira como matéria-prima para bioprocessos, pode viabilizar essa aplicação (GHORAI *et al.*, 2009).

A produção de enzimas comerciais é de interesse de várias camadas industriais, como indústria de alimentos, farmacêutica, de tratamento de efluentes, papelarias dentre outras. Por sua vez, a fermentação em estado sólido de substratos orgânicos vegetais é tida como um processo biotecnológico capaz de produzir biocompostos com custos significativamente baixos.

Neste contexto, a biomassa ligninocelulósica surge como uma alternativa de alto interesse, uma vez que apresenta enorme potencial para contribuir com esta tecnologia devido à grande disponibilidade da matéria prima. Logo, a produção de enzimas a partir

de subprodutos desta natureza pode aumentar consideravelmente. No entanto, apesar de oferecer inúmeras vantagens, a utilização de biomassas ligninocelulósicas ainda não é uma realidade visto que a tecnologia para sua utilização ainda não se encontra totalmente desenvolvida.

Na região semi-árida do Nordeste, apesar da importância da pecuária no contexto sócio-econômico, na época de estiagem, o rebanho bovino apresenta baixos índices de produtividade, em função de vários fatores, principalmente os relacionados com a alimentação. Nesta região os animais estão sujeitos a longos períodos de estiagem, onde as pastagens nativas, a sua principal fonte forrageira apresenta baixa produtividade.

Apesar da sua excelente adaptação às condições da região, a palma apresenta uma série de limitações, particularmente relacionadas aos valores nutricionais, mostrando-se inferior às outras culturas forrageiras, como o sorgo, milho, capim-elefante, etc. Através da bioconversão fúngica da palma é possível realizar o enriquecimento protéico que garante níveis mais próximos aos ideais a serem fornecidos aos ruminantes em período de uma provável seca.

O cultivo é largamente difundido em todo rebanho bovino nordestino, e pode ser associada ou não a suplementos concentrados, a exemplo do milho, farelos de soja, algodão, trigo e outros, a depender da disponibilidade local, cujos preços alcançam níveis elevados no período de escassez de forragens. Dessa forma, o sistema de produção pecuário nessa região deve se basear na utilização de recursos forrageiros adaptados à seca, com base na melhoria nutricional em alimentos concentrados alternativos adaptados a realidade local.

## 1.2. – OBJETIVOS

### 1.2.1 – Objetivo Geral

Utilização da palma forrageira como meio de suporte para a síntese de enzimas fúngicas e enriquecimento protéico unicelular da forrageira.

### 1.2.2 – Objetivos específicos

- Identificar e aperfeiçoar a curva de atividade cinética das enzimas responsáveis pela quebra dos biopolímeros celulose, hemicelulose e lignina, produzidas a partir da fermentação em estado sólido da palma forrageira;
- Utilização de duas espécies fúngicas filamentosas (*Aspergillus niger* e *Rhizopus sp.*) na produção das enzimas responsáveis pela hidrólise da cadeia lignocelulósica;
- Realizar análises do perfil químico-bromatológico da palma forrageira ao longo do processo fermentativo, com a intenção de verificar o enriquecimento protéico e possível queda do percentual de fibras e conseqüentemente elevação dos índices de carboidratos solúveis;
- Realizar testes de degradabilidade ruminal da matéria seca, proteína bruta, fibra em detergente neutro (FDN) e fibra em detergente ácido (FDA), da palma forrageira *in natura* e fermentada com *A. niger* e o *Rhizopus sp.*, no intuito de comparar a eficiência de cada tratamento.

### 1.3 – REFERENCIAL TEÓRICO

#### 1.3.1 – Palma Forrageira

A palma forrageira é uma cactácea de origem mexicana, rústica, resistente e adaptada a regiões secas. No semi-árido brasileiro, essa forrageira é aplicada nos diversos sistemas de produção pecuária, no entanto, é uma planta de enorme potencial produtivo e de múltiplas utilidades, podendo ser usada na alimentação humana, na produção de medicamentos, cosméticos e corantes, na conservação e recuperação de solos, como cercas vivas e paisagismo.

A composição química relativa da palma possui alto valor de nutrientes digestíveis totais. Os níveis de carboidratos solúveis são elevados, bem como os teores de cinza, vitaminas e ferro, destacando-se ainda os teores de cálcio (3%); potássio (2,5%) e fósforo (0,15%) (CHIACCHIO, 2006). Além disso, apresenta também baixos teores de matéria seca ( $11,69 \pm 2,56\%$ ), proteína bruta ( $4,81 \pm 1,16\%$ ), fibra em detergente neutro ( $26,79 \pm 5,07\%$ ) e fibra em detergente ácido ( $18,85 \pm 3,17\%$ ) (CHIACCHIO, 2006).

Na Bahia, a palma forrageira faz parte do rol de atividades agrícolas de sequeiro do semi-árido, para suprir a falta de forragem para os animais nos períodos longos de seca. O broto da palma ou palma-verdura, denominação popular, também é utilizado na culinária no preparo de diversos pratos (GUEDES *et al.* 2004).

A grande diversidade de usos e aplicações da palma forrageira revela a versatilidade dessa espécie vegetal, que apesar de ser cultivada no semi-árido baiano para alimentação animal, não tem sua potencialidade explorada plenamente. Em consequência, vêm sendo desperdiçadas excelentes oportunidades para melhoria dos índices sociais e econômicos desse espaço geográfico, mediante a geração de postos de trabalho, renda, oferta de alimentos e preservação ambiental (CHIACCHIO, 2006).

A palma forrageira da variedade miúda (*Nopalea cochenillifera*), apresenta um valor nutritivo melhor, quando comparada com as cultivares mais plantadas no Estado, Redonda e Gigante. A cultivar forrageira é capaz de produzir, a cada ano,  $68 \text{ t ha}^{-1}$  de matéria verde, com densidade de 20 mil plantas por hectare (SANTOS *et al.*, 2006). Em razão de apresentar uma multiplicação mais rápida que as cultivares redonda e gigante, é possível realizar colheitas com intervalos de 1 ano, o que não é recomendado para as demais cultivares.



**Figura 1.1:** *Nopalea cochenillifera* (L.) Lyons - Cactaceae. Fonte: A autora.

Na propagação convencional a implantação da cultura requer grande quantidade de material. A palma pode ser propagada por cladódio inteiro ou metade do cladódio, em corte transversal ou longitudinal; contudo, a aquisição e o transporte de mudas, mesmo fracionadas, se torna um problema principalmente quando o plantio é realizado em locais distantes da produção da palma semente. A fonte de material vegetativo para implantação da palma constitui as plantações comerciais, apesar dessas apresentarem as desvantagens de propagação de doença e falta de certificação genética (VASCONCELLOS *et al.*, 2007).

Neste trabalho a importância da palma se dá ao fato da utilização do seu farelo seco como meio de suporte carbonáceo, baseado na sua composição lignocelulósica, para a obtenção de enzimas fúngicas a partir da fermentação em estado sólido e possível utilização da biomassa fermentada como alimento para ruminantes.

### 1.3.2 – Celulose

Celulose é o composto mais abundante nos lignocelulósicos, sendo um polímero linear formado exclusivamente por moléculas  $\delta$ -glicopiranoose unidas por ligações glicosídicas  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) (ESPOSITO & AZEVEDO, 2004). Estudos de dispersão de luz determinaram o peso molecular da celulose, indicando que a celulose possui um grau de polimerização médio de 9000 - 10000 podendo em alguns casos atingir números muito maiores do que este. Moléculas de celulose são orientadas ao acaso e têm a tendência de formar ligações de hidrogênio inter e intramolecular (ROWELL *et al.*, 2007).

Os modelos atuais da organização microfibrilar sugerem que ela tem uma subestrutura constituída de domínios altamente cristalinos unidos por ligações amorfas (TAIZ e ZEIGER, 2004). Regiões cristalinas são formadas a partir do aumento da densidade de empacotamento (ESPOSITO & AZEVEDO, 2004). Existem celulosas acessíveis e não acessíveis. A acessibilidade refere-se a interações de hidrogênio intra e intermoleculares.

Quanto mais acessíveis, mais interações podem acontecer entre a celulose e fatores diversos como água, microorganismos, etc. (ROWELL *et al.*, 2007). As superfícies da celulose cristalina são muito acessíveis, porém o resto da estrutura não é. A maioria das celulosas não cristalinas seria acessível, porém como essa estrutura é coberta por hemicelulose e lignina, sua acessibilidade passa a ser limitada (ROWELL, *et al.*, 2007).

#### 1.3.2.1 – Degradação Enzimática da Celulose

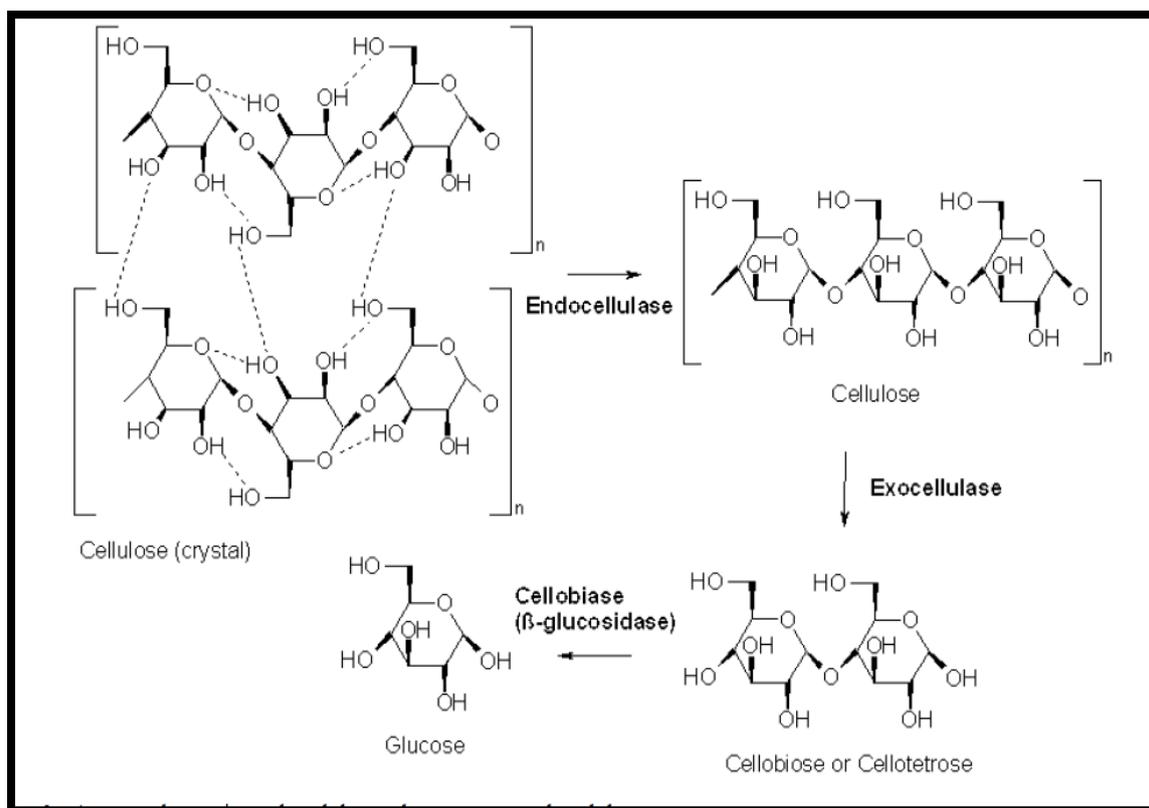
Para a degradação completa da celulose são necessárias as atuações sinérgicas de quatro tipos de celulasas. As endoglucanases (1,4-  $\beta$ - $\delta$ - glicana-4- glicanohidrolase; EC 3.2.1.4) hidrolisam ligações  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) internas da celulose (LYND, *et al.*, 2002). Essas enzimas são inativas sobre a celulose cristalina como algodão, mas elas hidrolisam celulose amorfa e substratos solúveis como carboximetilcelulose e hidroxietilcelulose. A atividade de endoglucanases é caracterizada por hidrólise aleatória de ligações  $\beta$ -glicosídicas, resultando em uma rápida diminuição da viscosidade acompanhada da taxa de aumento de grupos redutores. Os produtos incluem glicose, celobiose e celodextrinas de vários tamanhos (TAIZ & ZEIGER, 2004).

O segundo grupo de enzimas são as celobiohidrolases (1,4- $\beta$ - $\delta$ -glicana celobiohidrolase; EC 3.2.1.91), que são exocelulasas. Em relação às endoglucanases, as celobiohidrolases apresentam uma maior capacidade de redução da viscosidade.

Celobiohidrolases e endoglucanases atuam sinergicamente para degradação completa da celulose cristalina (LYND, *et al.*, 2002).

O terceiro grupo de enzimas são as exoglucanases (1,4- $\beta$ -D-glicana glicobiohidrolase, EC 3.2.1.74), que hidrolisam, consecutivamente, a remoção de unidades de glicose de terminais não redutores de celodextrinas (LYND, *et al.*, 2002). A taxa de hidrólise diminui proporcionalmente à diminuição do tamanho da cadeia.

O quarto grupo de enzimas são as  $\beta$ -glicosidases ( $\beta$ -D-glicosideoglicohidrolase; EC 3.2.1.21) que clivam celobiose em glicose e removem glicose de terminais não redutores de pequenas celodextrinas (TAIZ & ZEIGER, 2004). As  $\beta$ -glicosidases e as exoglucanases têm em comum os substratos de cadeias de glicose de 2 até 6 unidades. Elas podem ser distinguidas baseadas nas suas atividades relativas sobre os dois substratos, celobiose e celohexose (LYND, *et al.*, 2002). O esquema da sinergia destas enzimas são apresentados na Figura 1.2.



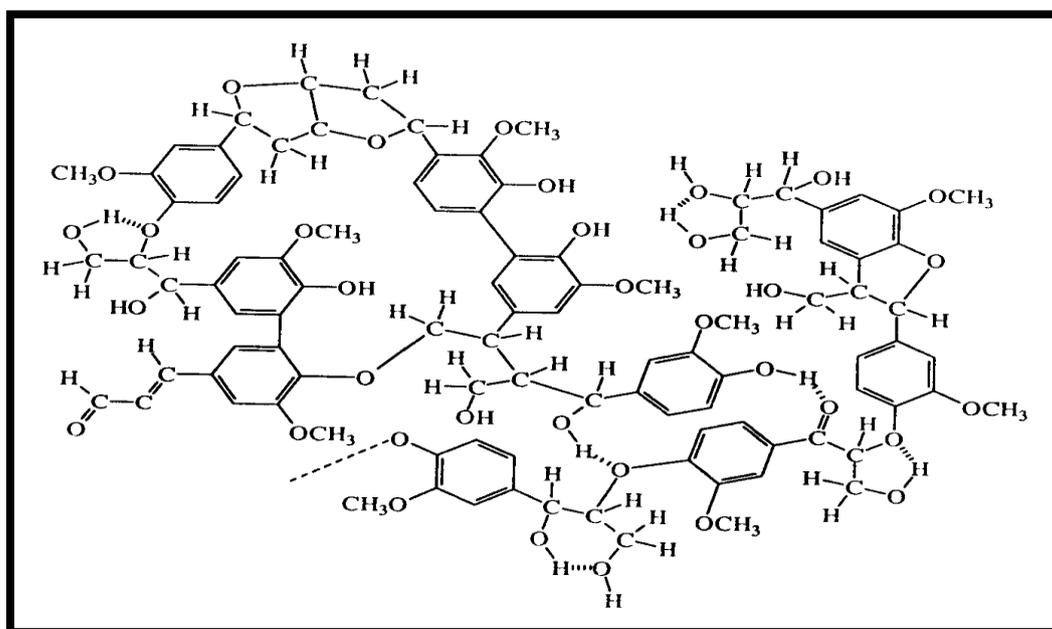
**Figura 1.2** – Modelo sinérgico da ação das enzimas endoglucanase (endocelulase), exoglucanase (exocelulase) e  $\beta$ -glicosidase. Fonte: Bortolazzo (2011).

Os sistemas de celulasas mais eficientes não são secretados livremente, mas são encontrados acoplados à superfície de microorganismos anaeróbicos em estruturas macromoleculares chamadas celulosomos. Essas estruturas são constituídas por enzimas

hidrolíticas assim como proteínas estruturais, que ancoram o celulosomo fora da célula (ROWELL, *et al.*, 2007). Essa estrutura é complexa e dinâmica e auxilia a interação sinérgica entre as enzimas. Entretanto, celulasas livres podem ser produzidas por fungos e bactérias aeróbicos. Apesar das enzimas bacterianas serem mais eficientes, as enzimas fúngicas dominam as aplicações industriais devido ao seu alto nível de expressão e secreção. Investimentos têm sido realizados visando o desenvolvimento de coquetéis de celulasas especializadas e de baixo custo (CHANG, 2007).

### 1.3.3 – Lignina

Lignina é um composto que está covalentemente ligado à celulose e outros polissacarídeos da parede celular (TAIZ & ZEIGER, 2004). Essa estrutura empacota as microfibrilas de polissacarídeos protegendo-as contra a atividade hidrolítica de enzimas e outros fatores externos, estabilizando o complexo de lignocelulose (LEONOWICZ, *et al.*, 1999). A lignina é composta basicamente de unidades de fenilpropanóides ramificadas dispostas aleatoriamente formando uma macromolécula tridimensional e amorfa. (ESPOSITO & AZEVEDO, 2004). Os fenilpropanóides – coniferil, cumaril, e sinapil –, são sintetizados a partir de fenilalaninas através de vários derivados de ácido cinâmico. Esses álcoois são então responsáveis pela formação de um polímero por meio de ação enzimática (TAIZ & ZEIGER, 2004).



**Figura 1.3** – Esquema estrutural proposto para a lignina. Fonte: <http://migre.me/axOVH>

### 1.3.3.1 – Degradação Enzimática da Lignina

Santos *et al.* (2011) aborda que apesar de vários dos seus aspectos necessitarem ainda serem investigados, a degradação da lignina pode ser entendida como um processo multienzimático por reação não específica, resultante da ação coordenada de uma série de enzimas ligninolíticas intra e extracelulares (grupo das oxidoredutases - representadas por peroxidases, lacases, manganês peroxidase e outras oxidases produtoras de peróxido de hidrogênio e de metabólitos intermediários de baixa massa molecular) as quais, desestabilizam as ligações da macromolécula, causando assim seu colapso.

A biodegradação da lignina a CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O depende de um efetivo processo de despolimerização dessa macromolécula que origina compostos de baixa massa molar susceptíveis ao metabolismo intracelular dos fungos (FUJIAN, 2001). Grande parte da abordagem experimental realizada até hoje, visa elucidar os mecanismos de biodegradação da lignina os quais são constituídos de ligações etéreas aril-aquil estando disponíveis também grupos fenólicos.

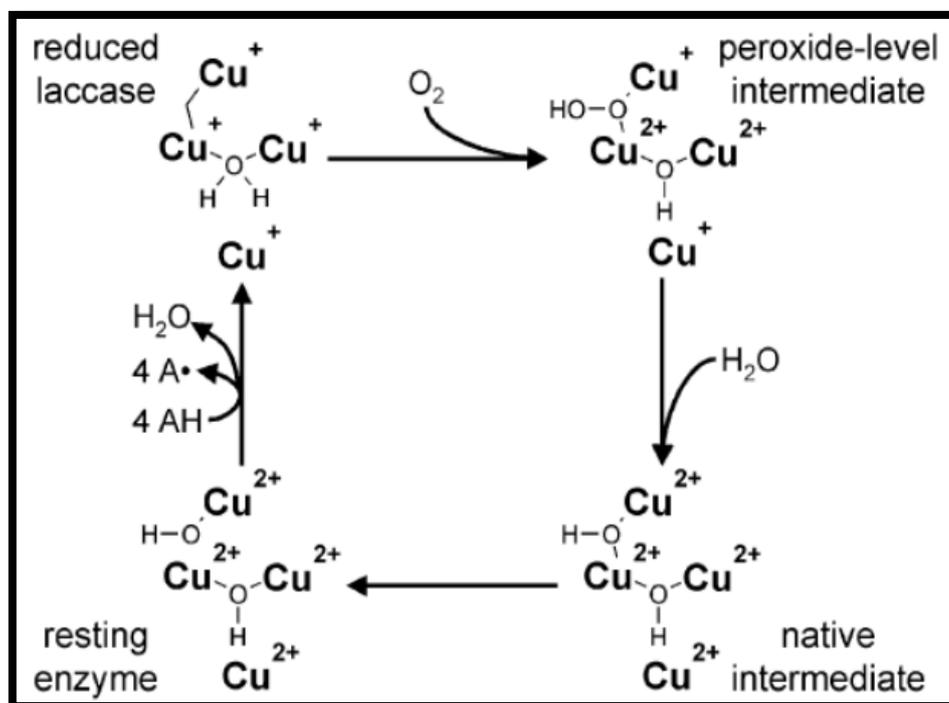
Cameron *et al.* (2000) relatou que o melhor mecanismo estudado de degradação de lignina é o do basidiomiceto *Phanerochaete cysosporium* consistindo de peroxidases, produção de enzimas H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, álcool veratrílico, manganês e oxalato.

As enzimas responsáveis pela degradação da lignina são principalmente Lacase (Lac), Lignina Peroxidase (LiP) e Manganês Peroxidase (MnP). As Lacases (Figura 1.4) atuam diretamente sobre as estruturas fenólicas através da oxidação dos fenóis pela abstração de um elétron mediada pela redução de Cu<sup>2+</sup> a Cu<sup>1+</sup> que, por sua vez, reduz O<sub>2</sub> a H<sub>2</sub>O, permitindo que a enzima atue de forma cíclica (FERRAZ, 2004).

A maior dúvida em relação ao ciclo catalítico da lacase, permanece na parte redutiva do ciclo, onde o mecanismo do agrupamento trinuclear é reduzido. Começando do estado nativo da enzima, uma molécula de substrato reduz o sítio T1. A partir deste ponto, dois mecanismos diferentes podem proceder: (a) o sítio T1 transfere seus elétrons ao sítio T2 e o sítio T1 é reduzido novamente por uma segunda molécula de substrato; os sítios T1 e T2 transferem seus elétrons aos sítios T3. O sítio T1 é reduzido por uma terceira molécula de substrato e um elétron é outra vez transferido ao sítio T2.

Este processo re-oxida o sítio T1, que é então reduzido por uma quarta molécula de substrato. Como resultado, uma forma completamente reduzida da enzima é obtida; (b) o agrupamento trinuclear é sequencialmente reduzido durante três passos de transferência de elétrons do sítio T1, que é sequencialmente reduzido por uma molécula

de substrato, finalizando no mesmo estado reduzido da enzima (MOREIRA NETO, 2006).



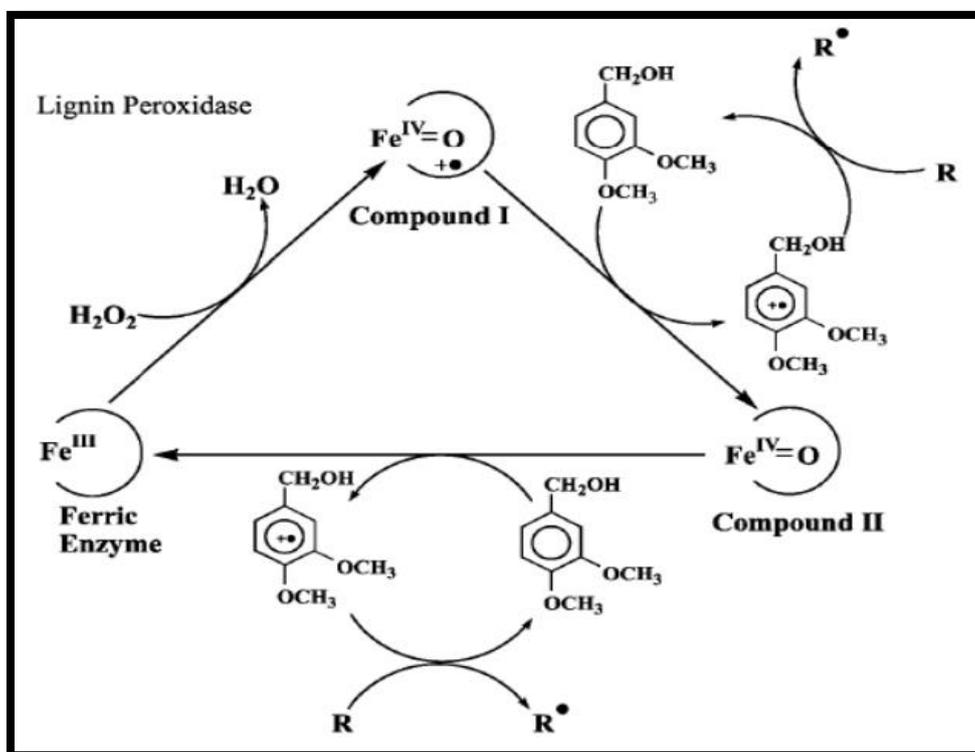
**Figura 1.4** – Ciclo catalítico da Lacase. Fonte: Wesenberg *et al.* (2003).

No processo de degradação da lignina, LiP é inicialmente oxidada pelo  $\text{H}_2\text{O}_2$  e oxida núcleos aromáticos da molécula de lignina (fenólicos e não fenólicos), gerando radicais catiônicos. Estes reagem espontaneamente com nucleófilos (primariamente  $\text{H}_2\text{O}$ ) e com oxigênio molecular, gerando uma “combustão enzimática“ onde ligações C-C e C-O são quebradas, despolimerizando a lignina e abrindo os anéis aromáticos. Esta enzima é uma glicoproteína que contém Fe protoporfirínico IX como grupo prostético e é dependente de  $\text{H}_2\text{O}_2$  para sua atividade (MOREIRA NETO, 2006).

Durante o ciclo catalítico o Fe contido, no grupo heme da LiP, passa por estados de óxido-redução (Figura 1.5) (MOREIRA NETO, 2006). O primeiro passo compreende a oxidação do Fe (III) da enzima nativa para Fe (IV), pela ação do  $\text{H}_2\text{O}_2$ , gerando o composto I, tipo radical catiônico da LiP. Pela redução do composto I, por transferência de um elétron, é formado o composto II, que ainda contém Fe (IV). O agente redutor pode ser um substrato como o álcool veratrílico ou o  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

Finalmente, uma etapa de redução por um elétron retorna a enzima a seu estado nativo, completando o ciclo catalítico. Na ausência do substrato redutor o composto II é

oxidado pelo  $\text{H}_2\text{O}_2$  para o composto III, uma forma da LiP com limitada capacidade catalítica, que com excesso de  $\text{H}_2\text{O}_2$  é rapidamente inativada (MOREIRA NETO, 2006).



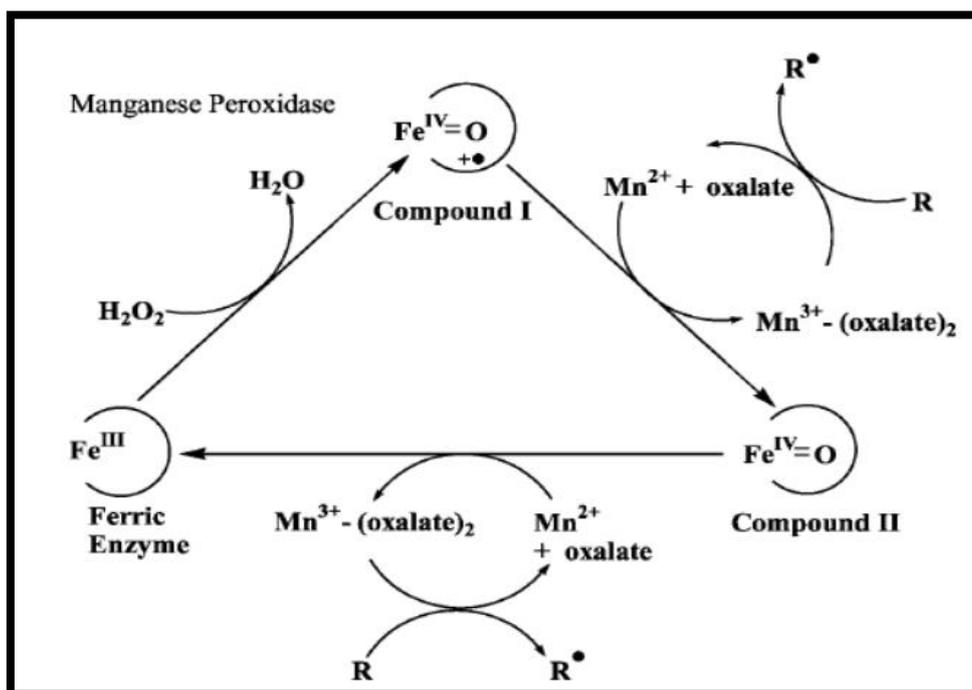
**Figura 1.5** – Ciclo catalítico da Lignina Peroxidase. Fonte: Cameron *et al.* (2000).

O ciclo catalítico da Mn Peroxidase é iniciado pela ligação de  $\text{H}_2\text{O}_2$  ou outro peróxido orgânico ao ferro nativo da enzima, formando um complexo ferro-peróxido (MOREIRA NETO, 2006). Seu ciclo catalítico é semelhante ao de LiP; no entanto, o  $\text{Mn}^{2+}$  atua como doador de elétrons para gerar o composto II. O ciclo catalítico da MnP é iniciado pela ligação de  $\text{H}_2\text{O}_2$  ou um outro peróxido orgânico ao ferro nativo da enzima, formando um complexo ferro-peróxido (Figura 1.6).

A quebra subsequente da ligação O-O do peróxido requer a transferência de 2 elétrons do grupo heme da enzima, que resulta na formação de um radical complexo  $\text{Fe}^{4+}$ -oxo-porfirina (MnP-I). Com a quebra da ligação dos oxigênios, uma molécula de água é liberada. Uma redução seguinte acontece formando o complexo MnP-II ( $\text{Fe}^{4+}$ -oxo-porfirina não radicalar). Um íon  $\text{Mn}^{2+}$  age como doador de 1 elétron para esse complexo intermediário e é oxidado à  $\text{Mn}^{3+}$ . A redução da MnP-II acontece de maneira similar e outro  $\text{Mn}^{3+}$  é formado de um  $\text{Mn}^{2+}$ , levando assim à geração da forma original da enzima, liberando uma segunda molécula de água. Ao passo que o MnP-I se comporta como LiP e como a peroxidase de raiz forte podendo junto do íon  $\text{Mn}^{2+}$ , ser reduzido por outros

doadores de elétrons. O MnP-II é pouco reduzido por outros substratos e requer exclusivamente  $Mn^{2+}$  para completar o ciclo catalítico (MOREIRA NETO, 2006).

O  $Mn^{3+}$  formado é estabilizado por ácidos orgânicos, tais como ácido oxálico, e age como um agente oxi-redutor difuso, de baixo peso molecular, que ataca moléculas orgânicas inespecificamente pela subtração de um elétron como apresentado na Figura 6.



**Figura 1.6** – Ciclo catalítico da Manganês Peroxidase. Fonte: Cameron *et al.*, 2000.

### 1.3.4 – Hemiceluloses

Hemiceluloses compreendem um grupo de polissacarídeos compostos principalmente pelos carboidratos  $\delta$ -xilopirranose,  $\delta$ -glicopirranose,  $\delta$ -galactopirranose, L-arabinofuranose,  $\delta$ -manopirranose,  $\delta$ -ácido glicurônico e  $\delta$ -galacturônico e quantidades menores de outros açúcares (ROWELL *et al.*, 2005). As unidades de pentoses ou hexoses são unidas por ligações  $\beta$ -(1  $\rightarrow$  4) com pontos de ramificações (1  $\rightarrow$  2), (1  $\rightarrow$  3) e/ou (1  $\rightarrow$  6) (LEONOWICZ *et al.*, 1999). No geral, as hemiceluloses apresentam um baixo grau de polimerização (média de 100 - 200) e a qualidade e quantidade de açúcares presentes nas hemiceluloses depende do tipo de parede celular e do organismo analisado (ROWELL *et al.*, 2005).

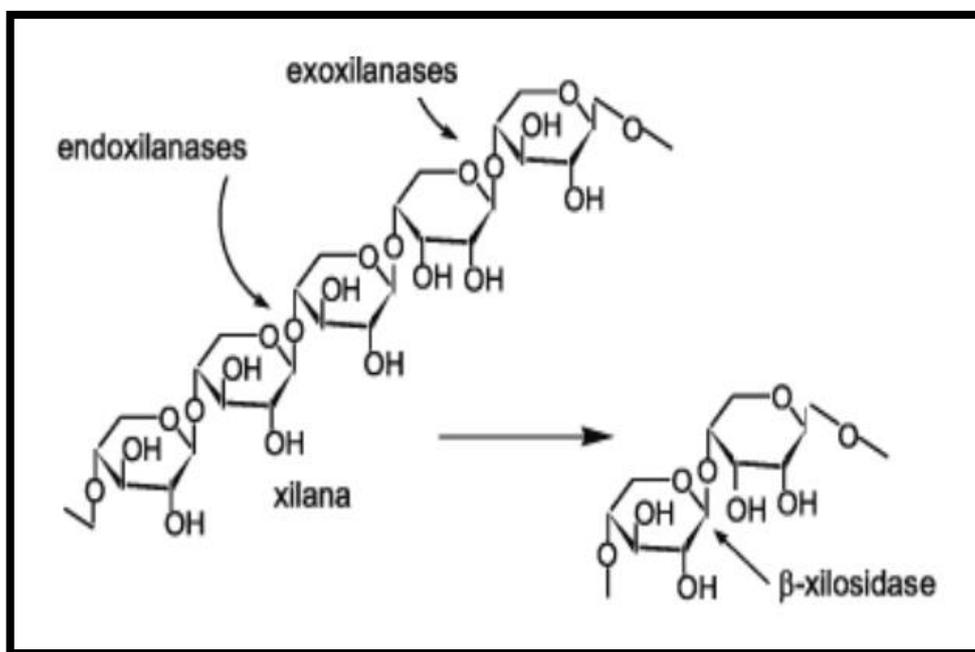
Estes polímeros são classificados de acordo com sua composição, como por exemplo, galactoglicomanana (heteropolímero de galactose, glicose e manose) arabinoglicuronoxilana (polímero de xilose com ramificações de ácido  $\delta$ -glucurônico ou

arabinose), arabinogalactana (heteropolímero de arabinose e galactose), glicomanana (heteropolímero de glicose e manose), etc. (SAHA, 2003). As hemiceluloses também contêm como substituintes grupos acetil, ácido ferúlico e metil (COLLINS *et al.*, 2005).

#### 1.3.4.1 – Degradação Enzimática da Hemicelulose

Devido à grande complexidade e heterogeneidade da rede hemicelulolítica a sua hidrólise completa requer a atuação de várias enzimas que atuam cooperativamente. Para isso, a determinação de quais tipos de enzimas foi necessária irá depender da composição da biomassa a ser degradada. Para degradação de xilanas em geral são necessárias basicamente seis enzimas diferentes (SAHA, 2003).

Uma das principais enzimas responsáveis pela degradação da hemicelulose são as Endo-1,4- $\beta$ -Xilanases (EC 3.2.1.8) que são enzimas que clivam aleatoriamente o esqueleto de arabinoxilana produzindo principalmente oligossacarídeos de xilose. Estas são uma das principais enzimas envolvidas na degradação deste polímero. As  $\beta$ -xilosidases (EC 3.2.1.37) por sua vez catalisam a hidrólise de xilooligossacarídeos e xilobiose a partir de terminais não redutores liberando xilose (SAHA, 2003).



**Figura 1.7** – Modelo sinérgico da ação das enzimas endoxilanas, exoxilanas e  $\beta$ -xilosidase. Fonte: Gomes *et al.* (2007).

### 1.3.5 – Bioprocesso – Fermentação em estado sólido

Os extratos enzimáticos são grandes representantes dos processos biotecnológicos. O setor de produção de enzimas e demais compostos protéicos apresentam muitas iniciativas de pesquisa e desenvolvimento, resultando na produção de novos produtos e no melhoramento dos processos. No entanto, seu alto custo de produção corresponde a um dos principais fatores que determinam sua baixa aplicação. Portanto, reduzir esses custos é fundamental para ampliar aplicações industriais (PARK *et al.*, 2005). A fermentação em estado sólido (FES) permite a síntese destas biomoléculas com custos relativamente baixos (SANTOS *et al.*, 2011).

Na fermentação em estado sólido (Figura 1. 9) os fungos apresentam-se como os microrganismos mais promissores, atua através do desenvolvimento das hifas por meio das quais ocorre a penetração no substrato e na região porosa entre as partículas do substrato (SILVEIRA & FURLONG, 2007). O que facilita a utilização deste bioprocesso para obtenção de produtos de alto valor agregado.



**Figura 1.8** – Fermentação em estado sólido. Fonte: A autora.

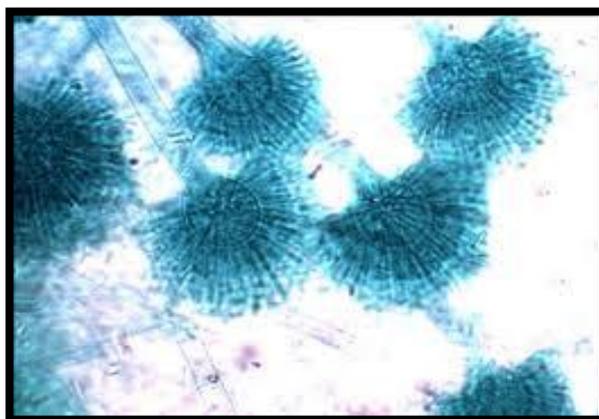
Os fungos filamentosos são ideais para produção de substâncias de interesse biotecnológico, possuindo crescimento rápido e baixo custo de cultivo sob condições controladas em laboratório (SIMÕES & TAU-K-TORNISIELO, 2005). A denominação fungos filamentosos abrange os fungos formados por hifas, uni ou pluricelulares, que formam revestimentos esbranquiçados ou coloridos, sobre o substrato. São descritas mais

de 100.000 espécies, distribuídas em aproximadamente 3.000 gêneros (MENEZES, 2006).

O *Aspergillus niger* é onipresente no solo possuindo importante função na decomposição de matéria orgânica no meio ambiente. De fácil manipulação, esse fungo é capaz de sintetizar uma ampla faixa de enzimas lignocelulolíticas a partir de uma grande variedade de matérias primas (SLIVINSKI, 2007).

Trata-se do gênero mais comum dos fungos filamentosos, além de ser um dos mais estudados. As espécies que compõe este gênero têm ampla distribuição mundial estando presente na superfície, no ar e na água, tanto em organismos vegetais como em animais, além de estarem associadas com a deterioração de materiais vegetais e alimentos, principalmente em regiões de clima tropical e sub-tropical (AMORIM, 2011).

Muitas das espécies de *Aspergillus* são utilizadas para a obtenção de enzimas, na biossíntese química e na transformação de compostos. A taxonomia atual reconhece 150 espécies do gênero *Aspergillus*, entretanto somente 30 destas são bem definidas e atualmente facilmente distinguíveis (ROSA *et al.*, 2002). As colônias geralmente têm crescimento rápido e exuberante, inicialmente são brancas ou amarelas, passando para marrom ou para o negro e são compostas por micélios.



**Figura 1.9** – *Aspergillus niger*. Fonte: <http://migre.me/cxj7F>

Outra espécie fungíca bastante estudada é o *Rhizopus sp.* O prefixo “rhizo” é pertinente as raízes, o sufixo “pus” deve-se aos rizóides da base dos esporangiosporos ou das hifas que são característicos de algumas espécies desse gênero.

O fungo do gênero *Rhizopus sp.* pertence ao filo Eumycophyta. Fungos pertencentes a este gênero são considerados fungos verdadeiros. O corpo desses fungos é formado por numerosos filamentos denominados hifas, formando um emaranhado que se

chama micélio. O *Rhizopus sp.* pertence ao grupo dos ficomicetos, desenvolvem-se sobre matéria orgânica úmida, constituindo o bolor com coloração preta e apresentam micélio ramificado e desorganizado.

O *Rhizopus sp.* pode ser encontrado no solo, em frutas e vegetais em decomposição, em fezes de animais e em pão velho (EDC, 2004). O gênero *Rhizopus* pode ser diferenciado quanto a algumas características morfológicas: comprimento dos rizóides e esporangiosforos, o diâmetro dos esporângios, a forma da columela, o tamanho, a forma e a textura dos esporangiosporos, sendo sua temperatura variável dentre as espécies (MOREIRA & SIQUEIRA, 2002).



**Figura 1.10** – *Rhizopus sp.*. Fonte: <http://migre.me/cxj2Z>

### 1.3.5 – Enriquecimento Protéico

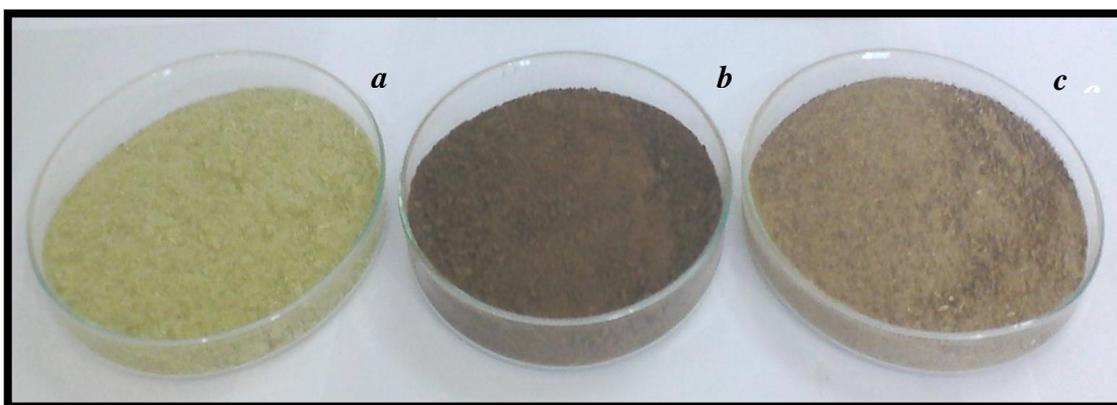
Apesar da importância socioeconômica da pecuária no semi-árido do Nordeste brasileiro, os sistemas produtivos de exploração animal apresentam baixos índices de produtividade, em função de vários fatores, principalmente escassez de alimentos. Nessa região, os animais estão sujeitos a problemas alimentares por causa do longo período de estiagem, quando a pastagem nativa, sua principal fonte forrageira, apresenta baixa produtividade, diminuta capacidade de suporte e baixo valor nutritivo, que restringem a produção de carne e leite (ARAÚJO, 2004).

A vegetação predominante é a caatinga hiperxerófila, que se apresenta normalmente densa, com porte arbóreo e, com menos frequência, arbóreo-arbustiva. Devido à ação antrópica, essa vegetação encontra-se muito devastada, sendo a utilização agrícola da região bastante intensa, com culturas de subsistência. As espécies mais encontradas são: catingueira (*Caesalpinia pyramidalis*), umbuzeiro (*Spondias tuberosa*),

baraúna (*Schinopsis brasiliensis*), juazeiro (*Zizyphus joazeiro*), marmeleiro (*Cróton sonderianus*), facheiro (*Cereus squamosus*) e mandacaru (*Cereus jamacaru*) (ARAÚJO *et al*, 2008).

Na tentativa de superar tais problemas, os criadores recorrem ao uso de concentrados comerciais para suplementação protéica na dieta dos animais, o que onera substancialmente os custos de produção, tornando a atividade antieconômica. Os frequentes aumentos dos preços da suplementação protéica, utilizada na dieta dos animais, têm estimulado o interesse pelo aproveitamento de alimentos não convencionais na indústria de alimentação animal do Brasil. Dentre os produtos que podem substituir os suplementos protéicos, destacam-se os microrganismos, algas, fungos filamentosos e leveduras, considerados fonte unicelular de elevado teor protéico, além de apresentarem rápido crescimento e possibilidade de cultivo em vários tipos de substratos (SANTOS, 2010).

A produção industrial em larga escala de biomassa fúngica apresenta inúmeras vantagens, quando comparada aos métodos tradicionais para a produção de proteínas. As vantagens mais características são: a alta velocidade de crescimento; alto conteúdo de proteína, que em peso seco pode atingir valores entre 50-55%; pode ser utilizada uma grande diversidade de fontes de carbono alternativas, entre elas os resíduos agroindustriais; as instalações para a produção de proteínas fúngicas ocupam pequenas áreas e resultam em alta produção; a produção microbiana independe das variações climáticas (SILVEIRA e FURLONG, 2007). Neste trabalho a importância do processo se dá pelo enriquecimento do farelo de palma forrageira e elaboração de um concentrado rico em proteínas solúveis.



**Figura 1. 11** - Enriquecimento proteico da palma doce: a) palma *in natura*, b) palma fermentada com *A. niger*, c) palma fermentada com *Rhizopus sp.*

#### 1.4 - Considerações Finais

A fermentação em estado sólido da palma pode proporcionar fontes de produtos com alto valor agregado como enzimas industriais e enriquecimento proteico da forrageira com base na proteína unicelular. Assim a utilização da palma como substrato em processos fermentativos é uma alternativa de renda para famílias do semiárido brasileiro.

#### REFERÊNCIAS

- ARAÚJO, L.F. **Enriquecimento protéico do mandacaru sem espinhos *Cereus jamacaru* (P.DC) e palma forrageira (*Opuntia ficus-indica* Mill) por fermentação semi-sólida.** Tese (Doutorado)-Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande, PB. 195p. 2004
- ARAÚJO, L.F.; SILVA, F.L.H.; BRITO, E.A. OLIVEIRA JÚNIOR S.; SANTOS, E.S. Enriquecimento protéico da palma forrageira com *Saccharomyces cerevisiae* para alimentação de ruminantes. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.60, n.2, p. 401-407, 2008.
- AMORIM, G. M. **Fermentação de farelo de cacau por *Aspergillus niger* para obtenção de lipase e biomassa para alimentação animal.** Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB). Itapetinga, BA, 2011.
- BON, E. P. S.; GÍRIO, F.; PEREIRA JUNIOR, N. Enzimas na produção de etanol. In: **Enzimas em Biotecnologia: Produção, Aplicações e Mercado.** 1ª ed. Rio de Janeiro. Bon, E. P. S., Corvo, M. L., Vermelho, A. B., Paiva, C. L. A., Ferrara, M. A., & Coelho, R. R. R. (eds.). Interciência Brasil. p. 241-271, 2008.
- CAMERON, M. D.; TOMIFEEVSKI, S.; AUST, D. S. Enzimology of *Phanerochaete chrysosporium* with respect to the degradation of recalcitrant compounds and xenobiotics. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 54, p. 751-758, 2000.

- CHANG, M. Harnessing energy from plant biomass. **Current Opinion in Chemical Biology**, v.11, n.1, p. 677–684, 2007.
- CHIACCHIO, F. B.; MESQUITA, A. S.; SANTOS, J. R. Palma forrageira: uma oportunidade econômica ainda desperdiçada para o semi-árido baiano. **Bahia Agrícola**, v.7, n.3, p.39-49, 2006.
- COLLINS, T.; GERDAY, C.; FELLER, G. Xylanases, xylanases families and extremophilic xylanases. **FEMS Microbiology Reviews**. v.29, n.1, p.3-23, 2005.
- EDC – Enzyme Development Company. **Enzymes Applications in Animal Feed**. Disponível em: <http://www.enzymedevelopment.com> Acesso em 6 nov. 2012. New York, 2004.
- ESPOSITO, E.; AZEVEDO, JL, **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. Editora Educs, Caxias do Sul 510p., 2004.
- FERRAZ, A. L. Fungos decompositores de materiais lignocelulolíticos. In: Esposito, E.; Azevedo, J.L. **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. Caxias do Sul: EDUCS Ed., 2004. p.213-242.
- FUJIAN, X.; HONGZHANG, C.; ZUOHU, L. Solid-state production of lignin peroxidase (LiP) and manganese peroxidase (MnP) by *Phanerochaete chrysosporium* using steam-exploded straw as substrate. **Bioresource Technology**, v. 80, n. 2, p. 149-151, 2001.
- GHORAI, S., BANIK, S.P., VERMA, D., CHOWDHURY, S., MUKHERJEE, S., & KHOWALA, S. Fungal Biotechnology in food and feed processing. **Food Research International**, v.42, n.1, 577-587. 2009
- LEONOWICZ, A.; MATUSZEWSKA, A.; LUTEREK, J.; ZIEGENHAGEN, D.; WOJTAS, M.; WASILEWSKA, LYND LR.; WEIMER, PJ.; VAN, ZYL.; WH PRETORIUS, IS. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews** n.66, v.3, p.506–577, 2002.

- LYND, L. R; WEIMER, P. J; ZYLWH, V.; PRETORIUS, I. S. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 66, n.1, p.506-77, 2002.
- MENEZES, G.D.G. **Produção de poligalacturonase pela linhagem *Aspergillus niger* mutante 3T5B8 por fermentação semi-sólida em biorreatores de coluna.** Dissertação (mestrado) – Instituto de Tecnologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 55p, 2006.
- MOREIRA, F.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e Bioquímica do Solo.** Editora UFLA, 2002. 623 p.
- MOREIRA NETO, S. L. **Enzimas lignolíticas produzidas por *Psilocybe castanella* CCB444 em solo contaminado com hexaclorobenzeno.** 2006. 124 folhas. Dissertação (mestrado) – Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, São Paulo, 2006
- MORGAVI, D. P., V. L. NSEREKO, L. M. RODE, K. A. BEAUCHEMIN, T. A. MCALLISTER, AND Y. WANG. A *Trichoderma* feed enzyme preparation enhances adhesion of *Fibrobacter succinogenes* to complex substrates but not to pure cellulose. Page 33 in **Chicago Rumen Function Conference**, Chicago, IL. 2000.
- PARK, C.; KAWAGUCHI, T.; SUMITANI, J.; TAKADA, G.; IZUMORI, K.; ARAI, M. Cloning and sequencing of a exoglucanase gene from *Streptomyces* sp. M23, and its expression in *Streptomyces lividans* TK-24. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.99, v.4, p.434-436, 2005.
- PARK, Y.; KANG, S.; LEE, J.; HONG, S.; KIM, S. Xylanase production in solid state fermentation by *Aspergillus niger* mutant using statistical experimental designs. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.58, n.6, p.761-766, 2002.
- PINTO, G. A. S.; BRITO E. S., ANDRADE, A. M. R., FRAGA, S. L. P., & TEIXEIRA, R. B. Fermentação em Estado Sólido: Uma Alternativa para o Aproveitamento e Valorização de Resíduos Agroindustriais Tropicais. **Comunicado Técnico 102, EMBRAPA, ISSN 1679-6535**, Fortaleza-CE, 2005.

- ROSA, C. A. R.; CAMPOS, S. G.; BARONI, F. A. **Práticas de micologia veterinária**. UFRRJ. Instituto de Veterinária. Departamento de Micologia e Imunologia Veterinária. Micologia Veterinária. Prática & Seropédia, 2002.
- ROWELL, M. R.; PETTERSEN, R.; HAN, J. S.; ROWELL, J. S.; TSHABALALA, M. A. **Cell wall chemistry** In: ROWELL, M. R. (Ed.). **Handbook of wood chemistry and wood composites**. Champagne: CRC Press, 487p., 2007.
- SAHA BC. Purification and properties of an extracellular  $\beta$ -xylosidase from a newly isolated *Fusarium proliferatum*. **Bioresource Technology**, v.90, p.33–38, 2003
- SANTOS, D.C.; FARIAS, I. LIRA; M. A. SANTOS; M. V. F. DOS; ARRUDA, G. P DE; COELHO, R. S. B; DIAS, F. M.; MELO, J. N DE: Manejo e utilização da palma forrageira (*Opuntia e Nopalea*) em Pernambuco. Recife, **IPA, (IPA-Documento 30)**, 48p.2006.
- SANTOS, T. C.; ABREU FILHO, G.; ROCHA, T. J. O.; FRANCO, M. Aplicação da fermentação em estado sólido sobre o farelo de cacau (*Theobroma Cacao L.*): Obtenção de ligninases. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v.32, n.1, p.87-96, 2011.
- SILVEIRA, C. M.; FURLONG, E. B. Caracterização de compostos nitrogenados presentes em farelos fermentados em estado sólido. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.27, n.4, p. 805-811. 2007.
- SIMÕES, M. L. G., TAUKE-TORNISIELO, S. M. Comparação da técnica tradicional e do método turbidimétrico automatizado no cultivo em diferentes fontes de carbono de fungos filamentosos isolados de solo de área de caatinga. **Holos Environment**, v.5, n.2, p.94-103, 2005.
- SLIVINSKI, C.T. **Produção, purificação parcial e caracterização bioquímica de glucoamilase de *Aspergillus niger* obtida por fermentação em estado sólido**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 92p. 2007.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant Physiology**. 3 rd .Sunderland: Sinauer Associates, 690p., 2002.

- VAN SOEST, P.J. **Nutritional ecology of the ruminant**. 2nd ed. Ithaca: Cornell University Press, 1994. 476p.
- VASCONCELOS, A. G. V.; LIRA, M. A.; CAVALCANTI, V. A. L.; SANTOS, M. V. F.; CÂMARA, T.; WILLADINO, L. Micropropagação de palma forrageira cv. Miúda (*Nopalea cochenillifera* - Salm Dyck). **Revista Brasileira de Ciências Agrárias** v.2, n.1, p.28-31, 2007.
- VILAS BOAS, S.G.; ESPOSITO, E. Bioconversão do bagaço de maçã: Enriquecimento nutricional utilizando fungos para produção de um alimento alternativo de alto valor agregado. **Revista Biotecnologia**, v.3, p.38-42, 2000.
- WAINWRIGHT, M. **Introducción a la biotecnología de los hongos**. Zaragoza: Acribia, 228p.1995.
- WESENBERG, D.; KYRIAKIDES, I., AGATHOS, S. N. White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents. **Biotechnology Advances**, v. 22, p. 161-187, 2003.

## CAPÍTULO II

### **Produção de celulases estáveis a temperatura e pH a partir da bioconversão da palma forrageira por *Aspergillus niger* e *Rhizopus sp.***

#### **Resumo**

Objetivou-se avaliar a utilização da palma forrageira como substrato para a produção de enzimas celulolíticas, através da fermentação em estado sólido com o auxílio dos fungos filamentosos *Aspergillus niger* e *Rhizopus sp.* Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Resíduos Agroindustriais, na Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – UESB. A palma foi desidratada até atingir aproximadamente 2% de umidade. As variáveis avaliadas no processo fermentativo foram, a atividade de água, tempo de fermentação e atividade de água, para adequação dos modelos lineares de segunda ordem para a estimativa de superfícies de respostas. Os tempos ótimos para as enzimas produzidas pelo *A. niger* foi de 70,35 h para endoglucanase a 4,165 U/mL de atividade enzimática, e 74,27 h para celulases totais a 30,923 U/mL, já para o *Rhizopus sp.* as melhores atividades enzimáticas foram encontradas em 68,12 h para a produção de endoglucanase com 7,859 U/mL e 72,48 h para celulases totais com 13,571 U/mL. As enzimas demonstraram grande tolerância a exposição em uma ampla faixa de temperatura e pH a cerca de 150 minutos como atividade relativa superior a 50% para todas as enzimas em ambas as análises. O complexo celulásico não sofre desativação considerável se armazenado congelado na temperatura de -18°C até 144 horas. A produção de enzimas celulásicas a partir da palma forrageira demonstra grande premissa em processos industriais.

**Palavras-chave:** desativação cinética enzimática, fungos filamentosos, modelos estatísticos-matemáticos.

### **Production of stable cellulases temperature and pH of the bioconversion from palm sweet *Aspergillus niger* and *Rhizopus sp.***

#### **Abstract**

This study aimed to evaluate the use of palm sweet as substrate for the production of cellulolytic enzymes by solid state fermentation with the aid of filamentous fungi *Aspergillus niger* and *Rhizopus sp.* The experiments were conducted at the Laboratory of Agro-Industrial Wastes, State University of Southwest Bahia - UESB. The palm was dehydrated until approximately 2% moisture. The variables were evaluated in the fermentation process, the water activity, fermentation time and water activity to adequacy of second order linear models for estimating the response surfaces. The optimal time for the enzymes produced by *A. niger* was 70.35 h for the endoglucanase 4.165 U/mL of enzyme activity, and 74.27 h for a total cellulases 30.923 U/mL, whereas for *Rhizopus*

*sp.* the best enzymatic activities were found in 68.12 h for the production of endoglucanase with 7.859 U/ml and 72.48 h for total cellulase to 13.571 U/ml. The enzymes proved to be highly tolerant to exposure in a wide range of temperature and pH about 150 minutes as a relative activity above 50% for all enzymes in both analyzes. The complex celulásico suffers no substantial deactivation was stored frozen at -18 ° C to 144 h. The production of enzymes celulásicas from the palm candy demonstrates great promise in industrial processes.

**Keywords:** mathematical-statistical models, enzyme thermostability, pH stability and deactivation enzyme kinetics.

## 2.1 - INTRODUÇÃO

A palma forrageira ou forrageira (*Nopalea coccinellifera*) é uma cactácea de origem mexicana, rústica, resistente e adaptada a regiões secas. No semiárido brasileiro, essa forrageira é aplicada nos diversos sistemas de produção pecuário, no entanto, é uma planta de enorme potencial produtivo e de múltiplas utilidades, podendo ser usada na alimentação humana, na produção de medicamentos, cosméticos e corantes, na conservação e recuperação de solos, como cercas vivas e paisagismo. A composição química relativa possui alto valor de nutrientes digestíveis totais. Os níveis de carboidratos solúveis também são elevados, bem como os teores de cinza, vitaminas e ferro, devendo serem destacados os teores de cálcio (3%); potássio (2,5%) e fósforo (0,15%) (CHIACCHIO *et al.* 2006), além de baixos teores de matéria seca (11,69 ± 2,56%), proteína bruta (4,81 ± 1,16%), fibra em detergente neutro (26,79 ± 5,07%) e fibra em detergente ácido (18,85 ± 3,17%) (SANTOS *et al.*, 2011a).

Essa planta é resistente à seca, sobrevivendo com pluviosidade mínima, estando amplamente difundida na região semiárida da Bahia, onde residem 48% da população estadual. O semiárido é caracterizado por solos rasos, pedregosos ou arenosos e com pouca matéria orgânica. As precipitações pluviométricas são irregulares e sua cobertura vegetal é constituída por plantas que suportam longos períodos de estiagem (CHIACCHIO *et al.*, 2006). Devido à sua composição essa biomassa vegetal apresenta potencial biotecnológico para a produção de compostos de interesse industrial como bioetanol, glicose, proteínas, enzimas e compostos de aroma, entre outros (SOCCOL *et al.*, 2010).

Dentre esses biocompostos, as enzimas são aplicadas em diversos processos industriais. Esse setor apresenta muitas iniciativas de pesquisa e desenvolvimento, resultando na produção de diversos produtos, além de melhoramento dos processos e do

desempenho já existentes no mercado. No entanto, o custo dessas enzimas é o que limita sua aplicação em grande escala. Reduzir os custos de produção é fundamental para estender essa aplicação (PARK *et al.*, 2005). Nesse sentido, estudar a aplicação da palma forrageira como matéria prima para bioprocessos, pode viabilizar essa aplicação (PANDEY *et al.*, 2005; ARAÚJO *et al.*, 2008; GHORAI *et al.*, 2009). O mercado global de enzimas movimentou aproximadamente US\$ 5,1 bilhões em 2008 e a projeção estimada para 2013 é de US\$ 7 bilhões. As pesquisas envolvem a otimização do processo e a produção de enzimas com potencial industrial visando à diversificação do comércio mundial (MENDES *et al.*, 2011).

Objetivou-se investigar a utilização da palma forrageira (*Nopalea cochenillifera*) como matéria prima para a produção de enzimas celulolíticas através do processo de fermentação em estado sólido (FES) com *Aspergillus niger* e *Rhizopus sp.*

## **2.2 – MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.2.1 – Material**

A palma forrageira foi coletada no campo Agrostológico da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – Campus de Itapetinga. Após a higienização e corte foi seca em estufa de secagem (SOLAB SL 102, Piracicaba-SP, Brasil) a 65 °C por 24 horas e trituradas em moinho tipo Willey (ACB LABOR, São Paulo-SP, Brasil) a uma granulométrica aproximada de 2 mm, assim como descrito por Santos *et al.* (2011a). Os microrganismos utilizados para a fermentação foram utilizados o *Aspergillus niger* e *Rhizopus sp.* proveniente do Laboratório de Aproveitamento de Resíduos Agroindustriais da UESB campus de Itapetinga. A cultura esporulada (em PDA HIMEDIA acidificado a pH 5,2 e inclinado) foi suspensa em solução de Tween 80 (VETEC) a 0,01% procedendo-se a contagem do número de esporos em suspensão, utilizando câmara de Neubauer dupla espelhada e microscópio binocular (SANTOS *et al.*, 2011).

### **2.2.2 – Condições experimentais e Métodos Analíticos**

Os ensaios foram realizados em erlenmeyers contendo 10 g de farelo de palma. Os cultivos foram conduzidos em estufa bacteriológica refrigerada com ventilação forçada (SOLAB SL 222/CFR Piracicaba, SP – Brazil). Após o processo fermentativo, a extração realizada foi mecânica (filtração por pressão) do extrato enzimático com solução tampão de citrato de sódio (SIGMA) com o pH 4,8 a 50 mM, o extrato enzimático

proveniente da fermentação foi recolhido e centrifugado a 1000 rpm por 10 minutos em centrífuga refrigerada a 4 °C (CIENITEC CT – 6000R Piracicaba, SP – Brazil).

### **2.2.3 – Quantificação da atividade cinética das enzimas**

#### **2.2.3.1 – Endoglucanase**

Para a atividade de endoglucanase, o método escolhido se baseia na dosagem de açúcares redutores produzidos pela degradação de carboximetilcelulose (CMC - QUIMICS) a 2 % (p/v) diluído previamente na solução citrato de sódio (QUIMICS) com o pH 4,8 a 50 mM, utilizando-se para tal o método do ácido dinitrosalicílico (DNS - SIGMA) (MILLER, 1959). Onde para os tubos contendo os ensaios reacionais foram adicionados 0,5 mL de solução tampão de citrato de sódio com o pH 4,8 a 50 mM, 0,5 mL de extrato enzimático e 0,5 mL de CMC, para o controle na reação foram adicionados 0,5 mL da mesma solução tampão e 0,5 mL de extrato enzimático. O branco da análise continha 0,5 mL de DNS e 0,5 mL de solução tampão. As amostras foram incubadas em estufa bacteriológica (SOLAB SL 222/CFR Piracicaba – SP – Brazil) a 50 °C por 10 minutos, a reação interrompida com a adição de 0,5 mL de DNS. Os tubos foram submergidos a água fervente por 5 minutos, logo após foram adicionados 6,5 mL de água destilada para posterior medição de absorbância na faixa de 540 nm realizada em espectrofotômetro (BEL PHOTONICS SF200DM – UV Vis – 1000 nm, Osasco – SP – Brazil). (GHOSE, 1987).

#### **2.2.3.2 – Celulases Totais (complexo exoglucanases e endoglucanases)**

A atividade de celulases totais foi determinada através da dosagem, pelo método do DNS, também através dos açúcares redutores liberados durante a degradação de uma tira de papel de filtro Whatman n° 1 medindo 1,0 cm x 6,0 cm. Onde para os tubos contendo os ensaios reacionais foram adicionados 1,0 mL de solução tampão de citrato de sódio com o pH 4,8 a 50 mM, 0,5 mL de extrato enzimático e uma tira de papel filtro, para o controle na reação foram adicionados 1 mL da mesma solução tampão e 0,5 mL de extrato enzimático, para o controle do substrato foram adicionados 1,5 mL de solução tampão e uma tira de papel filtro (GHOSE, 1987). As amostras foram incubadas em estufa bacteriológica (SOLAB SL 222/CFR Piracicaba – SP – Brazil) a 50 °C por 60 minutos, a reação interrompida com a adição de 3 mL de DNS. Os tubos foram submergidos a água

fervente por 5 minutos, logo após foram adicionados 20 mL de água destilada para posterior medição de absorvância na faixa de 540 nm realizada em espectrofotômetro (BEL PHOTONICS SF200DM – UV Vis – 1000 nm, Osasco – SP – Brazil). (GHOSE, 1987).

### **2.3.4 – Cálculo das atividades enzimáticas celulolíticas**

A curva padrão para a endoglicanase e celulases totais foi constituída a partir da determinação de glicose (SIGMA) nas concentrações de 0,1 a 2,0 g/L pelo método do DNS (MILLER, 1959) com posterior medição de absorvância na faixa de 540 nm realizada em espectrofotômetro (BEL PHOTONICS SF200DM – UV Vis – 1000 nm, Osasco – SP – Brazil). (GHOSE, 1987).

### **2.2.4 – Ensaio de termoestabilidade**

Com o objetivo de se determinar a estabilidade térmica das enzimas produzidas, os extratos enzimáticos foram submetidos às temperaturas de 20 °C a 100 °C, com intervalos de 10° C durante 0 a 240 minutos. Após o tempo de reação, os tubos foram colocados em banho de gelo por 5 minutos para encerrar a reação de hidrólise enzimática e seguirá a determinação das atividades enzimáticas conforme descrito anteriormente.

### **2.2.5 – Ensaio de estabilidade ao pH**

A estabilidade ao pH foi determinada por incubação retirando-se alíquotas durante 0 a 240 minutos incubação nos pHs: 3, 4, 5, 6, 7 e 8 em tampão citrato de sódio. A atividade de cada enzima foi avaliada de acordo com a otimização da metodologia de superfície de resposta em três repetições experimentais conforme descrito anteriormente.

### **2.2.6 – Cinética de desativação enzimática**

Após a interrupção da fermentação, porções de 100 mL de extratos enzimáticos foram armazenados a 4 ° C e -25 ° C. As alíquotas foram removidas em diferentes tempos intervalos (0, 24, 72, 96, 120 e 144 horas), para a determinação da atividade enzimática. A atividade de cada enzima foi avaliada de acordo com a otimização da metodologia de superfície de resposta em três repetições experimentais conforme descrito anteriormente.

### 2.2.7 – Análises estatísticas

O planejamento fatorial  $2^{3-1}$  fracionado constituiu, em dois níveis (-1 e +1), envolvendo as variáveis independentes citadas, contou ainda com 4 repetições no pontos centrais (nível zero) para o cálculo de resíduos e erro padrão, a partir do verificação dos resultados foram aplicados na metodologia de Superfície de Resposta (SR) e do Delineamento de Box e Behnken (DBB). Assim, o planejamento fatorial consistiu em 18 ensaios e os valores das variáveis estudadas estão descritos na Tabela 2.1.

**Tabela 2.1:** Valores codificados e valores reais para cada fator em estudo

Ensaio	Fatorial em valores codificados			Fatorial em valores reais		
	(X <sub>1</sub> , h)	(X <sub>2</sub> , a <sub>w</sub> )	(X <sub>3</sub> , °C)	(X <sub>1</sub> , h)	(X <sub>2</sub> , a <sub>w</sub> )	(X <sub>3</sub> , °C)
1	-1	-1	-1	24	0.786	25
2	-1	-1	+1	24	0.786	35
3	+1	-1	-1	120	0.786	25
4	+1	-1	+1	120	0.786	35
5	-1	+1	-1	24	0.903	25
6	-1	+1	+1	24	0.903	35
7	+1	+1	-1	120	0.903	25
8	+1	+1	+1	120	0.903	35
9	0	-1	0	72	0.786	30
10	0	+1	0	72	0.903	30
11	-1	0	0	24	0.865	30
12	+1	0	0	120	0.865	30
13	0	0	-1	72	0.865	25
14	0	0	+1	72	0.865	35
15	0	0	0	72	0.865	30
16	0	0	0	72	0.865	30
17	0	0	0	72	0.865	30

---

18	0	0	0	72	0.865	30
----	---	---	---	----	-------	----

---

\* Matriz do planejamento experimental.

A análise de variância (ANOVA) para os modelos foi realizada e a importância do modelo foi examinada pelo teste estatístico de Fisher (teste F) através do teste de diferenças significativas entre as fontes de variação nos resultados experimentais, ou seja, a significância da regressão (SOR), a falta de ajuste, e o coeficiente de determinação múltipla ( $R^2$ ). Em primeiro lugar, os resultados obtidos a partir de experiências foram submetidos a análise de variância ANOVA, e os efeitos foram considerados significativos quando  $p < 0,01$ . Com um modelo polinomial de segunda ordem (Eq. (1)), dados experimentais e de regressão coeficiente foram ajustadas e coeficientes de regressão foram obtido por regressão linear múltipla, onde  $b_0$ ,  $b_i$ ,  $b_{ii}$ ,  $b_{ij}$ , e  $b_{ijk}$  representar todo o processo constante efeito, os efeitos linear e quadrática de  $X_i$ , e o efeito de interação entre  $X_i$  e  $X_j$ ,  $X_i$ ,  $X_j$  e  $X_k$  sobre a atividade enzimática, respectivamente.

$$EA = \beta_0 + \sum \beta_i X_i + \sum \beta_{ii} X_i^2 + \sum \beta_{ij} X_i X_j + \sum \beta_{ijk} X_i X_j X_k \quad (1)$$

O software estatístico utilizado foi o *Statistical Analysis System*<sup>®</sup> (SAS) versão 9.3, para elaboração dos gráficos foi utilizado o software *Sigma Plot*<sup>®</sup> versão 11.0.

### 2.3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados experimentais para a atividade enzimática nas condições de atividade de água e tempo estudadas foram submetidos a ANOVA (Tabela 2.2) e análise de regressão.

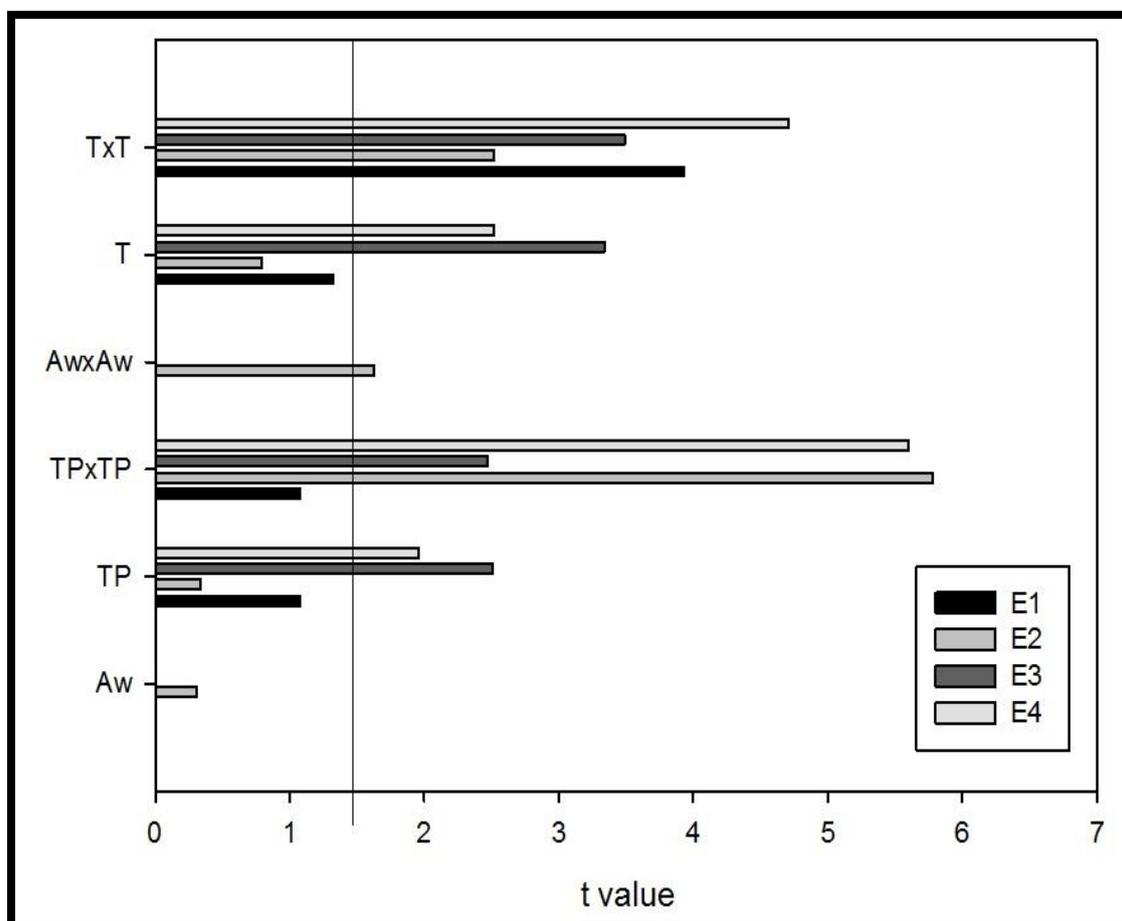
**Tabela 2.2** – Ajuste de dados obtidos a partir da ANOVA para o modelos de superfície de respostas quadráticas.

	GL	SQ	MS	F	P
<i>Aspergillus niger</i>					
Endoglucanase					
Modelo	4	16,83383	4,20846	11,52	0,0003
Erro	13	4,74997	0,36538		
Falta de ajuste	14	21,45091978	1,53220856	34,59	

Erro puro	3	0,132878	0,044229267		
Total	17	21,58380			
R <sup>2</sup>	0,7799				
Celulases Totais					
Modelo	6	1569,50352	261,58392	20,20	<0,0001
Erro	11	142,47331	12,9521		
Falta de ajuste	14	1711,909440	122,279246	5443,34	
Erro puro	3	0,067392	0,022464		
Total	17	1711,97683			
R <sup>2</sup>	0,9168				
<i>Rhizopus sp.</i>					
Endoglucanase					
Modelo	4	55,45346	13,86336	10,19	0,0006
Erro	13	17,68501	1,36039		
Falta de ajuste	14	73,05206400	5,21800457	181,18	
Erro puro	3	0,08640000	0,02880000		
Total	17	73,13846			
R <sup>2</sup>	0,7582				
Celulases Totais					
Modelo	4	207,97351	51,99338	1,61754	<0,0001
Erro	13	21,02796	1,61754		
Falta de ajuste	14	228,974976	16,3553554	1851,83	
Erro puro	3	0,026496	0,0088320		
Total	17	229,00147			
R <sup>2</sup>	0,9082				

O resultado da ANOVA pode ser visualizado em um gráfico de Pareto (Figura 2.1), em que o valor absoluto da amplitude do efeito estimado (o efeito de estimativa dividido pelo erro normal) de cada um dos fatores é traçada em ordem decrescente e comparada com magnitude de um fator estatisticamente significativo, com 99% de

confiança ( $p = 0,01$ ), representada pela linha vertical tracejada. As atividades enzimáticas estão designadas em E1 e E2 respectivamente endoglucanase e celulases totais produzidas pelo *Aspergillus niger*, e E3 e E4 endoglucanase e celulases totais produzidas pelo *Rhizopus sp.*



**Figura 2.1** – Pareto gráfico mostrando o significado das variáveis tempo de fermentação (T), atividade de água (aw) e temperatura (TP), em que E1 endoglucanase produzida pelo *A. niger*, E2 celulases totais produzidas pelo *A. niger*, E3 endoglucanase produzida pelo *Rhizopus sp.*, E4 celulases totais produzidas pelo *Rhizopus sp.*

A partir do gráfico de pareto é possível observar que a atividade de água só foi significativa para a celulases totais produzidas pelo *A. niger*. Por outro lado, o diagrama de Pareto mostra que o tempo e a temperatura possuem um efeito significativo para todas as enzimas avaliadas. Para todos os casos, as interações com as variáveis de temperatura, tempo, e teor de água não foram significativas para os modelos aqui encontrados. O comportamento dos sistemas estudados pode ser descrito por um modelo polinomial de segunda ordem, onde o termo de interação entre as variáveis independentes foi não

significativo ( $p > 0,01$ ). Os modelos reduzidos podem ser descritos por equações (2 - 5), em termos de valores não codificados.

$$E1 \quad -4,436 + 0,101X_1 - 0,0007X_1^2 + 0,290X_3 + 0,291X_3^2 \quad (2)$$

$$E2 \quad -3082,322 + 0,326X_1 + 7038,565 X_2 + 8,481X_3 - 0,00240 X_1^2 - 4163,338 X_2^2 - 0,142X_3^2 \quad (3)$$

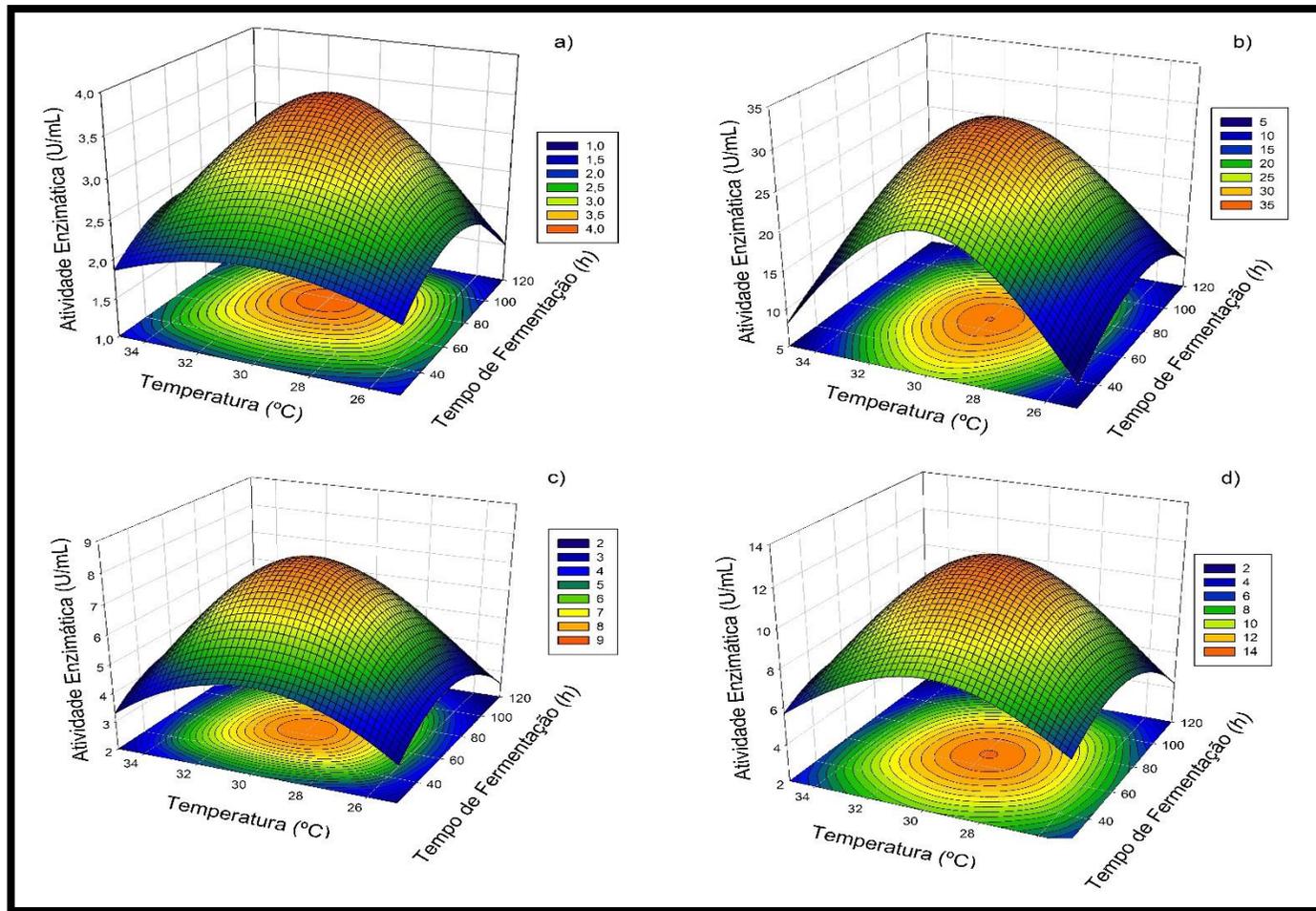
$$E3 \quad -59,3372 + 0,140X_1 + 0,042X_3 - 0,001 X_1^2 - 0,065X_3^2 \quad (4)$$

$$E4 \quad -71,17559 + 0,256X_1 + 5,051X_3 - 0,002X_1^2 - 0,085X_3^2 \quad (5)$$

A partir dos modelos foram plotados gráficos de superfície de resposta com base nas variáveis independentes tempo e temperatura, que estão representados na Figura 2.2. A influência significativa do tempo fermentativo com a produção enzimática onde o tempo médio entre 68 a 75 horas em todas as atividades enzimáticas. Os tempos ótimos para as enzimas produzidas pelo *A. niger* foi de 70,35 h para endoglucanase a 4,165 U/mL de atividade enzimática, e 74,27 h para celulases totais a 30,923 U/mL, já para o *Rhizopus sp.* as melhores atividades enzimáticas foram encontradas em 68,12 h para a produção de endoglucanase com 7,859 U/mL e 72,48 h para celulases totais com 13,571 U/mL.

Uma hipótese para esta decorrência é a presença dos nutrientes dispersos ao longo da fermentação pode ter contribuído para o crescimento do microrganismo, e o decaimento destes nutrientes ao longo do tempo pode ter interferido na atividade enzimática, e com isso houve o decaimento da produção microbiana e conseqüentemente a produção enzimática. Biazus *et al.* (2006), observou que a produção de enzimas, à princípio, é lenta, acelerando até alcançar seu valor máximo, em um dado momento.

A presença de metabólitos secundários promove a inibição na excreção enzimática promovendo a redução na atividade enzimática (SANTOS *et al.*, 2012), este processo também foi observado no presente trabalho. A literatura mostra a produção de endoglucanases por actinomicetos, em especial *Streptomyces* T3-1, produziu 40,3 U/mL em 1,5% de CMC e sulfato de amônio, ureia e peptona (JANG & CHEN, 2003). Jorgensen & Olsson (2006) obtiveram para *Penicilium brasilianum* IBT 20888, quando cultivado em biorreator em meio contendo extrato de levedura e madeira de um tipo de pinheiro submetido a explosão a vapor, valores de 0,59 U/mL de celulases totais.



**Figura 2.2** – Superfície de resposta das atividades enzimáticas em função do tempo de fermentação e temperatura: a) endoglucanase produzida pelo *A. niger*, b) celulases totais produzidas pelo *A. niger*, c) endoglucanase produzida pelo *Rhizopus sp.*, d) celulases totais produzidas pelo *Rhizopus sp.*

Em todos os trabalhos citados anteriormente os tempos de incubação variaram de 7 a 10 dias, bem maiores que aqueles utilizados que neste trabalho, é importante ressaltar que não foi utilizado nem um tipo de indutor, suprimento, além da palma *in natura*, ou pré-hidrólise do substrato, demonstrando assim que as enzimas são constitutivas.

A umidade é um fator crítico para o crescimento de fungos em substrato sólido. Como a quantidade de água é sempre limitada, o controle do nível de umidade é essencial para a otimização do processo em estado sólido. O teor de água adequada para o substrato deve permitir a formação de um filme de água na superfície, para facilitar a dissolução e a transferência de nutrientes e oxigênio. Entretanto, os espaços entre as partículas devem permanecer livres para permitir a difusão de oxigênio e a dissipação de calor (SANCHEZ, 2009). Para a produção das enzimas observadas as, somente as celulases totais quantificadas a partir da fermentação da palma com o *A. niger*, em que a otimização foi encontrada com 0,875  $a_w$ .

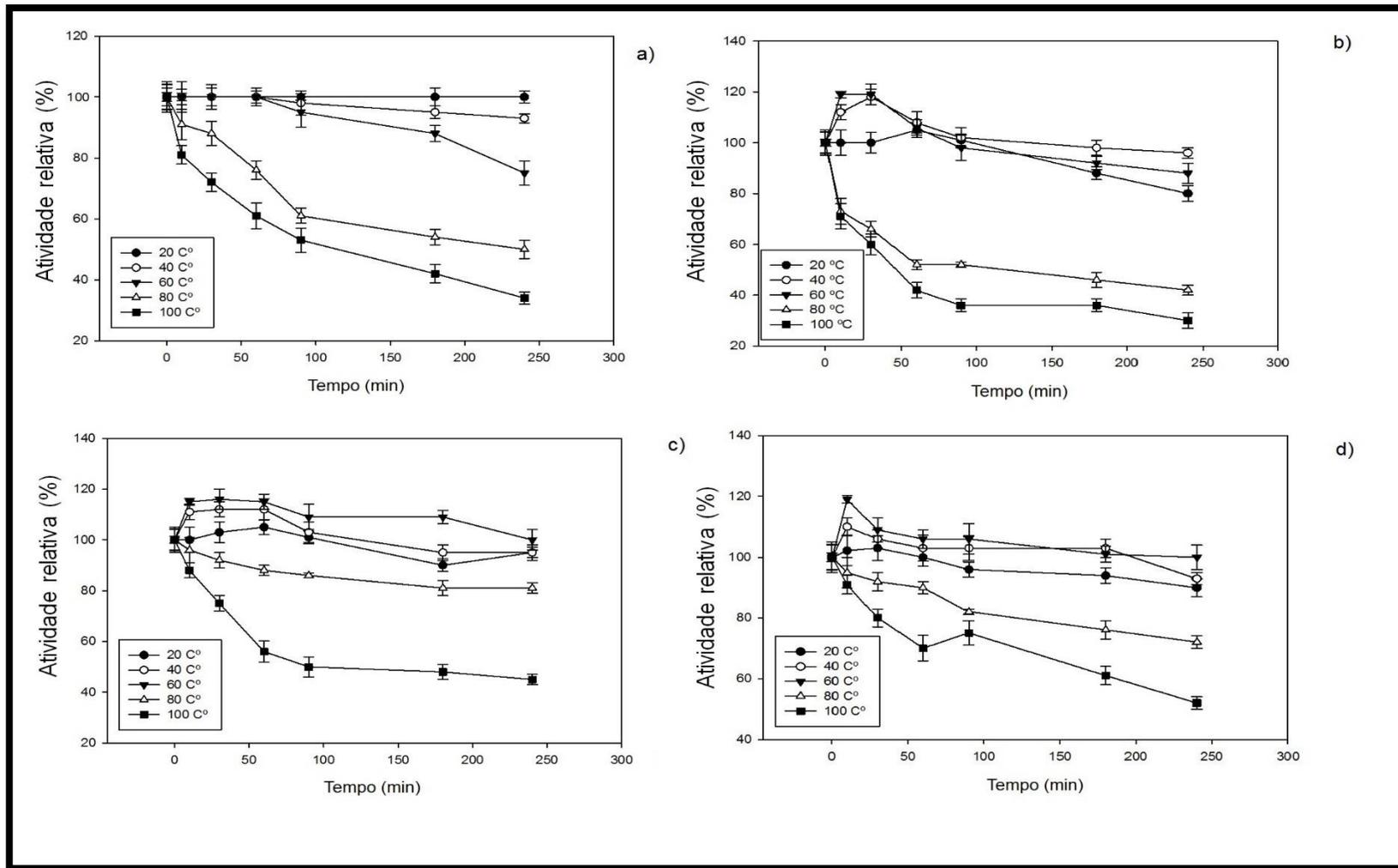
Uma explicação se dá pelo fato das três faixas de atividade de água escolhidas no planejamento experimental deste trabalho se encontraram entre os valores ideais para o crescimento da espécie fúngica, em hipótese os valores que foram avaliados já são adequados para a produção das demais enzimas. De acordo com Pelizer *et al.* (2003) a atividade de água influencia o crescimento microbiano e processos biológicos e enzimáticos. Cada microrganismo possui um limite mínimo de atividade de água para realizar suas atividades metabólicas. Portanto, a atividade de água ótima para fungos é em torno de 0,70; para leveduras 0,80 e, para bactérias, 0,90 (ARAÚJO *et al.*, 2005).

Em relação a temperatura foi observado que as melhores atividades estiveram entre 27 e 32 °C, o que pode está relacionado com a características metabólica dos microrganismos avaliados, por serem classificados como mesófilos a hipótese é que a maior atividade de síntese das enzimas aqui quantificadas esta nessa faixa. A otimização da temperatura para as enzimas produzidas pelo *A. niger* foi de 29,56 °C para endoglucanase e 31,22 °C para celulases totais, já para o *Rhizopus sp.* as melhores atividades enzimáticas foram encontradas em 30,41 °C para a produção de endoglucanase e 27,86 °C para celulases totais. Os processos fermentativos em estado sólido caracterizam-se por serem exotérmicos assim durante a FES grandes quantidades de calor são liberadas, sendo estas diretamente proporcionais à atividade metabólica do micro-organismo. Em fungos filamentosos, a temperatura influencia diretamente a germinação

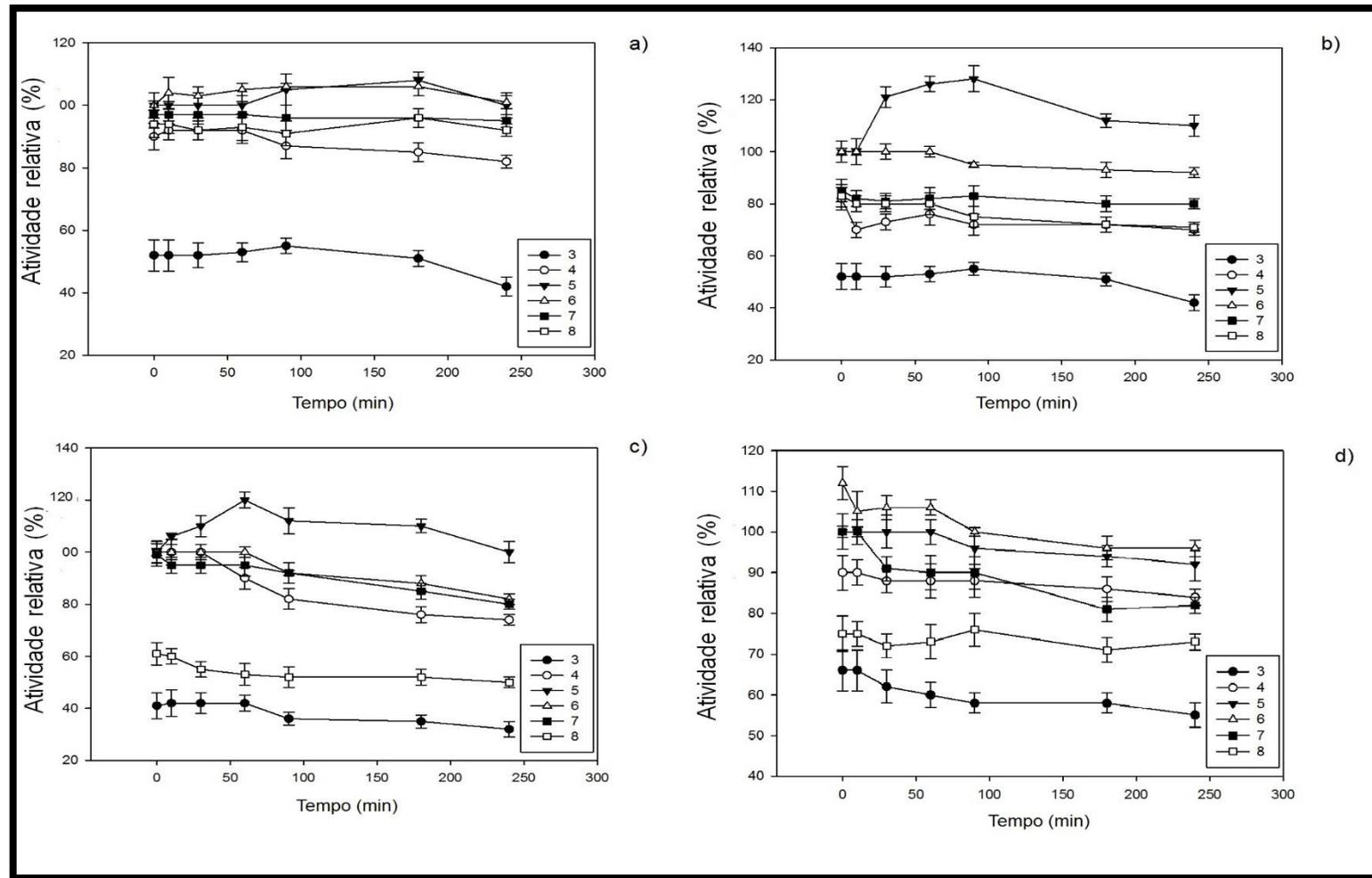
dos esporos, crescimento e formação de produtos. Praticamente em todas as FES, a temperatura é um fator crítico, devido ao acúmulo do calor metabólico gerado, pois, além da dificuldade de mistura do meio sólido, a maioria dos substratos utilizados possui baixa condutividade térmica, o que pode gerar gradientes de temperatura no biorreator (SANTOS, 2012).

As enzimas termoestáveis, de maneira geral, apresentam vantagens para a aplicação na indústria, visto que processos biotecnológicos conduzidos em elevadas temperaturas têm o risco de contaminação por microrganismos mesófilos, que são a maioria em um ambiente industrial, significativamente reduzido (PALMA-FERNANDEZ *et al.*, 2002). Por outro lado, as temperaturas mais elevadas favorecem a solubilidade de substratos e produtos, e aumentam as taxas de reação por redução da viscosidade e por aumento do coeficiente de difusão dos substratos (GOMES *et al.* 2007). Nas enzimas avaliadas neste trabalho (Figura 3.) todas permaneceram com pelo menos 75% de atividade relativa quando submetidas a 60 °C por 140 min, com destaque para a enzima endoglucanase produzida pelo *Rhizopus sp.* que permaneceu 85% ativa a 80 °C depois de 240 minutos de exposição.

Em relação a estabilidade ao pH (Figura 2.4), as enzimas demonstraram atividade relativa superior a 90% em pHs quantificados a 5 e 6 durante 240 minutos, as enzimas permaneceram ativas superior a 50% durante 180 minutos nas demais faixas de pH (3 a 8) o que denota estabilidade estrutural, o que indica que a atividade enzimática das enzimas foi também ácido-alcalino-tolerante, que habilita utilização destas em diferentes processos industriais.



**Figura 2.3** – Termoestabilidade enzimática: a) endoglucanase produzida pelo *A. niger*, b) celulases totais produzidas pelo *A. niger*, c) endoglucanase produzida pelo *Rhizopus sp.*, d) celulases totais produzidas pelo *Rhizopus sp.*

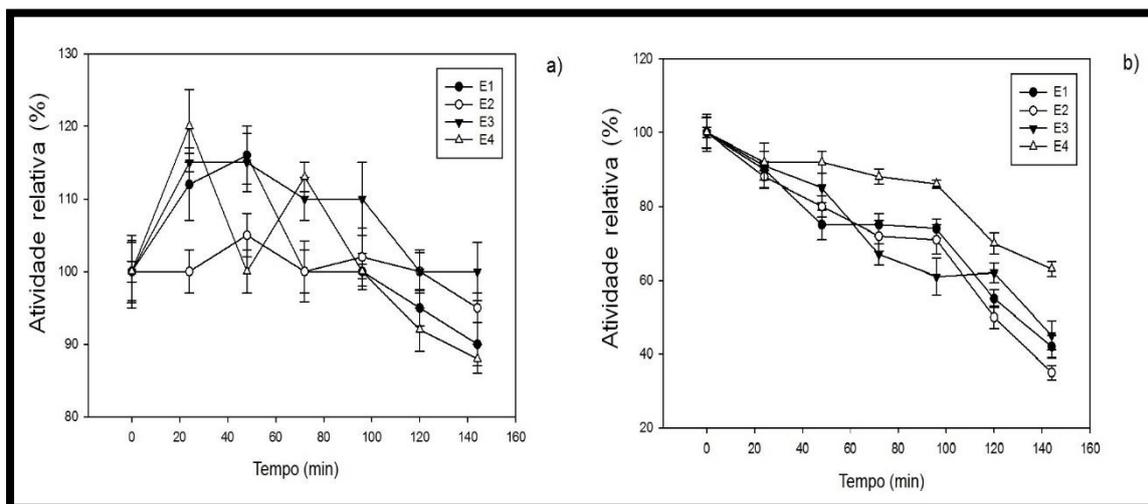


**Figura 2.4** – Estabilidade enzimática ao pH: a) endoglucanase produzida pelo *A. niger*, b) celulases totais produzidas pelo *A. niger*, c) endoglucanase produzida pelo *Rhizopus sp.*, d) celulases totais produzidas pelo *Rhizopus sp.*

Outro fator importante observado foi a cinética de desativação enzimática (Figura 2.5) que permite avaliar a perfil ativo das enzimas ao longo do tempo de armazenamento, no caso em duas diferentes temperaturas. Segundo Bailey & Ollis (1986), a desativação enzimática pode ocorrer pela influência de fatores como temperatura, pH, forças hidrodinâmicas, ausência de substrato, entre outras. Na temperatura de congelamento (-25 °C) não houve perdas bruscas na atividade enzimática em nenhuma das enzimas, mesmo após 144 horas, a atividade relativa do extrato enzimático bruto foi superior a 85%, o que demonstra a possibilidade de aplicação das enzimas em escala industrial.

O pode-se notar é que, o congelamento parece proporcionar aumento de cerca de 15% na atividade relativa em um determinado momento, a explicação se dá porque o congelamento afeta a estrutura original das proteínas, pois interfere na atividade da água provocando reestruturação da cadeia polipeptídica, após o descongelamento, as moléculas de enzimas poderão adquirir nova configuração que afetará a atividade enzimática, o processo de congelamento interrompe também reações químicas e atividades biológicas como mencionado por Aguiar & Lucena (2011).

Já em temperatura de refrigeração (4°C), foi notória a degradação devido ao crescimento microbiano no extrato enzimático. Durante o congelamento, a água livre cristaliza-se sendo indisponibilizada aos microrganismos presentes, os quais não se desenvolvem em temperatura superiores a -18°C (COLLA & PRENTICE-HERNÁNDEZ, 2003). Já na temperatura de refrigeração, sabe-se que a água permanecerá disponível para desenvolvimento dos microrganismos, o que justifica a degradação das



amostras.

**Figura 2.5** – Cinética de desativação enzimática. a) - 25 °C e b) 4 °C. E1 endoglucanase produzida pelo *A. niger*, E2 celulases totais produzidas pelo *A. niger*, E3 endoglucanase produzida pelo *Rhizopus sp.*, E4 celulases totais produzidas pelo *Rhizopus sp.*

## 2.4 – CONCLUSÃO

Os resultados indicam que o *Aspergillus niger* e o e *Rhizopus sp.* são bastantes promissores, no que se diz respeito à obtenção de enzimas celulósicas com a fermentação em estado solido da palma forrageira. As enzimas demonstraram grande tolerância a exposição em uma ampla faixa de temperatura e pH a cerca de 150 minutos como atividade relativa superior a 50%, para todas as enzimas em ambas as análises, o que indica grande relevância em aplicações industriais. O complexo celulásico não sofre desativação considerável se armazenado congelado na temperatura de -18°C até 144 horas, mas perde cerca de 60% de sua atividade de armazenamento a 4°C. Isto indica que o extrato bruto deve ser utilizado logo após a coleta ou então deverá ser congelado para uso posterior.

## 2.5 – AGRADECIMENTOS

Ao Banco do Nordeste do Brasil (BNB), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

## 2.6 – REFERÊNCIAS

- AGUIAR, C. M.; SÉRGIO, L. L. Produção de celulases por *Aspergillus niger* e cinética da desativação celulásica. **Acta Scientiarum Technology**, v. 33, n. 4, p. 385-391, 2011.
- ARAÚJO, L. F.; SILVA, F. L. H.; BRITO, E. A.; OLIVEIRA JÚNIOR, S.; SANTOS, E. S. Enriquecimento protéico da palma forrageira com *Saccharomyces cerevisiae* para alimentação de ruminantes, **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.60, n.2, 401-407, 2008.
- ARAÚJO, L.F.; MEDEIROS, A.N.; PERAZZO NETO, A.; OLIVEIRA, L. S. C.; SILVA, F. L. H. Protein Enrichment of Cactus Pear (*Opuntia ficus-indica* Mill) using *Saccharomyces cerevisiae* in solid-state fermentation. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.8, p.161-168, 2005.

- BIAZUS, J. P. M.; SOUZA, R. R.; SANTANA, J. C. C.; TAMBOURGI, E. B. Otimização da secagem do malte de *Zea mays*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.26, p.787-792, 2006.
- CHIACCHIO, F. B.; MESQUITA, A. S.; SANTOS, J. R. Palma forrageira: uma oportunidade econômica ainda desperdiçada para o semi-árido baiano. **Bahia Agrícola**, v.7, n.3, p.39-49, 2006.
- COLLA, L. M.; PRENTICE-HERNÁNDEZ, C. Congelamento e descongelamento – sua influência sobre os alimentos. **Vetor - Revista de Ciências Exatas e Engenharias**, v. 13, n. 1, p. 53-66, 2003.
- GHORAI, S.; BANIK, S.P.; VERMA, D.; CHOWDHURY, S.; MUKHERJEE, S.; KHOWALA, S. Fungal Biotechnology in food and feed processing. *Food Research International*, v.42, p.577-587, 2009.
- GHOSE T. K. Measurement of cellulase activities. **Pure & Applied Chemistry**, v.59, p.257-268, 1987.
- GOMES, E; GUEZ, M. A. U; MARTIN, N.; SILVA. R. Enzimas termoestáveis: fontes, produção e aplicação industrial. **Química Nova**, v.30, n.1, p. 136-145. 2007
- JANG, H. D.; CHEN, K. S. Production and characterization of thermostable cellulases from *Streptomyces transformant* T3-1. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 19, 263–268, 2003.
- JORGENSEN, H.; OLSSON, L. Production of cellulases by *Penicillium brasilianum* IBT 20888 – Effect of substrate on hydrolytic performance. **Enzyme and Microbial Technology**, 38, 381–390, 2006.
- MENDES, A. A.; OLIVEIRA, P. C.; CASTRO, H. F.; GIORDANO, R. L. C. Aplicação de Quitosana como suporte para a imobilização de enzimas de interesse industrial. **Química Nova**, v.34 n.5, p.831-840, 2011.

- MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, p. 426-428, 1959.
- PALMA-FERNANDEZ E. R.; GOMES, E.; SILVA, R. Purification and characterization of two  $\beta$ -glucosidases from the thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus*. **Folia Microbiologica**, v. 47, n. 6, p. 685-690, 2002.
- PANDEY, A.; WEBVB, C.; SOCCOL, C.R.; LARROCHE, C. Enzyme Technology. Ind ed. New Delhi: **Asiatech Publishers**. 760p, 2005.
- PARK, C.; KAWAGUCHI, T.; SUMITANI, J. Cloning and sequencing of a exoglucanase gene from *Streptomyces sp.* M23, and its expression in *Streptomyces lividans* TK-24. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 99, n. 4, p. 434-436, 2005.
- PELIZER, L.H.; PONTIERI, M.H.; MORAES, I. de O. Utilização de resíduos agroindustriais em processos biotecnológicos como perspectiva de redução do impacto ambiental. **Journal of Technology Management & Innovation**, 2: 118-127, 2007.
- SANCHEZ, C. Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi. **Biotechnology Advances**, v.27, n.21, 85-94, 2009.
- SANTOS, T. C.; ABREU FILHO, G.; ROCHA, T. J. O.; FRANCO, M. Aplicação da fermentação em estado sólido sobre o farelo de cacau (*Theobroma Cacao* L.): Obtenção de ligninases. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v.32, p.87-96, 2011a.
- SANTOS, T. C.; CAVALCANTI, I. S.; BONOMO, R. C. F.; SANTANA, N. B.; FRANCO, M. Optimization of productions of cellulolytic enzymes by *Aspergillus niger* using residue of mango a substrate. **Ciência Rural** (UFSM. Impreso), v. 41, p. 2210-2216, 2011b.

SANTOS, T. C.; GOMES, D. P. P.; BONOMO, R. C. F.; FRANCO, M. Optimisation of solid state fermentation of potato peel for the production of cellulolytic enzymes. **Food Chemistry**, v. 133, p. 1299-1304, 2012.

SOCCOL, C. R.; VANDENBERGHE, L. P. S.; MEDEIROS, A. B. P.; KARP, S. G.; BUCKERIDGE, M.; RAMOS, L. P.; PITARELO, A. P.; FERREIRA-LEITÃO, V.; GOTTSCHALK, L. M. F.; FERRARA, M. A.; BON, E. P. S.; MORAES, L. M. P.; ARAÚJO, J. A.; TORRES, F. A. G. Bioethanol from lignocelluloses: Status and perspectives in Brazil. **Bioresource Technology**, v.101, p.4820-4825, 2010.

## CAPÍTULO III

### **Aplicação da metodologia de superfície de resposta na produção, otimização e caracterização de $\beta$ -glucosidase e xilanase por fungos filamentosos**

**Resumo:** O presente trabalho teve como objetivo avaliar a utilização da palma forrageira como substrato para a produção das enzimas  $\beta$ -glucosidase e xilanase, através da fermentação em estado sólido com o auxílio dos fungos filamentosos *Aspergillus niger* e *Rhizopus sp.* Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Resíduos Agroindustriais, na Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – UESB. A palma foi desidratada até atingir aproximadamente 2% de umidade. As variáveis avaliadas no processo fermentativo foram, a atividade de água, tempo de fermentação e atividade de água, para adequação dos modelos lineares de segunda ordem para a estimativa de superfícies de respostas. A otimização das enzima  $\beta$ -glucosidase produzida pelo *A. niger* foram encontrados os valores de 74,23 horas de fermentação a 30,45 °C com atividade enzimática de 100,23 U/mL, já para a xilanase produzida pelo mesmo fungo os valores encontrados foram de 81,03 horas de fermentação e 32,11 °C apresentando 50,54 U/mL de atividade. Já para a espécie fúngica *Rhizopus sp.* a melhor produção da enzima  $\beta$ -glucosidase foi em h e a 30,68 °C com atividade enzimática quantificada a 47,81 U/mL, e para a xilanase a otimização esteve em 69,56 hora e 30,37 °C com 22,51 U/mL. As enzimas demonstraram grande tolerância a exposição em uma ampla faixa de temperatura e pH a cerca de 150 minutos como atividade relativa superior a 50% para todas as enzimas em ambas as análises. O complexo celulásico não sofre desativação considerável se armazenado congelado na temperatura de -18°C até 144 horas. A produção de enzimas celulásicas a partir da palma forrageira demonstra grande premissa em processos industriais.

**Palavras-chave:** Fungos filamentosos, *Nopalea cochenillifera*, superfície de resposta.

### **Application of response surface methodology in production, optimization and characterization of $\beta$ -glucosidase and xylanase by filamentous fungi**

**Abstract:** This study aimed to evaluate the use of cactus as a substrate for the production of the enzymes  $\beta$ -glucosidase and xylanase by solid state fermentation with the aid of filamentous fungi *Aspergillus niger* and *Rhizopus sp.* The experiments were conducted at the Laboratory of Agro-Industrial Wastes, State University of Southwest Bahia - UESB.

The palm was dehydrated until approximately 2% moisture. The variables were evaluated in the fermentation process, the water activity, fermentation time and water activity to adequacy of second order linear models for estimating the response surfaces. The optimization of the enzyme  $\beta$ -glucosidase produced by *A. niger* were found values of 74.23 hours of fermentation at 30.45 °C with enzyme activity of 100.23 U/mL, while for the xylanase produced by the same fungus values were 81.03 hours of fermentation and 32 11 °C showing 50.54 U/mL activity. As for the kind fúnjica *Rhizopus* sp. Best production of the enzyme  $\beta$ -glucosidase was hea 30.68 °C with enzyme activity quantified 47.81 U/mL, and the xylanase in the optimization was 69.56 hours and 30.37 °C to 22.51 U/mL. The enzymes proved to be highly tolerant to exposure in a wide range of temperature and pH about 150 minutes as a relative activity above 50% for all enzymes in both analyzes. The complex celulásico suffers no substantial deactivation was stored frozen at -18 °C to 144 hours. The production of enzymes celulásicas from cactus demonstrates great premise in industrial processes.

**Keywords:** filamentous fungi, *Nopalea cochenillifera*, response surface.

### 3.1 – INTRODUÇÃO

Material lignocelulósico consiste de principalmente três diferentes tipos de polímeros, denominados celulose, hemicelulose e lignina, os quais são associados uns com os outros (HENDRIK & ZEEMAN, 2008). A dificuldade de se converter os materiais lignocelulósicos em insumos químicos é atribuída as suas características químicas. Esses materiais são constituídos de microfibrilas de celulose envolvidas em uma matriz amorfa de polioses, que formam a hemicelulose, e lignina. Uma aplicação que vem tido destaque na quebra de materiais lignocelulósicos é a fermentação em estado solido com a utilização de fungos filamentosos, que podem crescer em substratos sólidos com pouca necessidade de água em meio livre (SOCCOL & VANDENBERGHE, 2003).

A utilização de catalisadores enzimáticos nos mais diferentes ramos industriais tem sido uma tendência cada vez maior em todo o mundo, sendo o valor total do mercado estimado em 2,3 bilhões de dólares anuais (MUSSATTO *et al.*, 2007). O mercado se encontra dividido em três segmentos, o de enzimas técnicas (constituído pelas indústrias de detergente, amido, têxtil, álcool combustível, polpa de papel e celulose e couro), alimentação e bebidas e alimentação animal (PANDEY, 2003). A atuação da fermentação em estado solido com uso de substratos orgânicos é vista como uma proposta atraente para a biocatálise de produtos com alto valor agregado como é o caso das enzimas industriais.

Bem adaptada morfofisiologicamente às condições adversas do semiárido, a palma forrageira foi introduzida no Brasil no século 18, proveniente das Ilhas Canárias. Esta cactácea passou a ser utilizada como forragem, a partir de 1915. Dentre os cultivares mais difundidos no Nordeste se destaca a palma doce, miúda ou forrageira (*Napolea cochellifera*) (ALBUQUERQUE & SANTOS, 2005). Como outras cactáceas, a palma forrageira apresenta resistência a longos períodos de estiagem, tolerando bem as condições edafoclimáticas da região.

De acordo com Vasconcelos *et al.* (2007) a palma possui grande quantidade de água, é rica em resíduos minerais como cálcio, magnésio, sódio e potássio e vitaminas A, C e do complexo B, apresenta elevado teor de carboidratos solúveis, além de alto coeficiente de digestibilidade da matéria seca, essas características fazem da palma um ótimo substrato para a fermentação em estado sólido na tentativa de produzir compostos de alto valor agregado.

Objetivou-se determinar a produção das enzimas  $\beta$ -glucosidase e endoxilânase, a partir da biotransformação da forrageira com o uso de duas espécies fúngicas o *Aspergillus niger* e o *Rhizopus sp.* Para a otimização enzimática realizou-se um estudo das condições ideais para produção a partir de da Metodologia de Superfície de Resposta (MSR) em conjunto com o Delineamento de Box-Behnken (DBB) com três variáveis independentes (tempo de fermentação, atividade de água e temperatura) para a determinação do efeito destas sobre a produção das enzimas  $\beta$ -glicosidase e xilanase.

## 3.2 – MATERIAIS E MÉTODOS

### 3.2.1– Material

A palma forrageira foi coletada no campo Agrostológico da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – Campus de Itapetinga. Após a higienização e corte foi seca em estufa de secagem (SOLAB SL 102, Piracicaba-SP, Brasil) a 65 °C por 24 horas e trituradas em moinho tipo Willey (ACB LABOR, São Paulo-SP, Brasil) a uma granulométrica aproximada de 2 mm, assim como descrito por Santos, *et al.* (2011a). Os microrganismo utilizados para a fermentação foi o *Aspergillus niger* proveniente do Laboratório de Aproveitamento de Resíduos Agroindustriais da UESB campus de Itapetinga. A cultura esporulada (em PDA HIMEDIA acidificado a pH 5,2 e inclinado) foi suspensa em solução de Tween 80 (VETEC) a 0,01% procedendo-se a contagem do

número de esporos em suspensão, utilizando câmara de Neubauer dupla espelhada e microscópio binocular (SANTOS *et al.* 2011).

### **3.2.2 – Condições experimentais e Métodos Analíticos**

Os ensaios foram realizados em erlenmeyers contendo 10 g de farelo de palma. Os cultivos foram conduzidos em estufa bacteriológica refrigerada com ventilação forçada (SOLAB SL 102, Piracicaba-SP, Brasil). Após o processo fermentativo, a extração realizada foi mecânica (filtração por pressão) do extrato enzimático com solução tampão de citrato de sódio (QUIMIS) com o pH 4,8 a 50 mM, o extrato enzimático proveniente da fermentação foi recolhido e centrifugado a 1000 rpm por 10 minutos em centrífuga refrigerada a 4 °C (CIENITEC CT – 6000R Piracicaba, SP – Brazil).

### **3.2.3 – Quantificação da atividade cinética das enzimas**

#### **3.2.3.1 Atividade de xilanase**

A atividade da enzima xilanase (endo-1,4-Z-xilanase, EC 3.2.1.8) foi determinada segundo Miller (1959). A reação consiste na mistura contendo 1 mL de sobrenadante da cultura (extrato enzimático), 1 mL de solução de 1% de xilana (SIGMA) em 0,05 M de tampão acetato pH 5,0, e 2 mL da solução de ácido 3,5- dinitrosalicílico (DNS) foi incubado em 50° C por 30 minutos, e o sistema enzima-substrato foi agitado periodicamente para manter a xilana em suspensão. Os tubos contendo as reações foram lidos em espectrofotômetro (BEL PHOTONICS SF200DM – UV Vis – 1000 nm, Osasco – SP – Brazil) em 540 nm (MILLER, 1959). Os valores foram expressos em U/mL, onde 1 unidade representa 1 mol de xilose produzido por minuto (GOKHALE, 1986).

#### **3.2.3.2 – Atividade de $\beta$ -glicosidase**

Adicionou-se 0,25 mL do extrato bruto a tubos de ensaio, em diluições apropriadas, juntamente com 0,5 mL de uma solução tampão citrato. O meio foi previamente incubado a 42° C e, em seguida, adicionou-se 0,25 mL de uma solução 0,04 M de p-nitrofenil- $\beta$ -D-glicopiranosídeo (pNPG, SIGMA) em tampão citrato. Após 10 minutos, adicionou-se 1,0 mL de uma solução 1mol/L de carbonato de sódio (SIGMA), interrompendo a reação por deslocar o pH para o meio básico, onde as enzimas não apresentam mais atividade e por ser o pH onde o p-nitrofenol exibe coloração amarela. A

concentração de glicose produzida foi determinada indiretamente pela medida da concentração de p-nitrofenol no meio reacional, por leitura em espectrofotômetro a 410 nm (BEL PHOTONICS SF200DM – UV Vis – 1000 nm, Osasco – SP – Brazil) (MATSUURA *et al*, 1995).

### **3.2.3.3 – Cálculo das atividades enzimáticas**

A curva de calibração  $\beta$ -glicosidase da foi construída com soluções padrão de p-nitrofenol (SIGMA) a 0,1 a 2 g/L. Já A curva de calibração da xilanase foi construída com soluções padrão de xilansa (SIGMA) a 0,1 a 2 g/L. A unidade de atividade enzimática (U) definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1  $\mu$ mol de açúcares redutores, por minuto a 50 °C, onde a atividade enzimática expressa em U/mL. A absorbância foi medida em 401 nm espectrofotômetro para a  $\beta$ -glicosidase, já a medição ocorreu em 540 nm para a xilanase.

### **3.2. 4 – Ensaios de termoestabilidade**

Com o objetivo de se determinar a estabilidade térmica das enzimas produzidas, os extratos enzimáticos relativos a otimização encontrada pelo delineamento experimental, foram submetidos às temperaturas de 20 °C a 100 °C, com intervalos de 10° C durante 0 a 240 minutos. Após o tempo de reação, os tubos foram colocados em banho de gelo por 5 minutos para encerrar a reação de hidrólise enzimática logo após foi efetuada determinação das atividades enzimáticas conforme descrito anteriormente em três repetições experimentais.

### **3.2. 5 – Ensaios de estabilidade ao pH**

A estabilidade ao pH foi determinada por incubação retirando-se alíquotas durante 0 a 240 minutos incubação nos pHs: 3, 4, 5, 6, 7 e 8 em tampão citrato de sódio. A atividade de cada enzima foi avaliada de acordo com a otimização metodologia de superfície de resposta em três repetições experimentais, as análises foram efetuadas a 25 °C.

### 3.2.5 – Cinética de desativação enzimática

Após a interrupção da fermentação, porções de 100 mL de extratos enzimáticos foram armazenados a 4 ° C e -25 ° C. As alíquotas foram removidas em diferentes tempos intervalos (0, 24, 72, 96, 120 e 144 horas), para a determinação da atividade enzimática. A atividade de cada enzima foi avaliada de acordo com a otimização da metodologia de superfície em três repetições experimentais.

### 3.2.6 – Análises estatísticas

O planejamento fatorial  $2^{3-1}$  fracionado constituiu, em dois níveis (-1 e +1), envolvendo as variáveis independentes citadas, contou ainda com quatro ensaios sob as condições do pontos centrais (nível zero) para o cálculo de resíduos e erro padrão, a partir do verificação dos resultados foram aplicados na metodologia de Superfície de Resposta (SR) e do Delineamento de Box e Behnken (DBB). Assim, o planejamento fatorial consistiu em 18 ensaios e os valores das variáveis estudadas estão descritos na Tabela 3.1.

**Tabela 3.1** – Valores codificados e valores reais para cada fator em estudo

Ensaio	Fatorial em valores codificados			Fatorial em valores reais		
	(X <sub>1</sub> , h)	(X <sub>2</sub> , a <sub>w</sub> )	(X <sub>3</sub> , °C)	(X <sub>1</sub> , h)	(X <sub>2</sub> , a <sub>w</sub> )	(X <sub>3</sub> , °C)
1	-1	-1	-1	24	0.786	25
2	-1	-1	+1	24	0.786	35
3	+1	-1	-1	120	0.786	25
4	+1	-1	+1	120	0.786	35
5	-1	+1	-1	24	0.903	25
6	-1	+1	+1	24	0.903	35
7	+1	+1	-1	120	0.903	25
8	+1	+1	+1	120	0.903	35
9	0	-1	0	72	0.786	30
10	0	+1	0	72	0.903	30
11	-1	0	0	24	0.865	30

12	+1	0	0	120	0.865	30
13	0	0	-1	72	0.865	25
14	0	0	+1	72	0.865	35
15	0	0	0	72	0.865	30
16	0	0	0	72	0.865	30
17	0	0	0	72	0.865	30
18	0	0	0	72	0.865	30

\* Matriz do planejamento experimental.

A análise de variância (ANOVA) para os modelos foi realizada e a importância do modelo foi examinada pelo teste estatístico de Fisher (teste F) através do teste de diferenças significativas entre as fontes de variação nos resultados experimentais, ou seja, a significância da regressão (SOR), a falta de ajuste, e o coeficiente de determinação múltipla ( $R^2$ ). Em primeiro lugar, os resultados obtidos a partir de experiências foram submetidos a análise de variância ANOVA, e os efeitos foram considerados significativos quando  $p < 0,01$ . Com um modelo polinomial de segunda ordem (Eq. (1)), dados experimentais e de regressão coeficiente foram ajustadas e coeficientes de regressão foram obtido por regressão linear múltipla, onde  $b_0$ ,  $b_i$ ,  $b_{ii}$ ,  $b_{ij}$ , e  $b_{ijk}$  representar todo o processo constante efeito, os efeitos linear e quadrática de  $X_i$ , e o efeito de interação entre  $X_i$  e  $X_j$ ,  $X_i$ ,  $X_j$  e  $X_k$  sobre a atividade enzimática, respectivamente.

$$EA = \beta_0 + \sum \beta_i X_i + \sum \beta_{ii} X_i^2 + \sum \beta_{ij} X_i X_j + \sum \beta_{ijk} X_i X_j X_k \quad (1)$$

O software estatístico utilizado foi o *Statistical Analysis System*<sup>®</sup> (SAS) versão 9.3, para elaboração dos gráficos foi utilizado o software *Sigma Plot*<sup>®</sup> versão 11.0.

### 3.3 – RESULTADOS E DISCURSÃO

Os fungos filamentosos demonstraram capacidade para produzir as frações celulásicas conforme afirmam Santos *et al.* (2012). A partir dos valores experimentais foram elaborados os ajustes estatísticos com a finalidade de gerar modelos significativos,

com base no teste de Fisher e no  $R^2$ . Na Tabela 3.2 são apresentadas os valores da ANOVA para a validação dos modelos estatísticos.

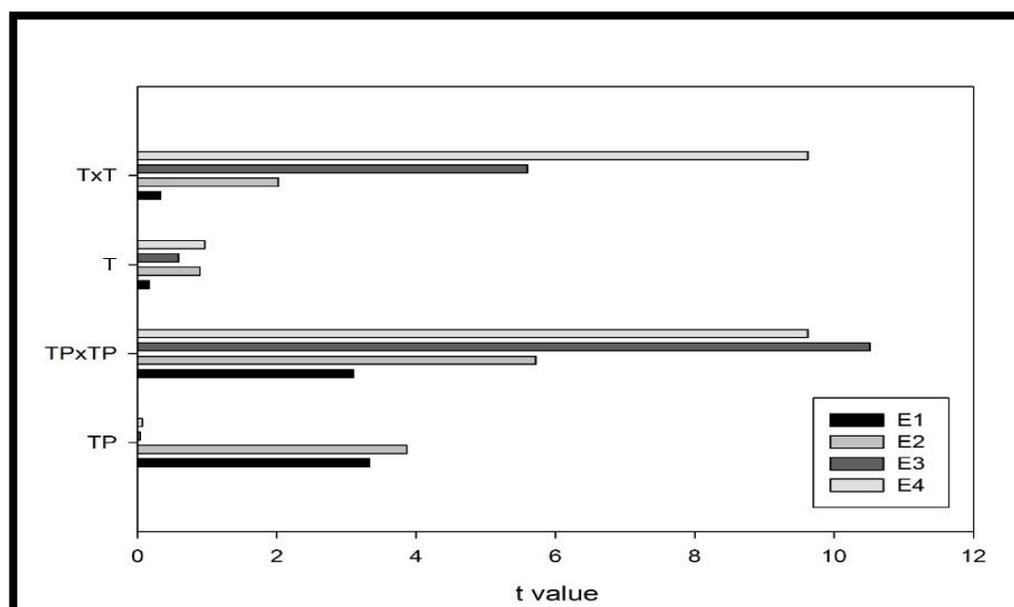
De acordo com Granato *et al.* (2010), para validar o modelo ajustado os valores otimizados das variáveis independentes devem ser usados no procedimento inicial a fim de verificar o poder de previsão dos modelos desenvolvidos por meio da comparação de dados teóricos previsto para o modelo experimental.

**Tabela 3.2** – Ajuste de dados obtidos a partir da ANOVA para os modelos de superfície de respostas quadráticas.

	GL	SQ	QM	F	P
<i>Aspergillus niger</i>					
Xilanase					
Modelo	4	3534,107585	252,436256	38,41	0,0059
Erro	13	19,718919	6,522973		
Falta de ajuste	14	2771,59913	692,89978	11,52	
Erro puro	3	782,22737	60,17134		
Total	17	3553,826505			
$R^2$		0,9944			
β-glucosidase					
Modelo	4	7321,2840	1830,3260	21,71	<0,0001
Erro	13	1096,24525	84,32656		
Falta de ajuste	14	8376,015150	598,286796	43,24	
Erro puro	3	41,512500	13,837500		
Total	17	8417,527650			
$R^2$		0,9951			
<i>Rhizopus sp.</i>					
Xilanase					
Modelo	4	921,28287	230,32072	62,19	0,0001
Erro	13	48,14303	3,700331		
Falta de ajuste	14	969,3867707	69,2419122	5309,31	

Erro puro	3	0,0391248	0,0130416		
Total	17	969,425856			
R <sup>2</sup>	0,9999				
<hr/>					
β-glucosidase					
Modelo	4	2540,53159	635,13290	18,17	<0,0001
Erro	13	454,30627	34,94664		
Falta de ajuste	14	2993,470988	213,819356	469,29	
Erro puro	3	1,3366975	0,456225		
Total	17	2994,837863			
R <sup>2</sup>	0,9995				

De acordo com Granato *et al.* (2010), para validar o modelo ajustado os valores otimizados das variáveis independentes devem ser usados no procedimento inicial a fim de verificar o poder de previsão dos modelos desenvolvidos por meio da comparação de dados teóricos previsto para o modelo experimental. Na figura 3.2 são representadas os valores do teste t em gráfico de Pareto que demonstra as significância das variáveis estudadas na constituição dos modelos matemáticos.



**Figura 3.1** – Pareto gráfico mostrando a significancia das variáveis tempo de fermentação (T) e temperatura (TP), em que E1 endoglucanase produzida pelo *A. niger*, E2 celulasas totais produzidas pelo *A. niger*, E3 endoglucanase produzida pelo *Rhizopus sp.*, E4 celulasas totais produzidas pelo *Rhizopus sp.*

A partir dos dados apresentados no gráfico de Pareto é possível visualizar que para nenhuma das enzimas quantificadas o efeito de variação da atividade de água foi válido, de acordo Araujo *et al.* (2005), com pesquisas com a palma forrageira obteve resultados que demonstram que acontece pelo fato da atividade de crescimento fúngico está na faixa de atividade de água entre 0,7 a 0,9  $a_w$ , faixa esta que foi a mesma que a utilizada no trabalho, assim o fungo obteve o crescimento em todas as atividades de água testadas não apresentando diferença significativa entre o desenvolvimento fúngico e entre a síntese enzimática.

A temperatura foi a variável mais significativa para a produção das enzimas xilanase sintetizada pelo *A. niger* e  $\beta$ -glucosidase produzida pelo *Rhizopus sp.*, já para a  $\beta$ -glucosidase pelo sintetizada pelo *A.niger* e a xilanase produzida pelo *Rhizophus sp.* a variável que obteve mais significância foi o tempo de fermentação. Abaixo estão descritos os modelos propostos para cada atividade enzimática, que podem ser descritos por equações (2 - 5), em termos de valores não codificados.

$$E1 = -369,3072 + 1,3581X_1 - 0,0091X_1^2 + 26,6182X_3 - 0,4438X_3^2 \quad (2)$$

$$E2 = -134,1806 + 1,2641X_1 - 0,1313X_1^2 + 8,0035X_3 - 0,13129X_3^2 \quad (3)$$

$$E3 = -267,0128 + 1,1319X_1 - 0,0077X_1^2 + 17,7049X_3 - 0,29561X_3^2 \quad (4)$$

$$E4 = -161,7754 + 0,5706X_1 - 0,0039X_1^2 + 10,6561X_3 - 0,17773X_3^2 \quad (5)$$

A partir dos modelos foram plotados gráficos de superfície de resposta com base nas variáveis independentes tempo e temperatura, que estão representados na Figura 2. A otimização das enzima  $\beta$ -glucosidase produzida pelo *A. niger* foram encontrados os valores de 74,23 horas de fermentação a 30,45 °C com atividade enzimática de 100,23 U/mL, já para a xilanase produzida pelo mesmo fungo os valores encontrados foram de 81,03 horas de fermentação e 32,11 °C apresentando 50,54 U/mL de atividade. Já para a espécie fúngica *Rhizopus sp.* a melhor produção da enzima  $\beta$ -glucosidase foi em h e a 30,68 °C com atividade enzimática quantificada a 47,81 U/mL, e para a xilanase a otimização esteve em 69,56 hora e 30,37 °C com 22,51 U/mL.

Enzimas normalmente sintetizadas por fungos filamentosos possuem um mecanismo de controle de expressão que pode ser estimulada ou inibida pelo substrato utilizado como meio de consumo. Os produtos finais de uma determinada via metabólica são frequentemente inibidores das enzimas que catalisam os primeiros passos da via. Este mecanismo é conhecido como feedback negativo (SANTANA *et al.*, 2012). Essa relação pode ilustrar o que foi notado no perfil fermentativo, em que com o aumento do tempo fermentativo ocorre o decréscimo das atividades fúngicas. Biazus *et al.* (2006), trabalhando com malte de milho, observou que na produção de enzimas o início é lento, depois acelera até atingir o seu valor máximo; depois disso, a concentração de produtos gerados são inibidas e a sua atividade é reduzida, o que também foi observado no presente estudo

Omemu *et al.* (2005), obteve rendimentos mais elevados de hidrólise do amido de mandioca por *A. niger* após 72 h de fermentação, que está de acordo com Alva *et al.* (2007), que também relataram maior atividade enzimática por *Aspergillus*. Santos *et al.* (2012), obteve resultados semelhantes na produção de celulasas com *Rhizopus sp.*, com produção ótima em torno de 70 a 80 horas de fermentação.

Com isso a diminuição da atividade com aumento do tempo de incubação pode estar relacionada à produção de subprodutos resultante do metabolismo microbiano, bem como de nutrientes esgotamento, inibindo o crescimento de fungos e de enzimas formação (SHAFIQUE *et al.* 2009). Em relação a temperatura ótima, que para todas as enzimas foi por volta de 30 °C, poder em consequência das espécies fúngicas filamentosas possuírem tem atividade metabólicas mesófilas, em que o seu crescimento está associado a temperaturas de 28 a 35 °C de acordo com Santos *et al.* (2011).

Os resultados encontrados para xilanase com o fungo *A. niger* ficaram cima dos obtidos por Qinnghé *et al.* (2004), que obtiveram 24,98 U/mL, utilizando como substrato sabugo de milho e aveia utilizando fungo *Pleurotus ostreatus*- CY012 em fermentação líquida. Korotkova *et al.* (2009), verificou que a  $\beta$ -glicosidase de *Aspergillus japonicus* apresentou elevada atividade sobre substratos de baixo peso molecular, como celobiose e p-NPG (105 e 124 U/mL, respectivamente) e baixa atividade sobre polissacarídeos, como  $\beta$ -glucana (9 U/mL).

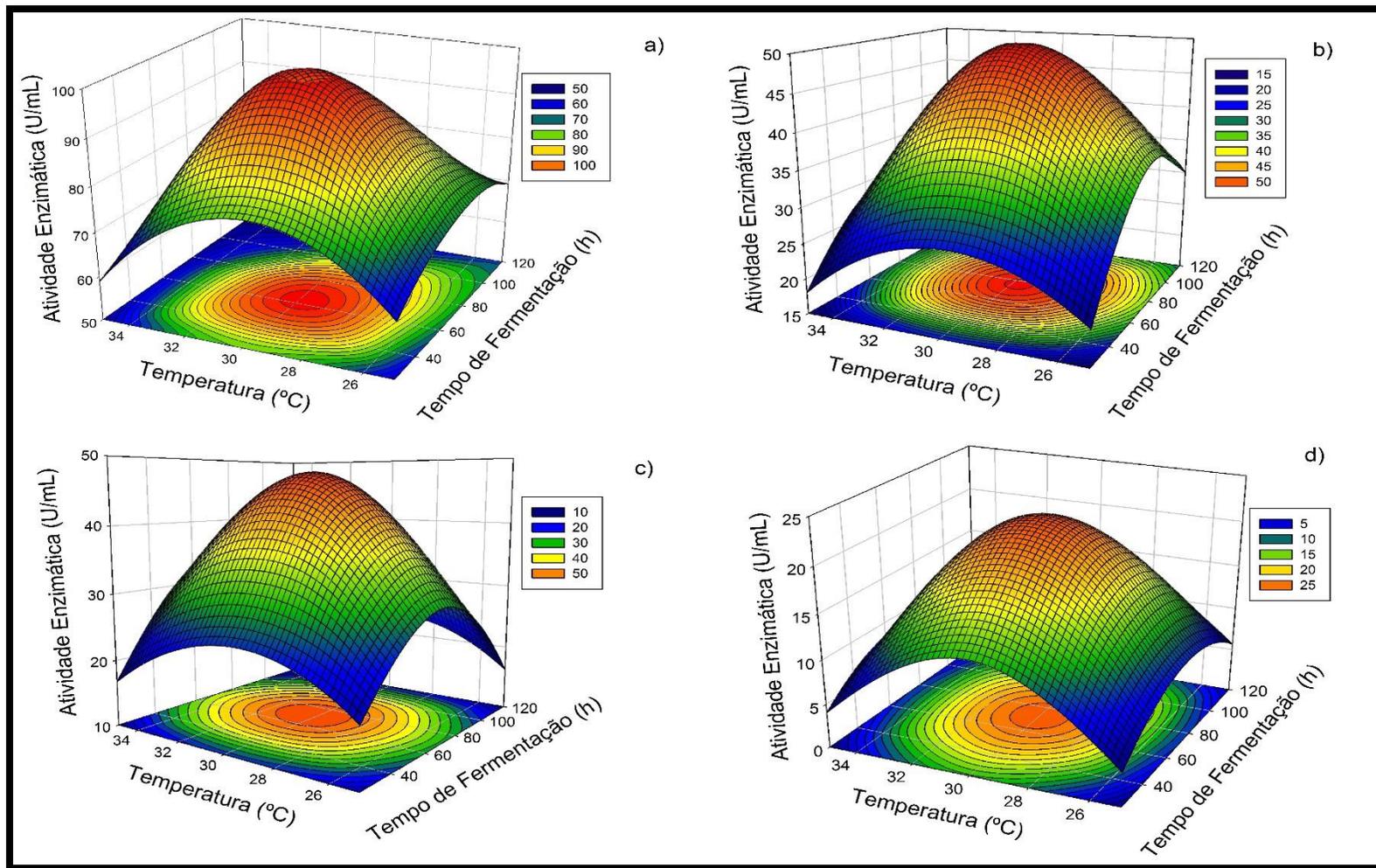
Em todos os estudos mencionados, tempos de incubação variou de 7 a 15 dias, com o tempo fermentativos superiores aos encontrados no presente trabalho. Outra

importante ressalva é que em nenhum momento durante o período fermentativo foi adicionado nenhum suplemento carbonáceo além da palma, demonstrando assim que as enzimas são constitutivas. Para caracterização das enzimas otimizadas foram efetuados ensaios de termoestabilidade (Figura 3.3) e estabilidade em pH (Figura 3.4), com o intuito de prevê a possibilidade do uso em processos industriais.

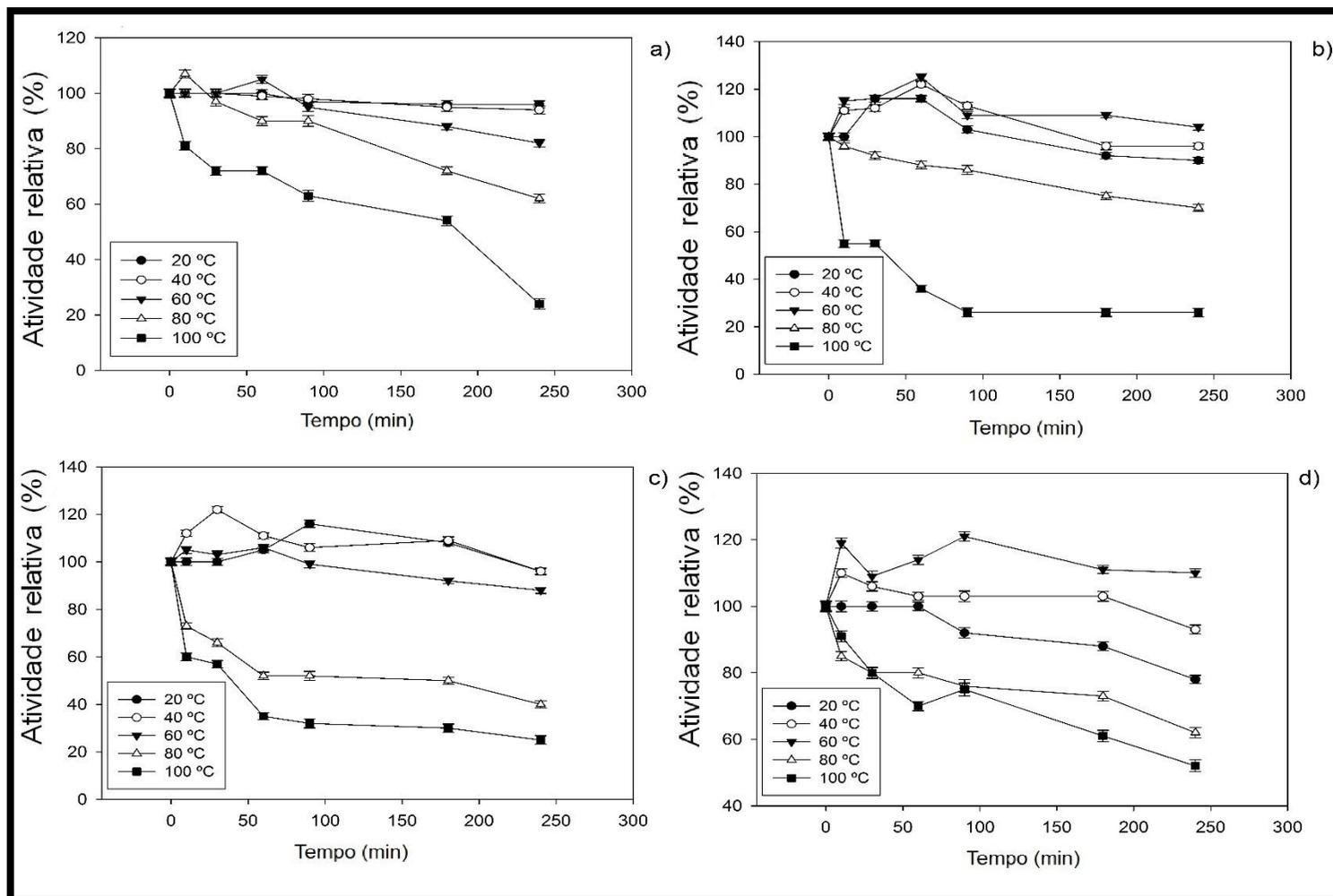
Observou-se que a pré-incubação da enzima por até 240 minutos a 60 °C não afetou negativamente as atividades enzimáticas (Figura 3.4) para todas as enzimas, mostrando um pequeno aumento entre 50 a 100 minutos de incubação. Já a incubação a 80 °C apresentou efeito adverso na atividade das enzimas, sendo observada queda na atividades enzimáticas em incubações superiores a 10 minutos.

Após 240 minutos a 80 °C, as atividades relativas da  $\beta$ -glucosidase e xilanase produzidas pelo *A. niger* foram de 62% e 70%, já para as enzimas sintetizadas pelo *Rhizophus sp.* as atividade relativa foi de 40% para a  $\beta$ -glucosidase, para a xilanase a 62%, o que demonstra que as enzimas produzidas pelo *A. niger* demonstraram estabilidade de temperatura superior que as sintetizadas pelo *Rhizophus sp.* A estabilidade das enzimas a 100°C foram abaixo de 26% depois de 240 minutos, contudo a atividade relativa da xilanase produzida pelo *Rhizophus sp.* foi de 52% após 240 minutos.

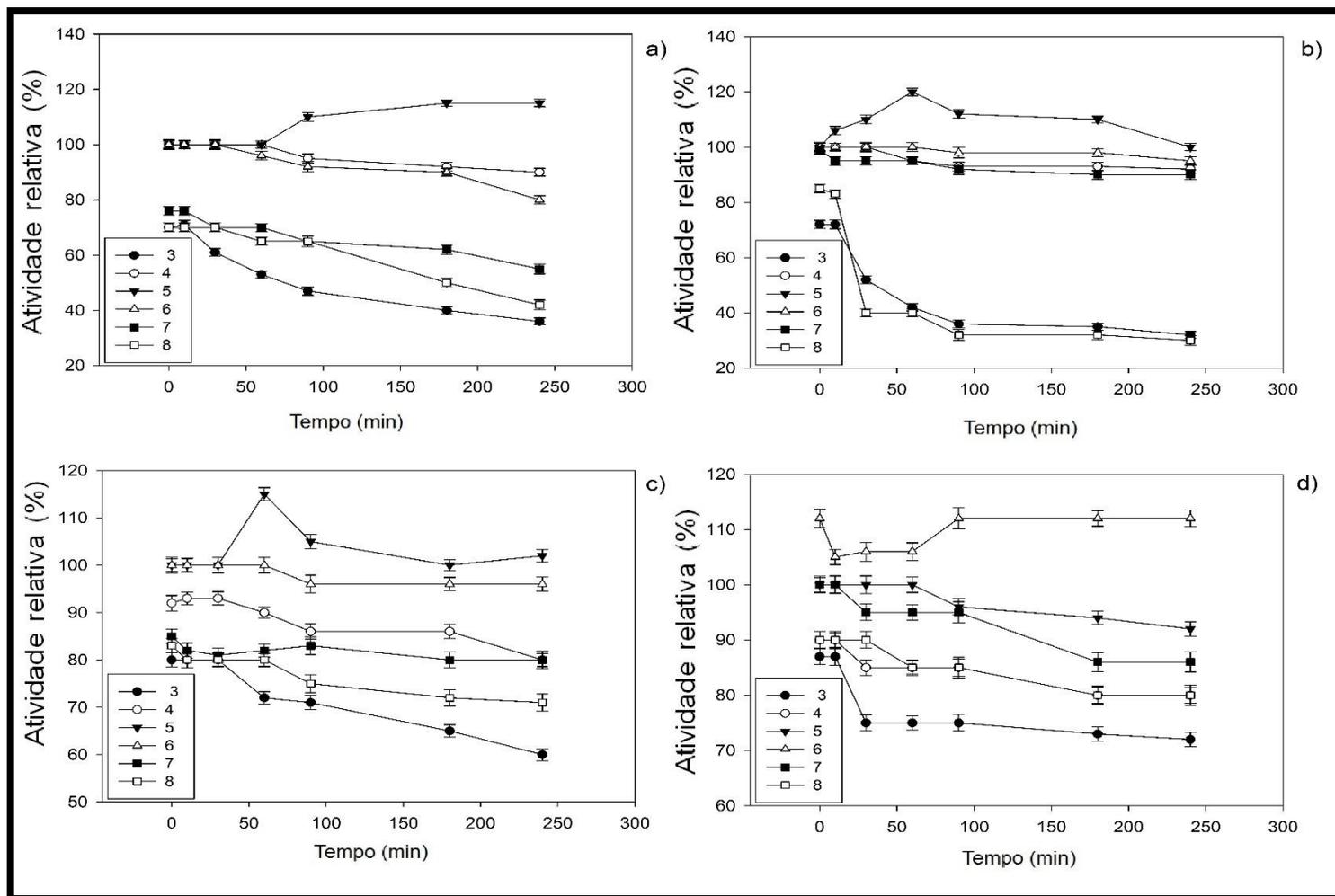
De forma semelhante ao observado neste estudo, as  $\beta$ -glucosidases extracelulares de *A. phoenicis*, *A. niger* e *A. carbonarius*, utilizando celobiose e glicose como fonte de carbono, permaneceram estáveis por duas horas em temperaturas de até 50 °C, mantiveram 87%, 64% e 53% da atividade, respectivamente, após duas horas a 60 °C, mas foram inativadas após duas horas a 70 °C (JÄGER *et al.*, 2001). Por outro lado,  $\beta$ -glucosidase extracelular de *A. oryzae* não foi afetada por pré-incubação de 5 horas a 60 °C (RIOU *et al.*, 1998). Nos estudos realizados por Shah & Madamwar (2005), a atividade de xilanase produzida por *A. foetidus* não foi afetada por 57,53 minutos à 50 °C, a qual foi menor do que a obtida neste trabalho. No entanto, os autores destacam que a termoestabilidade foi aumentada pela aplicação dos aditivos: glicerol, trealose e  $\text{Ca}^{++}$ .



**Figura 3.2** – Superfície de resposta das atividades enzimáticas em função do tempo de fermentação e temperatura: a) endoglucanase produzida pelo *A. niger*, b) celulases totais produzidas pelo *A. niger*, c) endoglucanase produzida pelo *Rhizopus sp.*, d) celulases totais produzidas pelo *Rhizopus sp.*



**Figura 3.3** – Termoestabilidade enzimática: a)  $\beta$ -glucosidase produzida pelo *A. niger*, b) xilanase produzida pelo *A. niger*, c)  $\beta$ -glucosidase produzida pelo *Rhizopus sp.*, d) xilanase produzida pelo *Rhizopus sp.*

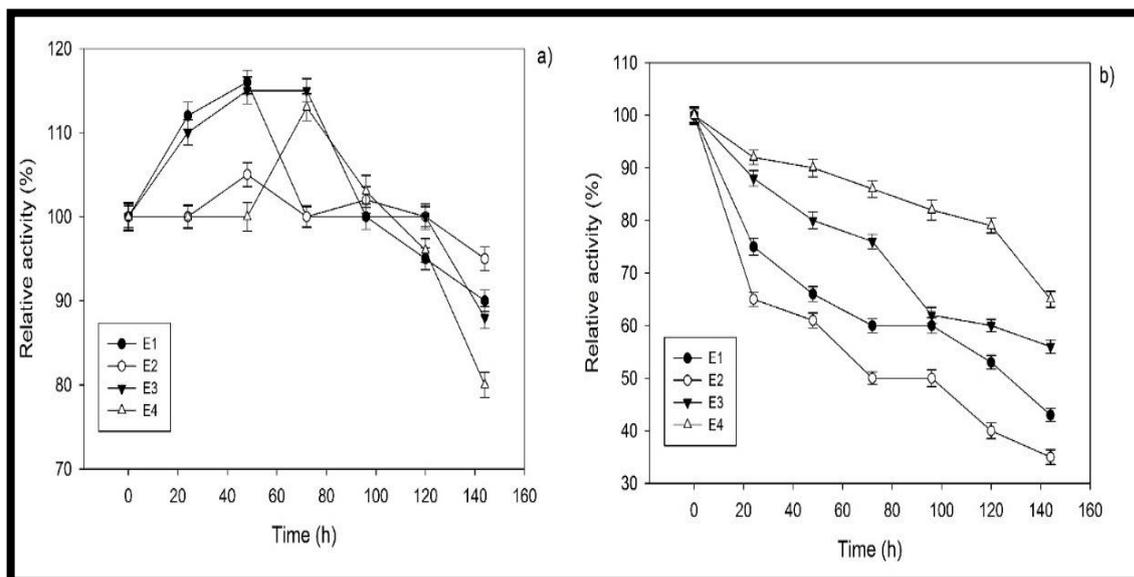


**Figura 3.4** – Estabilidade enzimática ao pH: a)  $\beta$ -glucosidase produzida pelo *A. niger*, b) xilanase produzida pelo *A. niger*, c)  $\beta$ -glucosidase produzida pelo *Rhizopus sp.*, d) xilanase produzida pelo *Rhizopus sp.*

Em fungos filamentosos, a estabilidade térmica e ao pH é geralmente superior à observada em leveduras e bactérias (BELANCIC *et al.*, 2003; WALLECHA & MISHRA, 2003; SARRY & GÜNATA, 2004; SESTELO *et al.*, 2004). Fato este que pode estar associado ao bom desempenho das enzimas aqui estudadas já que para todas as análises foi utilizado o extrato bruto.

As  $\beta$ -glicosidases purificadas de linhagens de *A. oryzae* estudadas por Langston *et al.* (2006) e Zhang *et al.* (2007) apresentaram atividade ótima em pH 5,0. No estudo realizado por Heidorne *et al.* 2006, a estabilidade de xilanases produzidas a partir de madeira por *Ceriporiopsis subvermispora*, foi máxima em pH 5,0, mantendo atividades elevadas após a incubação em pHs variando de 3,5 até 6,5.

Para verificar o potencial de armazenamento das enzimas foi realizado o ensaio de cinética de desativação, o qual observa durante certo período o comportamento da atividade enzimática em uma dada temperatura, na figura 5 é possível notar a variação da atividade relativa durante 140 horas de armazenamento.



**Figura 3.5** – Cinética de desativação enzimática. a) - 25 °C e b) 4 °C. E1 endoglucanase produzida pelo *A. niger*, E2 celulases totais produzidas pelo *A. niger*, E3 endoglucanase produzida pelo *Rhizopus sp.*, E4 celulases totais produzidas pelo *Rhizopus sp.*

Observa-se na Figura 3.5 a), que as atividades mantiveram-se praticamente constantes ou acima de 100% após 100 horas de armazenamento a temperatura de -25°C, com posterior queda, porém após 140 horas armazenamento a essa temperatura. Assim, pode-se afirmar que o complexo enzimático permanece estável a esta temperatura por

pelo menos 100 horas, nas condições estudadas, sem nenhum tipo de conservante, liofilização, purificação ou imobilização.

As atividades relativas dos extratos brutos enzimáticos armazenados a 4 °C, conforme Figura 3.5 b), reduziu para todas as enzimas com destaque para a xilanase sintetizada pelo fungo *A. niger* que teve uma redução de 35% após 24 horas de armazenamento. Ao passar as 140 horas de armazenamento as atividades relativas de todas as enzimas reduziram, contudo a xilanase produzida pelo fungo *Rhizopus sp.* permaneceu 72% ativa, e a  $\beta$ -glucosidase persistiu 59% ativa ao longo do período de armazenamento proposto, demonstrando que para esse processo as enzimas sintetizadas pelo *Rhizopus sp.* são mais resistentes.

### 3.4 – CONCLUSÃO

A palma forrageira é um substrato relevante para a síntese das enzimas  $\beta$ -glucosidase e xilanase, pela bioconversão da palma doce. É possível a omização das enzimas pela metodologia de superfície de resposta, bem como a caracterização de acordo com a termoestabilidade, estabilidade em pH e cinética de desativação, o que denota grande possibilidade de integração dos complexos enzimáticos brutos a processos industriais devido a resistência da atividade relativa nestas situações.

### 3.5 – AGRADECIMENTOS

Ao Banco do Nordeste do Brasil (BNB), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

### 3.6 – REFERÊNCIA

ALBUQUERQUE, S. G. de; SANTOS, D. C. Palma forrageira. In: KIILL, L. H. P.; MENEZES, E. A. (Ed.). Espécies 3vegetais exóticas com potencialidades para o semi-árido brasileiro: Brasília, DF: **Embrapa Informação Tecnológica**, 2005. cap.3, p. 91-127.

ALVA, S., ANUPAMA, J., SAVLA, J., CHIU, Y. Y., VYSHALI, P., SHRUTI, M., *ET AL.* Production and characterization of fungal amylase enzyme isolated from

*Aspergillus sp.* JGI 12 in solid state culture. **African Journal of Biotechnology**, v.6, 576–581, 2007.

ARAUJO, L. F.; OLIVEIRA, L. S. C.; PERAZZO NETO, A.; ALSINA, O.L.S.; SILVA, F.L.H. Equilíbrio higroscópico da palma forrageira: relação com a umidade ótima para fermentação sólida. **Revista brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**. v. 9, n.3, p. 379-384, 2005.

BELANCIC, A; GUNATA, Z.; VALLIER, M-J.; AGOSIN, E.  $\beta$ -glucosidase from the native yeast *Debaryomyces vanriijae*: purification, characterization, and its effect on monoterpene content of a Muscat grape juice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 1453-1459, 2003.

BIAZUS, J. P. M., SOUZA, R. R., SANTANA, J. C. C., TAMBOURGI, E. B. Otimização da secagem do malte de *Zea mays*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.26, p.787–792, 2006.

CAMPENHOUT, L. V., SOMERS, I., VAN DE CRAEN, S. AND ADAMS, C. In vitro test to evaluate protein degradation by feed enzymes. In **Recent Advances in Enzymes in Grain Processing**, ed. Courtin, C. M., Veraverbeke, W. S. and Delcour, J. A., Kat. Univ. Leuven., Leuven, 2003, pp.387-390.

GOKHALE, D. U. Xylanase and betaxylosidase production by *Aspergillus niger* NCIM 1207. **Biotechnology Letters**, v. 8, p. 137-138, 1986.

GRANATO, D., RIBEIRO, J. C. B., CASTRO, I. A., MASSON, M. L. Sensory evaluation and physicochemical optimisation of soy-based desserts using response surface methodology. **Food Chemistry**, v.121, p. 899–906, 2010.

HEIDORNE, F. O., MAGALHÃES, P. O., FERRAZ, A. L., MILAGRES, A. M. F. Characterization of hemicellulases and cellulases produced by *Ceriporiopsis subvermispota* grown on wood under biopulping conditions. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 38, p.436-442, 2006.

HENDRIKS, A. T. W. M.; ZEEMAN, G. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**. 2008. v. 100, p. 10-18.

- JÄGER, S. *et al.* Production and characterization of  $\beta$ -glucosidases from different *Aspergillus* strains. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 17, p. 455-461, 2001.
- KOROTKOVA, O.G.; SEMENOVA, M.V.; MOROZOVA, V.V.; ZOROV, I.N.; SOKOLOVA, L.M.; BUBNOVA, T.M.; OKUNEV, O.N.; SINITSYN, A.P. Isolation and properties of fungal  $\beta$ -glucosidases. **Biochemistry**, v. 74, n.5, p. 569-577, 2009.
- LANGSTON, J.; SHEEHY, N.; XU, F. Substrate specificity of *Aspergillus oryzae* family 3  $\beta$ -glucosidase. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1764, p. 972-978, 2006.
- MATSUURA, M.; SASAKI, J.; MURAO, S. Studies on  $\beta$ -glucosidases from soybeans that hydrolyse daidzin and genistin: Isolation and characterization of an isozyme. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, Tokyo, v.59, n.9, p.1623-1627, 1995.
- MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, n.31, 426-428, 1959.
- MUSSATTO, S. I.; FERNANDES, M.; MILAGRES, A. M. M. Enzimas: Poderosa ferramenta na indústria. **Ciência Hoje**, São Paulo, v. 41 (242), p. 28-33, 2007.
- OMEMU, A. M., AKPAN, I., BANKOLE, M. O., TENIOLA, O. D. Hydrolysis of raw tuber starches by amylase of *Aspergillus niger* AM07 isolated from the soil. **African Journal of Biotechnology**, v.4, p.19-25, 2005.
- PANDEY, A. Solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, 13, 81-84, 2003.
- PANDEY, A. Solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v.13, p.81-84, 2003.
- QINNGHE, C., XIAOYU, Y., TIANGUI, N., CHENG, J., QIUGANG, M. (2004). The screening of culture condition and properties of xylanase by white-rot fungus *Pleurotus ostreatus*. **Process Biochemistry**, n.39, p.561-566, 2004.

- SANTANA, R. M., GONÇALVES, Z. S., BONOMO, R. C. F., FRANCO, M. Produção de amiloglucosidade utilizando como substrato a palma forrageira. *Revista Caatinga*, v.25, p.188–193, 2012.
- SANTOS, T. C.; CAVALCANTI, I. S.; BONOMO, R. C. F.; SANTANA, N. B.; FRANCO, M. Optimization of productions of cellulolytic enzymes by *Aspergillus niger* using residue of mango a substrate. **Ciência Rural** (UFMS. Impresso), v. 41, p. 2210-2216, 2011b.
- SANTOS, T. C.; GOMES, D. P. P.; BONOMO, R. C. F.; FRANCO, M. Optimisation of solid state fermentation of potato peel for the production of cellulolytic enzymes. **Food Chemistry**, v. 133, p. 1299-1304, 2012.
- SARRY, J. E.; GÜNATA, Z. Plant and microbial glycoside hydrolases: volatile release from glycosidic aroma precursors. **Food Chemistry**, v. 87, p. 509-521, 2004.
- SESTELO, A. B. F.; POZA, M.; VILLA, T. G.  $\beta$ -glucosidase activity in a *Lactobacillus plantarum* wine strain. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 20, p. 633-637, 2004.
- SHAFIQUE, S., BAJWA, R., & SHAFIQUE, S. Screening of *Aspergillus niger* and *A. flavus* strains for extra cellular alpha-amylase activity. **Pakistan Journal of Botany**, n.41, p.897–905, 2009.
- SHAH, A. R., MADAMWAR, D. Xylanase production by a newly isolated *Aspergillus foetidus* strain and its characterization. **Process Biochemistry**. v. 40, p. 1763-1771, 2005.
- SOCCOL, C. R.; VANDENBERGHE, L. P. S.; MEDEIROS, A. B. P.; KARP, S. G.; BUCKERIDGE, M.; RAMOS, L. P.; PITARELOD, A. P.; FERREIRA-LEITÃO, V.; GOTTSCHALKF, L. M. F.; FERRARAG; M. A.; BON, E. P. S.; MORAESH, L. M. P; ARAÚJO, J. A.; TORRESH, F. A. G. Bioethanol from lignocelluloses: Status and perspectives in Brazil. **Bioresource Technology**, v.101, n.13, p.4820–4825,2010
- VASCONCELOS A. G. V., LIRA M. A., CAVALCANTI V. A. L., SANTOS, M. V. F., CÂMARA T., WILLADINO, L., Micropropagação e palma forrageira cv. Miúda

(*Nopalea cochenillifera* - Salm Dyck). **Revista Brasileira de Ciências Agrárias, Recife**, 2(1), p.28-31, 2007.

WALLECHA, A.; MISHRA, S. Purification and characterization of two  $\beta$ -glucosidases from a thermo-tolerant yeast *Pichia etchellsii*. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1649, p. 74-84, 2003.

ZHANG, C.; LI, D.; YU, H.; ZHANG, B.; JIN, F. Purification and characterization of piceid-  $\beta$ -D-glucosidase from *Aspergillus oryzae*. **Process Biochemistry**, v. 42, p. 83 -88, 2007.

## CAPÍTULO IV

### Hidrolise Enzimática do farelo de palma forrageira por enzimas lignolíticas

**Resumo:** O objetivo do trabalho foi avaliar a utilização da palma forrageira como principal substrato para a produção de enzimas lignolíticas (Lacase, Lignina Peroxidase e Manganês Peroxidase), através da fermentação em estado sólido com o auxílio do fungo filamentososo *Aspergillus niger*. Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Resíduos Agroindustriais, na Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – UESB. As variáveis estudadas no processo fermentativo foram, a atividade de água (0,827, 0,892 e 0,949), o tempo de fermentação (24, 72 e 120 h) e temperatura (25, 30 e 35°C), com aplicação da metodologia de Superfície de Resposta (SR) e do Delineamento Casualizado Central Rotacional (DCCR). O ponto ótimo para a atividade da enzima lacase é em 73,38 h, a 0,87 de atividade de água e 28,74°C, enquanto que a lignina peroxidase atingiu o máximo em 65,33 h e a uma temperatura de 28,96 ° C, para a enzima Mn peroxidase o tempo ótimo foi em 70,44 h e a temperatura foi de 28,84 C. Como foi observado para a lignina peroxidase e Mn peroxidase a faixa de atividade de água estudada não influenciou no processo enzimático. É necessário considerar as enzimas foram sintetizadas somente com o farelo de palma e água em várias concentrações que o *Aspergillus niger* como agente inoculante, o que demonstra que é uma enzima constitutiva. A produção otimizada das enzimas aqui avaliadas foram 9023, 67 UI/L para Lacase, 2234,75, para a Lignina Peroxidase e 8534,81 UI/L para a Mn Peroxidase. Foram observados ótimos índices de termoestabilidade e estabilidade de pH em todas as enzimas, com os ensaios de cinética de desativação enzimática permitiram observar que a enzima permanece ativa após o congelamento do estrato bruto.

**Palavras-chave:** Fungos filamentosos, *Nopalea cochenillifera*, superfície de resposta.

**Abstract:** The of the study was to evaluate the use of cactus as the main substrate for the production of enzymes lignolíticas (laccase, lignin peroxidase and manganese peroxidase) by solid state fermentation with the aid of the filamentous fungus *Aspergillus niger*. The experiments were conducted at the Laboratory of Agro-Industrial Wastes, State University of Southwest Bahia - UESB. The variables studied were the fermentation process, the water activity (0.827, 0.892 and 0.949), fermentation time (24, 72 and 120 h) and temperature (25, 30 and 35 °C), and application of response surface methodology (SR) and the Central Delineation Randomized Rotational (DCCR). The optimum for the activity of the enzyme laccase is on 73.38 h, the water activity of 0.87 and 28.74 °C, while the lignin peroxidase peaked at 65.33 h and a temperature of 28.96 °C, Mn peroxidase enzyme to the optimum time was 70.44 h and the temperature was 28.84 °C. As was observed for lignin peroxidase and manganese peroxidase the range of water activity studied did not influence the enzymatic process. It is necessary to consider the enzymes were synthesized only with the palm bran and water in various concentrations the agent *Aspergillus niger* inoculum, which shows an enzyme constitutiva. A optimized enzyme production were evaluated here 9023, 67 UI/L laccase, 2234.75 UI/L for lignin peroxidase

and 8534.81 UI/L for Mn Peroxidase. Were observed excellent rates of thermostability and pH stability at all enzymes, kinetic assays of enzymatic deactivation allowed to observe that the enzyme remains active.

**Keywords:** Filamentous fungi, *Nopalea cochenillifera*, Response surface methodology

#### 4.1 – INTRODUÇÃO

A palma é uma forrageira bem adaptada às condições do semi-árido brasileiro, suportando grande período de estiagem, devido às propriedades fisiológicas, caracterizadas por processo fotossintético eficiente (VASCONCELOS *et al.*, 2007). No semi-árido brasileiro, essa forrageira é aplicada nos diversos sistemas de produção pecuário, no entanto, é uma planta de enorme potencial produtivo e de múltiplas utilidades, podendo ser usada na alimentação humana, na produção de medicamentos, cosméticos e corantes, na conservação e recuperação de solos, como cercas vivas e paisagismo. Sua composição química relativa possui alto valor de nutrientes digestíveis totais. Os níveis de carboidratos solúveis também são elevados, bem como os teores de cinza, vitaminas e ferro, devem ser destacados os teores de cálcio (3%); potássio (2,5%) e fósforo (0,15%) (CHIACCHIO *et al.*, 2006), além de baixos teores de matéria seca ( $11,69 \pm 2,56\%$ ), proteína bruta ( $4,81 \pm 1,16\%$ ), fibra em detergente neutro ( $26,79 \pm 5,07\%$ ), fibra em detergente ácido ( $18,85 \pm 3,17\%$ ) (FERREIRA *et al.*, 2003)

Além de fundamental para o equilíbrio das cadeias tróficas, a degradação da lignina apresenta grande importância econômica, tornando disponíveis substâncias de interesse na indústria, pecuária e na agricultura. A decomposição desse tipo de material orgânico depende de um efetivo e progressivo processo de despolimerização da lignina que dá origem a compostos de baixa massa molar susceptíveis ao metabolismo intracelular dos microrganismos. Isso ocorre por meio da ação de uma série de enzimas e compostos de baixa massa molecular extracelular (CASTRO *et al.*, 2010)

A biodegradação da lignina é essencial para a ciclagem do carbono, diversas enzimas estão envolvidas. A degradação da lignina pode ser entendida como um processo multienzimático por reação não específica, resultante da ação coordenada de uma série de enzimas ligninolíticas intra e extracelulares que desestabilizam as ligações da macromolécula, causando assim seu colapso (MANE, *et al.*, 2006). Elas podem ser agrupadas em fenoloxidasas e enzimas que produzem peróxido de hidrogênio. As fenoloxidasas são enzimas que pertencem às metaloproteínas, e podem ser divididas em dois subgrupos. Um grupo contém as enzimas dependentes de peróxido ou peroxidases,

que incluem a lignina peroxidase (LiP) e a manganês peroxidase (MnP), o outro subgrupo contém as lacases que são cuproproteínas e não dependem de peróxido para atuar (SANTOS, *et al.*, 2011).

As enzimas hidrolíticas são extensivamente utilizadas por vários segmentos industriais. Dentre as hidrolases podemos citar as enzimas celulases, as quais são obtidas, principalmente, a partir de fungos dos gêneros *Trichoderma* e *Aspergillus*. Seu uso industrial inclui: hidrólise enzimática: produção de glicose; tratamento de resíduos; indústria têxtil: remoção manchas, clarificação, desengomagem; indústria de alimentos: extração de chá verde, proteína de soja, óleos essenciais, aromatizantes e produção de agar (PARK, *et al.*, 2005).

No entanto, o custo de produção dessas enzimas é o que limita sua aplicação em grande escala. Reduzir os custos de produção é fundamental para amplificar essa aplicação (GHORAI, *et al.*, 2009). Nesse sentido estudar a aplicação da palma forrageira como matéria-prima para bioprocessos, pode viabilizar a produção de enzimas fúngicas para processos industriais (GHORAI *et al.*, 2009)

O objetivo deste trabalho foi investigar a utilização da palma forrageira (*Nopalea cochenillifera*) como matéria prima para a produção de enzimas ligninocelulolíticas através do processo de fermentação em estado sólido com auxílio dos fungos filamentosos *Aspergillus niger* e *Rhizopus sp.* Realizou-se um estudo das condições ideais para produção das enzimas a partir da Metodologia de Superfície de Resposta (MSR) em conjunto com o Delineamento de Box e Behnken (DBB), com três variáveis independentes (tempo de fermentação, atividade de água e temperatura) para a determinação do efeito destas sobre a produção das enzimas estudadas.

## **4.2 – MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.2.1 – Materiais**

A amostra foi coletada no campo Agrostológico da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – Campus de Itapetinga. Após a higienização e corte foram secos em estufa de secagem a 70 °C por 24 horas (SOLAB), e triturados moimho tipo Willey (ACB LABOR) a uma granulométrica aproximada de 2 mm. Os microrganismos utilizados durante a fermentação foram os fungos filamentosos *Aspergillus niger* e *Rhizopus sp.*, provenientes do Laboratório de Aproveitamento de Resíduos Agroindustriais (LABRA-UESB). Os fungos foram inoculados em Agar batata dextrose (PDA HIMEDIA pH 5,02), a cultura esporulada foi suspensa em solução de Tween 80 VETEC a 0,01%, onde foi

efetuada a contagem do número de esporos em suspensão utilizando câmara de Neubauer com auxílio do microscópio binocular (BIOVAL L1000) (SANTOS *et al.*, 2011).

#### **4.2.2 – Fermentação em estado sólido**

As fermentações foram realizadas em erlenmeyers contendo 10 g de resíduo a este foi adicionando a suspensão de  $10^8$  esporos por grama de substrato, na sequência foram adicionados volumes de água estéril. Os cultivos foram realizados com variação da temperatura (25, 30 e 35°C), tempo (24, 72 e 120 horas) e atividade de água (0,786, 0,865 e 0,903). Os ensaios foram realizados em incubadora refrigerada com ventilação forçada de ar. Após o processo fermentativo, foi adicionado 10 mL solução tampão de citrato de sódio com pH 4,8 a 50 mM, logo após a adição da solução tampão a biomassa seguiu a extração mecânica por filtração do extrato enzimático.

#### **4.2.3 – Determinação da atividade enzimática da Lacase (Lac, E.C. 1.10.3.2)**

A atividade de lacases foi determinada utilizando-se como substrato 0,1 mL de uma solução etanólica de siringaldazina (4-hidroxi-3,5-azino-metoxibenzaldeído) em concentração de 1 mM. A reação de oxidação foi conduzida em 0,3 mL de tampão citrato-fosfato 50 mM e pH 5,0 e 0,6 mL de extrato enzimático. A reação foi quantificada após 10 minutos através da leitura da absorbância em espectrofotômetro (BEL PHOTONICS 2000 UV) no comprimento de onda de 525. A atividade enzimática foi calculada com base na absorvidade molar dos substratos oxidados ( $\epsilon_{525} = 44.600 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) (SZKLARZ *et al.*, 1989).

#### **4.2.4 – Determinação da atividade enzimática da Lignina Peroxidase (Lip, E.C. 1.11.1.7)**

Foram utilizados dois tubos de ensaio de 10 x 100 mm, um para amostra não fervida e outro para amostra fervida. Foi adicionado em cada tubo 0,6 mL da amostra a ser analisada, 0,2 mL do tampão citrato-fosfato, 0,1 mL de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Um tubo foi fervido por 10 minutos (controle) e depois retirado e resfriado. O tempo inicial (zero) foi determinado como a medição da absorbância no momento em que se adiciona 0,1 mL de siringaldazine. Depois foi feita outra medição no tempo final após 10 minutos. De cada tubo foram retirados alíquotas de 1,0 mL de cada tubo contendo as amostras fervidas e não fervidas foram medidas no comprimento de onda 460 nm ( $\epsilon_{460} = 29400 \text{ L} \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) (ARCHIBALD, 1992)

#### 4.2.5 – Determinação da atividade enzimática da Manganase Peroxidase (MnP; E.C. 1.11.1.13)

A manganês peroxidase foi determinada pela oxidação de 0,5 mL de vermelho de fenol 0,1 % (a dissolução do vermelho de fenol em água foi feita pelo ajuste continuado do pH em 7,4) em 1,25 mL de tampão succinato de sódio 20mM (pH 4,5), 1,5 mL de lactato de sódio, 0,5 mL de albumina 1%, 0,5 mL de MnSO<sub>4</sub> 1 mM, 0,5 mL de extrato e 0,25 mL de peróxido de hidrogênio 2 mM. Após 10 minutos de reação, 1 mL da mistura contida no tubo de ensaio, foi removida e a esse volume foi feita a adição de 30 µL de hidróxido de sódio 6,5 M para interromper a reação e realizar a leitura no espectrofotômetro. A cinética da reação foi avaliada medindo-se a absorbância do produto de reação em 610 nm. A atividade de MnP foi calculada com base na absorvidade molar do vermelho de fenol oxidado ( $\epsilon_{610} = 65000 \text{ L} \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) (ANASTASI *et al.*, 2009)

#### 4.2.6 – Determinação da atividade enzimática para Lacase, Peroxidase e Mn Peroxidase

A atividade de produção das enzimas Lacase, Peroxidase, Mn Peroxidase, foi calculada seguindo a equação [6].

$$UI/I = \frac{\Delta Abs}{\epsilon \times R \times t} \times 10^6 \quad (1)$$

Onde:  $\Delta Abs$  = absorbância (Abs final – Abs inicial)

$\epsilon$  = coeficiente de absorção molar

R = quantidade de solução da amostra

t = tempo de reação em minutos

UI/L = Unidade Internacional

#### 4.2. 4 – Ensaios de termoestabilidade

Com o objetivo de se determinar a estabilidade térmica das enzimas produzidas, os extratos enzimáticos foram submetidos às temperaturas de 20 °C a 100 °C, com intervalos de 10° C durante 0 a 240 minutos. Após o tempo de reação, os tubos foram colocados em banho de gelo por 5 minutos para encerrar a reação de hidrólise enzimática e seguirá a determinação das atividades enzimáticas conforme descrito anteriormente.

#### 4.2.4 – Ensaios de termoestabilidade

Com o objetivo de se determinar a estabilidade térmica das enzimas produzidas, os extratos enzimáticos relativos a otimização encontrada pelo delineamento experimental, foram submetidos às temperaturas de 20 °C a 100 °C, com intervalos de 10° C durante 0 a 240 minutos. Após o tempo de reação, os tubos foram colocados em banho de gelo por 5 minutos para encerrar a reação de hidrólise enzimática logo após foi efetuada determinação das atividades enzimáticas conforme descrito anteriormente em três repetições experimentais.

#### 4.2.5 – Ensaios de estabilidade ao pH

A estabilidade ao pH foi determinada por incubação retirando-se alíquotas durante 0 a 240 minutos incubação nos pHs: 3, 4, 5, 6, 7 e 8 em tampão citrato de sódio. A atividade de cada enzima foi avaliada de acordo com a otimização da metodologia de superfície de resposta em três repetições experimentais conforme descrito anteriormente.

#### 4.2.6 – Cinética de desativação enzimática

Após a interrupção da fermentação, porções de 100 mL de extratos enzimáticos foram armazenados a 4 ° C e -25 ° C. As alíquotas foram removidas em diferentes tempos intervalos (0, 24, 72, 96, 120 e 144 horas), para a determinação da atividade enzimática. A atividade de cada enzima foi avaliada de acordo com a otimização da metodologia de superfície de resposta em três repetições experimentais conforme descrito anteriormente.

#### 4.2.7 – Análises estatísticas

O planejamento fatorial  $2^{3-1}$  fracionado constituiu, em dois níveis (-1 e +1), envolvendo as variáveis independentes citadas, contou ainda com 4 repetições no pontos centrais (nível zero) para o cálculo de resíduos e erro padrão, a partir do verificação dos resultados foram aplicados na metodologia de Superfície de Resposta (SR) e do Delineamento de Box e Behnken (DBB). Assim, o planejamento fatorial consistiu em 18 ensaios e os valores das variáveis estudadas estão descritos na Tabela 1.

**Tabela 4.1** - Valores codificados e valores reais para cada fator em estudo

	Fatorial em valores codificados			Fatorial em valores reais		
Ensaio	(X <sub>1</sub> , h)	(X <sub>2</sub> , a <sub>w</sub> )	(X <sub>3</sub> , °C)	(X <sub>1</sub> , h)	(X <sub>2</sub> , a <sub>w</sub> )	(X <sub>3</sub> , °C)

1	-1	-1	-1	24	0.786	25
2	-1	-1	+1	24	0.786	35
3	+1	-1	-1	120	0.786	25
4	+1	-1	+1	120	0.786	35
5	-1	+1	-1	24	0.903	25
6	-1	+1	+1	24	0.903	35
7	+1	+1	-1	120	0.903	25
8	+1	+1	+1	120	0.903	35
9	0	-1	0	72	0.786	30
10	0	+1	0	72	0.903	30
11	-1	0	0	24	0.865	30
12	+1	0	0	120	0.865	30
13	0	0	-1	72	0.865	25
14	0	0	+1	72	0.865	35
15	0	0	0	72	0.865	30
16	0	0	0	72	0.865	30
17	0	0	0	72	0.865	30
18	0	0	0	72	0.865	30

\* Matriz do planejamento experimental.

A análise de variância (ANOVA) para os modelos foi realizada e a importância do modelo foi examinada pelo teste estatístico de Fisher (teste F) através do teste de diferenças significativas entre as fontes de variação nos resultados experimentais, ou seja, a significância da regressão (SOR), a falta de ajuste, e o coeficiente de determinação múltipla ( $R^2$ ). Em primeiro lugar, os resultados obtidos a partir de experiências foram submetidos a análise de variância ANOVA, e os efeitos foram considerados significativos quando  $p < 0,01$ . Com um modelo polinomial de segunda ordem (Eq. (1)), dados experimentais e de regressão coeficiente foram ajustadas e coeficientes de regressão foram obtido por regressão linear múltipla, onde  $b_0$ ,  $b_i$ ,  $b_{ii}$ ,  $b_{ij}$ , e  $b_{ijk}$  representar todo o processo constante efeito, os efeitos linear e quadrática de  $X_i$ , e o efeito de interação entre  $X_i$  e  $X_j$ ,  $X_i$ ,  $X_j$  e  $X_k$  sobre a atividade enzimática, respectivamente.

$$EA = \beta_o + \sum \beta_i X_i + \sum \beta_{ii} X_i^2 + \sum \beta_{ij} X_i X_j + \sum \beta_{ij} X_i X_j X_k \quad (1)$$

O software estatístico utilizado foi o *Statistical Analysis System*<sup>®</sup> (SAS) versão 9.3, para elaboração dos gráficos foi utilizado o software *Sigma Plot*<sup>®</sup> versão 11.0.

A fim de avaliar quais os fatores que tiveram um efeito significativo sobre atividade enzimática da lacase, lignina peroxidase, e Mn peroxidase, foi conduzida a análise ANOVA (Tabela 2) e os parâmetros de estimativa foram conduzidos com o fatorial fracionado  $2^{3-1}$ . A análise de variância (ANOVA) para os modelos foi realizada e a significância do modelo foi examinada utilizando o teste estatístico de Fisher (teste F) aplicando a diferenças significativas entre as fontes de variação dos resultados experimentais, por exemplo, o significado de regressão (SOR), a falta de ajuste (LOF), e o coeficiente de determinação múltipla (R2).

Uma vez que a totalidade dos modelos de segunda ordem (modelos que contêm ambas as interações de parâmetros), não foram aceitos pelos ensaios mencionados, foram melhoradas com a eliminação de termos até que as condições determinadas foram atendidas. Todos os fatores que não foram significativas, 10% foram então agrupadas no termo de erro e um novo modelo reduzido foi obtido para as variáveis de resposta pela análise de regressão utilizando apenas o fator de significativa indicados anteriormente.

### 4.3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir dos valores experimentais foram elaborados os ajustes estatísticos com a finalidade de gerar modelos significativos, com base no teste de Fisher e no  $R^2$ . Na Tabela 4.2 são apresentadas os valores da ANOVA para a validação dos modelos estatísticos.

**Tablela 4.2** – Ajuste de dados obtidos a partir da ANOVA para os modelos de superfície de respostas quadráticas.

<i>Source</i>	<i>DF</i>	<i>SS</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>p</i>
<i>A. Niger</i>					
<i>Lacase</i>					
Modelo	6	49778310	657051	10,54	0,0009
Erro	11	8661350	24256		

Falta de ajuste	14	58348889,88	4167777,85	137,75	
Erro puro	3	90769,75	30256,58		
Total	17	4841917.800			
R <sup>2</sup>	0,9103				
<i>Lig. peroxidase</i>					
Modelo	4	388347713	97086928	6,63	0,0002
Erro	13	190386342	14645103		
Falta de ajuste	14	578397422	41314101,6	368,18	
Erro puro	3	336633,1	112211		
Total	17	578734055,1			
R <sup>2</sup>	0,9994				
<i>Mn peroxidase</i>					
Modelo	4	8451978	21129942	13,93	0,0001
Erro	13	19716224	1516633		
Falta de ajuste	14	104226294,8	7444735,3		
Erro puro	3	9697,6	3232,5		
Total	17	104235992			
R <sup>2</sup>	0,9999				
<i>Rhizopus sp.</i>					
<i>Lacase</i>					
Modelo	4	28849842725	7212460681	15.39	<0,0001
Erro	13	6093820660	468755435		
Falta de ajuste	14	34931468877	2495104920		
Erro puro	3	12194508	4064836		
Total	17				
R <sup>2</sup>	0,9996				
<i>Lig. peroxidase</i>					
Modelo	4	7157702705	1789425676	22,80	<0,0001
Erro	13	1020201096	78477007		

Falta de ajuste	14	8165990601	583285043		
Erro puro	3	11913201	3971067		
Total	17	8177903802			
R <sup>2</sup>	0,9985				
<i>Mn peroxidase</i>	6	138007789	23001298	428,60	<0,0001
Modelo	11	590326	53666		
Erro	14	138474179,7			
Falta de ajuste	3	123935,6			
Erro puro	17	138598115			
Total					
R <sup>2</sup>	0,9991				

O resultado da análise de variância pode ser visualizado num diagrama de Pareto (Figura 1), em que o valor absoluto da amplitude do efeito padronizado estimada (o efeito de estimativa dividida pelo desvio padrão) de cada elemento é traçado em ordem decrescente e comparados a magnitude mínima de um factor estatisticamente significativa, com 90% de confiança ( $p = 0,10$ ).

Os modelos reduzidos podem ser descritos por equações. (3-8), em termos de valores não codificados.

$$E1 \quad -37537 + 299,706X_1 + 14232X_2 + 2160,687X_3 - 0,8434X_1^2 - 199,971X_2^2 - 39,611X_3^2 \quad (3)$$

$$E2 \quad -77988 + 478,7626X_1 + 5548,862X_3 - 3,3395X_1^2 - 95,7501X_3^2 \quad (4)$$

$$E3 \quad -43897 + 225,249X_1 + 2957,28701 X_3 - 1,523X_1^2 - 50,074X_3^2 \quad (5)$$

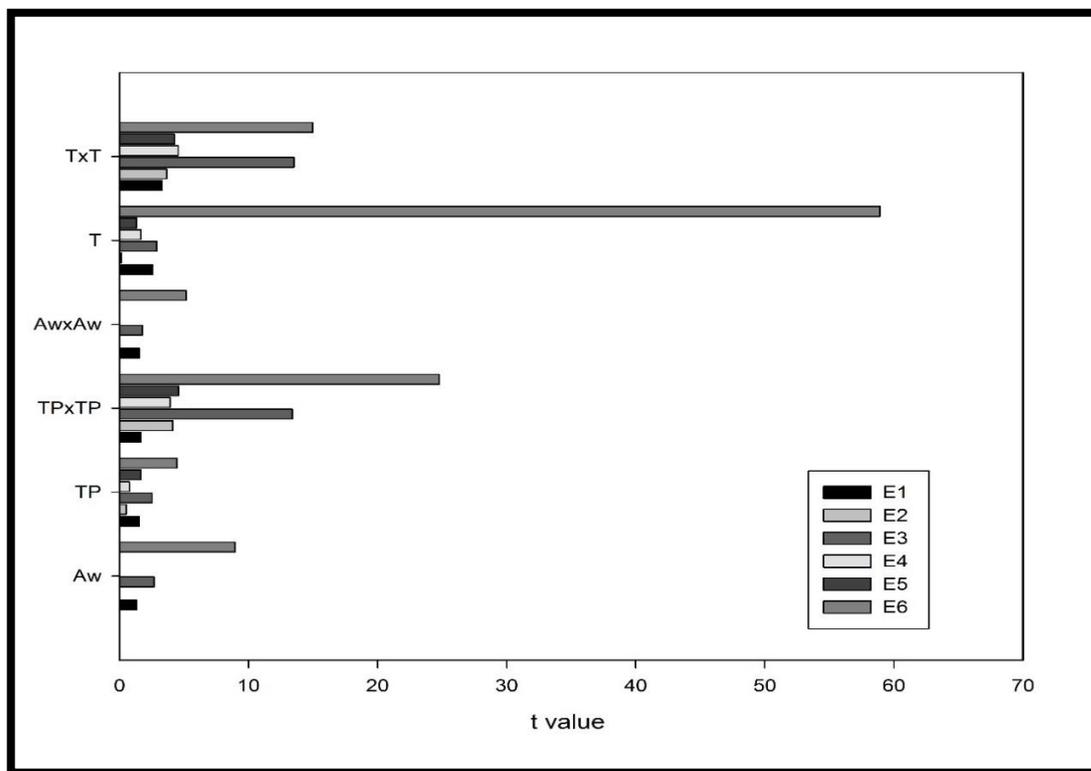
$$E4 \quad -1213178 + 3052,65404X_1 + 88276 X_3 - 22,65034 X_1^2 - 1484,28059 X_3^2 \quad (6)$$

$$E5 \quad -345688 + 830,53802X_1 + 25981X_3 - 12,17216 X_1^2 - 440,62646 X_3^2 \quad (7)$$

$$E6 \quad -870384 + 118,02998 X_1 + 2021611X_2 + 1681,08050 X_3 - 0,91427 X_1^2 - 1200218X_2^2 - 28,95224X_3^2 \quad (8)$$

E1, E2, e E3 corespondem as atividades da Lacase, Lignina Peroxidase, e Mn Peroxidase produzidas pelo *A. niger*, já E4, E5, e E6 corespondem as atividades da

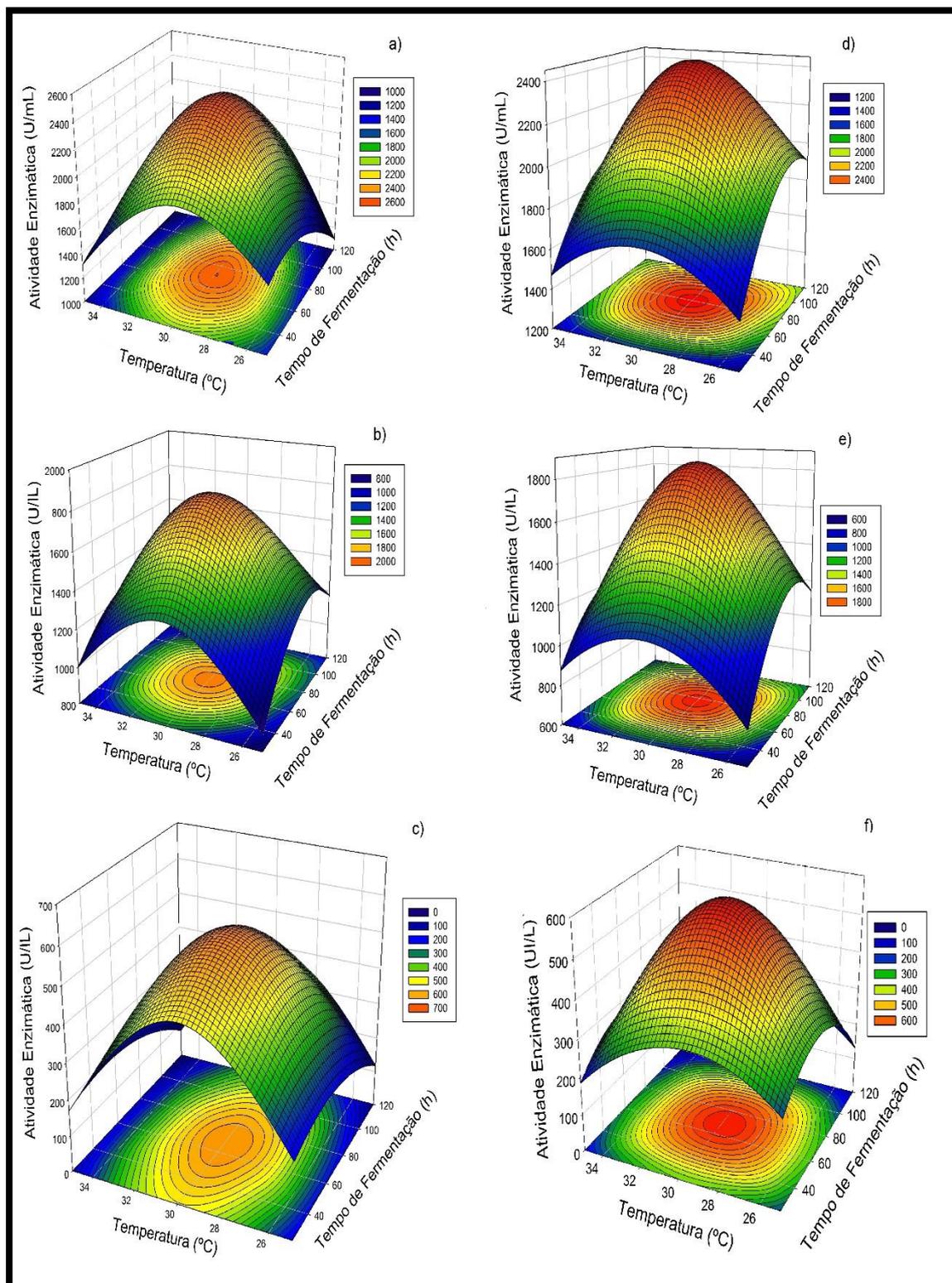
Lacase, Lignina Peroxidase, e Mn Peroxidase produzidas pelo *Rhizopus sp.* respectivamente.



**Figura 4.1** – Pareto gráfico mostrando a significancia das variáveis tempo de fermentação (T) e temperatura (TP). E1 – Lacase, E2 – Lig. Peroxidase e E3 – Mn peroxidase, produzidas pelo *A. niger*; E4 – Lacase, E5 – Lig. Peroxidase e E6 – Mn peroxidase, produzidas pelo *Rhizophus sp.*

A Figura 4.2, ilustra os efeitos de combinações de variáveis independentes sobre a atividade da enzima; através dos derivados de equações (3-5).

Em relação ao fungo *A. niger*, o ponto ótimo para a atividade da enzima lacase é em 73,38 h, a 0,87 de atividade de água e 28,74°C, enquanto que a lignina peroxidase atingiu o máximo em 65,33 h a uma temperatura de 28,96 °C, para a enzima Mn peroxidase o tempo ótimo foi em 70,44 h e a temperatura foi de 28,84 °C. A produção otimizada das enzimas sintetizadas pelo *A. niger* aqui avaliadas foram 2340,67 UI/L para Lacase, 1634,75 para a Lignina Peroxidase e 463,81 UI/L para a Mn Peroxidase.



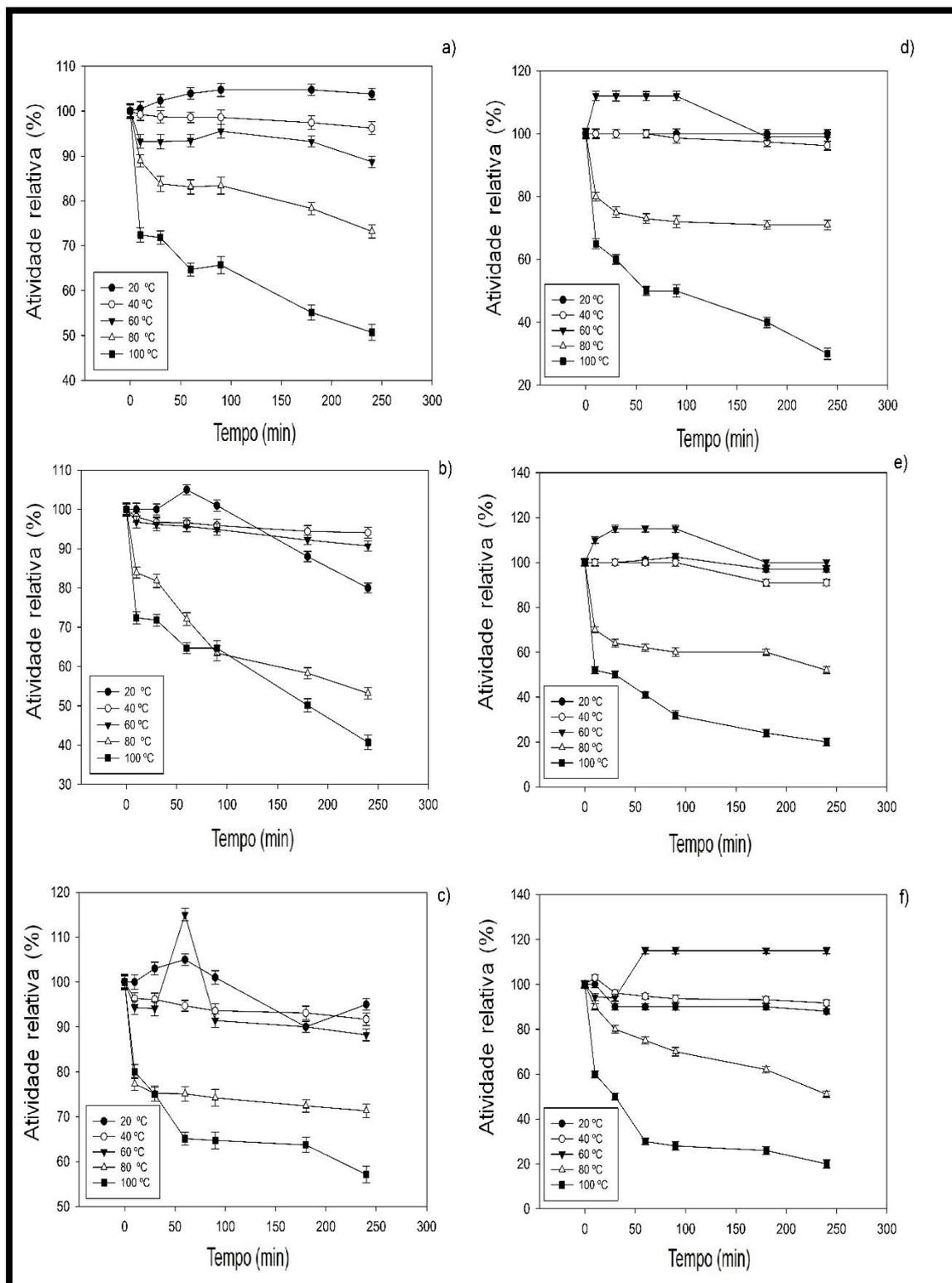
**Figura 4.2** – Superfícies de respostas: a) Lacase, b) Lig. Peroxidase e c) Mn peroxidase, produzidas pelo *A. niger*; d) Lacase, e) Lig. Peroxidase e f) Mn peroxidase, produzidas pelo *Rhizopus sp.*

Já a produção enzimática promovida pelo fungo *Rhizopus sp.*, o ponto ótimo para a atividade da enzima lacase é em 80,31h, a 30,51 °C, enquanto que a lignina peroxidase atingiu o máximo em 69,67h a uma temperatura de 31,01 °C, para a enzima Mn peroxidase o tempo ótimo foi em 75,21 h, a temperatura foi de 30,24 °C, a faixa de atividade de água. A produção otimizada das enzimas sintetizadas pelo *Rhizopus sp.* aqui avaliadas foram 2401,90UI/L para Lacase, 1818,26 para a Lignina Peroxidase e 1683,41 UI/L para a Mn Peroxidase. Para a produção das enzimas aqui quantificadas o *Rhizopus sp.* se mostrou mais eficiente do que o *A. niger* em relação a atividade enzimática de todas as enzimas.

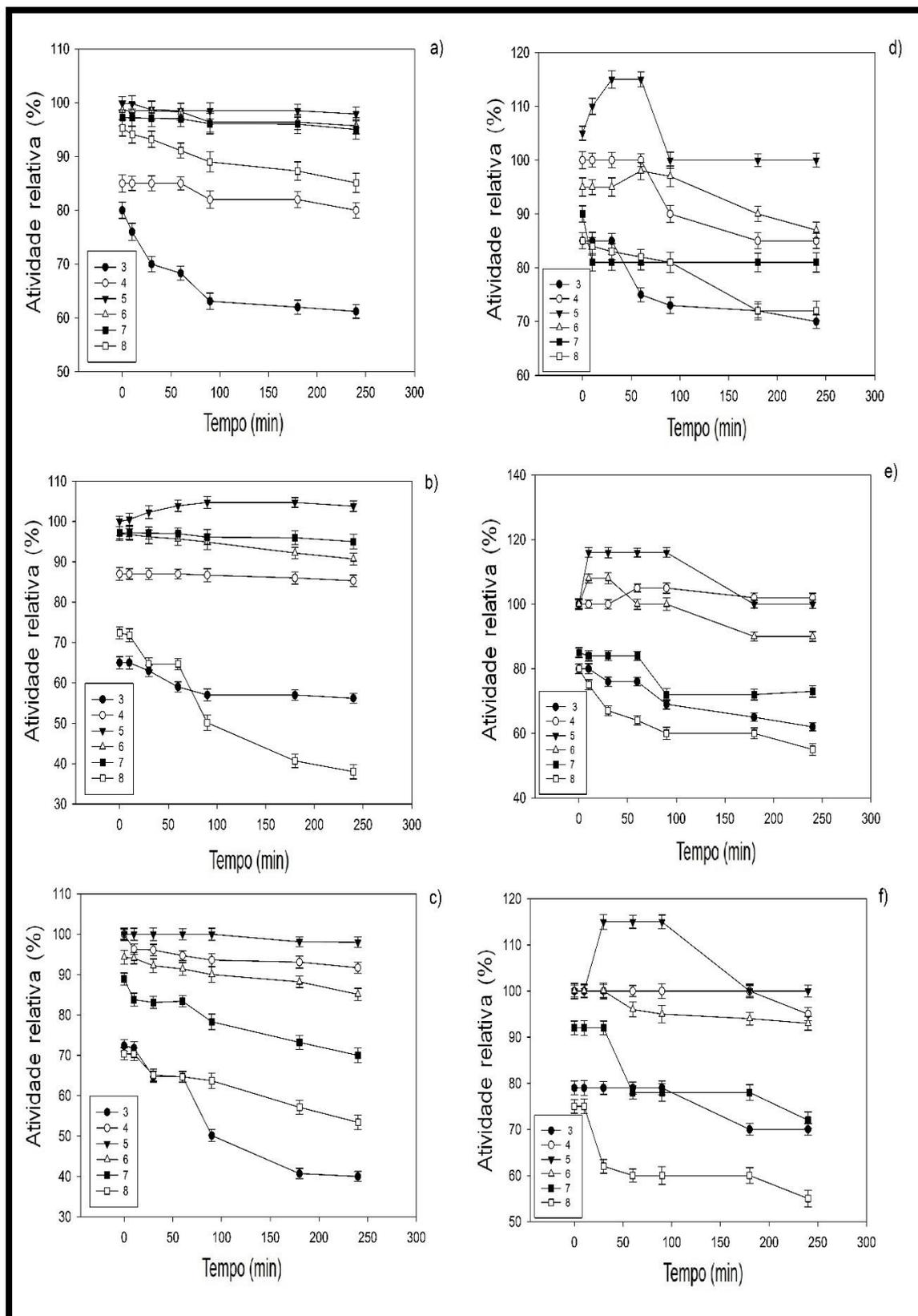
Verificou-se que o tempo de fermentação influenciou a produção enzimática, que durou aproximadamente 65 a 80 horas para todas as atividades enzimáticas. Uma hipótese para este resultado é que a presença de nutrientes dispersos ao longo da fermentação pode ter contribuído para o crescimento do microrganismo e a deterioração desses nutrientes ao longo do tempo pode ter afetado a produção das enzimas.

Neste trabalho a atividade de água em torno de 0,87 foi a mais representativa no que diz respeito a otimização das atividades enzimáticas da Lacase, o que denota numa melhor adaptação fúngica ao nível de água proposto, na otimização da Mn peroxidase a atividade de água encontrada foi de 0,84. Nas demais enzimas não foi possível estabelecer a otimização da atividade de água, o que denota que a variação dessa variável estudada já se encontra em um nível que facilita a produção de enzimas, em que para o crescimento fúngico a atividade de água que melhor se aplica está na faixa de 0,7 a 0,9, valores que se aproximam com os que foram estabelecidos neste experimento.

Enzimas geralmente possuem um mecanismo de expressão de controle que podem ser estimuladas ou inibidas por produtos do meio. Os produtos finais de uma via metabólica são frequentemente, inibidores de enzimas que catalisam os primeiros passos da via. Este mecanismo é conhecido como feedback negativo (Biazus, *et al.* (2005), trabalhando com malte de milho, observou que na produção de enzimas no início é lento, depois acelera até atingir seu valor máximo, a partir daí, a concentração de produtos gerados são inibidas e sua atividade é reduzida, o que também foi observada em neste estudo. A caracterização enzimática é importante para conhecer particularidades como termoestabilidade (Figura 4.3) e resistência ao pH (Figura 4.4), informações relevantes para a aplicação industrial e que foram necessárias para manter o nível desejado de atividade da enzima por um longo período de tempo.



**Figure 4.3.** Termostabilidade: a) Lacase, b) Lig. Peroxidase e c) Mn peroxidase, ambas produzidas pelo *A. niger*; d) Lacase, e) Lig. Peroxidase e f) Mn peroxidase, produzidas pelo *Rhizophus sp.*



**Figura 4.4** - Estabilidade em pH: a) Lacase, b) Lig. Peroxidase e c) Mn peroxidase, ambas produzidas pelo *A. niger*; d) Lacase, e) Lig. Peroxidase e f) Mn peroxidase, produzidas pelo *Rhizopus sp.*

Em relação à estabilidade térmica das enzimas lignolíticas, as atividades mantiveram-se relativamente constantes em 20, 40 e 60 °C em durante todo período de incubação, a perda das atividades relativas foram observadas a 80 e 100 °C durante o período incubação de as todas as enzimas observadas, o que pode-se afirmar que houve desnaturação enzimática de acordo com as temperaturas de incubação, porém mesmo com temperaturas elevadas foi possível observar uma atividade relativa superior a 40% após 150 min de incubação.

O resultado encontrado é de grande importância pois a maioria dos processos industriais conhecidos utilizam temperaturas em torno de 50 °C, o que denota uma aplicação favorável no meio industrial.

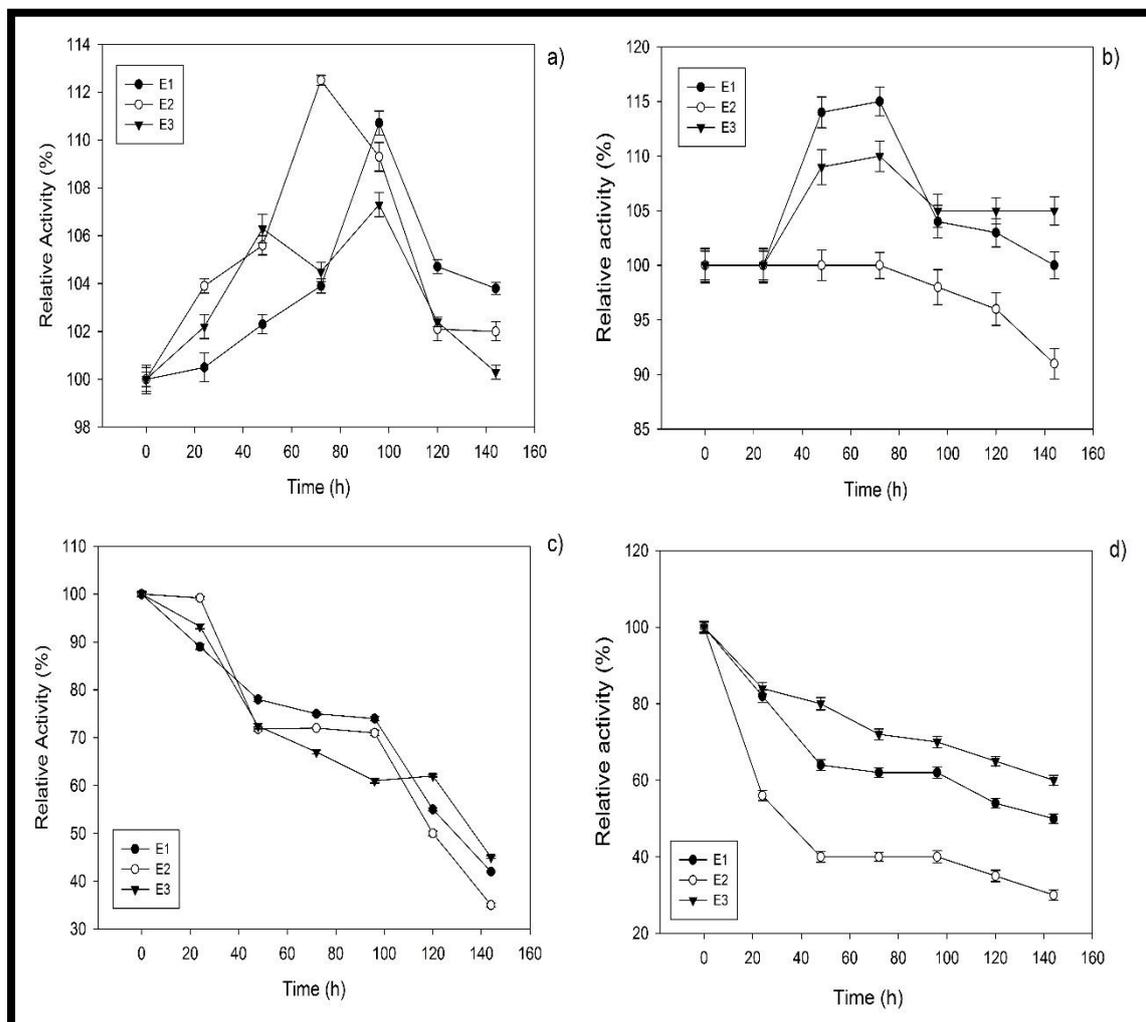
O que pode-se notar (Figura 4.4) que os ativos das enzimas testadas permaneceram representativos a uma longa faixa de pH, o que pode estar relacionado com o estado bruto dos extratos enzimáticos aqui testados, ou ainda com a propriedade da fermentação em estado sólido com fungos filamentosos que é tida como mais eficiente na produção de enzimas estáveis a temperatura e pH. As melhores atividades relativas foram obtidas com o pH 5 que está a princípio está próximo ao ponto isoelétrico das enzimas testadas, que de acordo com Santos *et al.* (2012), estas enzimas apresentam pontos isoelétricos de pHs entre 4,5 a 5,5.

As enzimas como todas as proteínas são formadas por uma sequência de aminoácidos que caracterizam a estrutura primária. Tais aminoácidos podem apresentar grupos iônicos que podem estar carregados positivamente ou negativamente dependendo do pH em que a molécula de enzima encontra-se dissolvida. Assim, o pH afeta os grupos presentes no sítio ativo e alteram a atividade enzimática pois haverá uma alteração na configuração tridimensional do sítio ativo, o que irá interferir na atividade enzimática. Logo, as enzimas são ativas apenas em faixas estreitas de pH e haverá um pH ótimo no qual a atividade é máxima nas condições determinadas (SHULER *et al.* 2001).

A cinética de desativação enzimática (Figura 4.5) foi realizada com o intuito de prever o tempo de armazenamento e a temperatura de retenção dos extratos brutos enzimáticos. O que pode ser notado é que a -25 °C. Ainda, o congelamento parece proporcionar aumento de cerca de 10% na atividade.

O congelamento afeta a estrutura original das proteínas, pois interfere na atividade da água provocando re-estruturação da cadeia polipeptídica, após o descongelamento, as moléculas de enzimas poderão adquirir nova configuração que afetará a atividade enzimática, o processo de congelamento interrompe também reações químicas e

atividades biológicas (TATTINI *et al.*, 2006). Já em temperatura de refrigeração (4°C), sabe-se que a água permanecerá disponível para desenvolvimento dos microrganismos, o que justifica a degradação das amostras.



**Figura 4.5** - Cinética de desativação das enzimas Lacase (E1), Lignina Peroxidase (E2) e Mn peroxidase (E3), a temperatura de congelamento -25 °C (a) para o *A. niger* e (b) para o *Rhizopus sp.* e a temperatura de refrigeração 4 °C (c) para o *A. niger* e (d) para o *Rhizopus sp.*

#### 4.4 – CONCLUSÃO

O processo de fermentação em estado sólido da palma forrageira estimulou as condições de crescimento dos fungos *Aspergillus niger* e *Rhizopus sp.* e consequentemente foi possível a otimização e maximização de enzimas lignolíticas. As enzimas mostraram relativamente termoestáveis por um período superior a 180 minutos a 60 °C. O ensaio de estabilidade ao pH reativo permitiu concluir que as enzimas são estáveis em uma faixa ampla de atuação do pH reativo. Nos ensaios da cinética de desativação enzimática foi possível notar que é o congelamento é mais eficiente que a

refrigeração dos extratos brutos enzimáticos. O processo fermentativo enzimático da palma forrageira foi satisfatório e com grande interesse industrial, pois é em substrato orgânico barato e de grande incidência no nordeste brasileiro.

#### 4.5 – AGRADECIMENTOS

Ao Banco do Nordeste do Brasil (BNB), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

#### 4.6 – REFERÊNCIAS

ANASTASI, A.; COPPOLA, T.; PRIGIONE, V.; VARESE, G. C. Pyrene degradation and detoxification in soil by a consortium of basidiomycetes isolated from compost: role of laccases and peroxidases. **Journal of Harzardous Materials**, v. 165, n.1, p. 1229-1233, 2009.

ARCHIBALD, F. S. A new assay for lignin-type peroxidases employing the dye azure B, **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, n. 9, p. 3110-3116, 1992.

BIAZUS J. P. M., SOUZA R. R., SANTANA J. C. C., TAMBOURGI E. B. Otimização da secagem do malte de *Zea mays*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.26, p. 787–792. 2006.

CASTRO, A M.; JUNIOR, N P. Produção, propriedades e aplicação de celulasas na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 181-188, 2010.

CHIACCHIO, F. B.; MESQUITA, A. S.; SANTOS, J. R. Palma forrageira: uma oportunidade econômica ainda desperdiçada para o semi-árido baiano. **Bahia Agrícola**, v. 7, n.3, p.39-49. 2006.

FERREIRA, C. A.; FERREIRA, R. L. C.; SANTOS, D. C.; SANTOS, M. V. F.; SILVA, J. A. A.; LIRA, M. A.; MOLICA, S. G. Utilização de técnicas multivariadas na

avaliação da divergência genética entre clones de palma forrageira (*Opuntia ficus-indica* Mill.). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 32, n. 6, p.1560-1568, 2003.

GHORAI, S.; BANIK, S. P.; VERMA, D.; CHOWDHURY, S.; MUKHERJEE, S.; KHOWALA, S. Fungal Biotechnology in food and feed processing. **Food Research International**, v. 42, n. 1, p.577-587, 2009.

MANE J. D.; MODI S.; NAGAWADE, S.; PHADNIS S. P.; BHANDARI, V. M. Treatment of spentwash using chemically modified bagasse and colour removal studies. **Bioresource Technology**, v. 97, n.1, p. 1752-1755, 2006.

OMEMU A. M., AKPAN I., BANKOLE M. O., TENIOLA O. D., 2005. Hydrolysis of raw tuber starches by amylase of *Aspergillus niger* AM07 isolated from the soil. **African Journal of Biotechnology**, 4, 19–25.

PARK, C.; KAWAGUCHI, T.; SUMITANI, J.; TAKADA, G; IZUMORI, K.; ARAI, M. Cloning and sequencing of a exoglucanase gene from *Streptomyces* sp. M23, and its expression in *Streptomyces lividans* TK-24. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 99, n. 4, p.434-436, 2005.

RUEGGER, M. J. S.; TAU-K-TORNISIELO, S. M. Atividade da celulase de fungos isolados do solo da Estação Ecológica de Juréia-Itatins, **Revista Brasileira de Botânica**, v. 27, n. 2, p. 205-211, 2004.

SANTOS, T. C.; ABREU FILHO, G.; ROCHA, T. J. O. FRANCO, M. Aplicação da fermentação em estado sólido sobre o farelo de cacau (*Theobroma Cacao* L.): Obtenção de ligninases. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 32, n. 1, p. 87-96, 2011.

SANTOS, T. C.; GOMES, D. P. P.; BONOMO, R. C. F.; FRANCO, M. Optimisation of solid state fermentation of potato peel for the production of cellulolytic enzymes. **Food Chemistry**, v. 133, p. 1299-1304, 2012.

SHULER, M. L.; KARGI, F. **Bioprocess Engineering: Basic Concepts**. Prentice Hall; 2 edition p.576, 2001.

SZKLARZ, G.; ANTIBUS, R. K.; SINSABAUGH, R. L.; LINKINS, A. E. Production of phenoloxidases and peroxidases by wood-rotting fungi. **Mycologia**, v. 81, n. 1, p. 234-240, 1989.

TATTINI JUNIOR, V.; PARRA, D. F.; PITOMBO, R. N. M. Influência da taxa de congelamento no comportamento físico-químico e estrutural durante a liofilização da albumina bovina. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 1, p. 127-136, 2006.

VASCONCELOS, A. G. V.; LIRA M, A.; CAVALCANTI, V. A. L.; SANTOS, M. V. F.; CÂMARA, T.; WILLADINO, L. Micropropagação e palma forrageira cv. Miúda (*Nopalea cochenillifera* - Salm Dyck). **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 2, n. 1, p.28-31, 2007.

## CAPITULO V

### **Enriquecimento proteico da *Nopalea cochenillifera* (L.) Lyons - Cactaceae: proteína unicelular produzida por meio da fermentação em estado solido com vistas a alimentação de ruminantes**

**Resumo:** Objetivou-se estudar o enriquecimento protéico da palma forrageira utilizando a fermentação em estado sólido com o auxílio de dois fungos filamentosos. A amostra foi coletada no campo Agrostológico da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – Campus de Itapetinga. Os microrganismos utilizados para a fermentação foram cepas de *Aspergillus niger* e de *Rhizopus sp.*, provenientes do Laboratório de Reaproveitamento de Resíduos Agroindustriais da UESB campus de Itapetinga. A fermentação em estado sólido, para o enriquecimento protéico ocorreu em Erlenmeyers de contendo 40g de palma miúda seca e moída. Após a inoculação com  $10^9$  esporos por grama de substrato, ocorreu à hidratação a 85% (m/m) de umidade. O material foi incubado em estufa bacteriológica a 30°C. O experimento constituiu de um fatorial (2x6x6), dois tratamentos (palma fermentada com *Aspergillus niger* e *Rhizopus sp.*), em seis tempos fermentativos (0, 48, 96, 144, 192, 240 h) e seis repetições experimentais. Para processo fermentativo com a espécie *A.niger*, atingindo uma elevação de 125,34% nos índices proteicos. Para o processo com *Rhizopus sp.* atingiu produções de 102,88 g/kg a 244,81 horas o que representa um aumento de 95,43% em relação ao substrato *in natura*. Também, pode ser observado que durante o processo fermentativo foi o incremento dos valores de carboidratos não fibrosos (CNF) cerca de 112,06% para a palma fermentada com o *A. niger*, já para a inoculação realizada com o *Rhizopus sp.* a elevação nos valores de CNF atingiu 170,11% em relação aos valores *in natura*. A bioconversão da palma miúda através da fermentação em estado sólido em bioproduto de alto valor agregado é uma alternativa alimentar para os sistemas de produção animal de ruminantes no semiárido brasileiro.

**Palavras chaves:** *Aspergillus niger*, *Rhizopus sp.*, semiárido nordestino brasileiro.

### **Enrichment of protein *Nopalea cochenillifera* (L.) Lyons - Cactaceae: unicellular protein produced by solid state fermentation with views ruminant feed**

**Abstract:** The aim of this work was to study the protein enrichment of cactus using solid state fermentation with the aid of two filamentous fungi. The sample was collected in the field Agrostológico State University of Southwest Bahia - Campus Itapetinga. The microorganisms used for fermentation were strains of *Aspergillus niger* and *Rhizopus sp.*,

From the Laboratory of Agro-Industrial Waste Reuse UESB Itapetinga campus. The solid-state fermentation, for protein enrichment occurred in Erlenmeyer flasks containing 40g palm chick dried and milled. After inoculation with  $10^9$  spores per gram of substrate, hydration occurred in 85% (m/m) of moisture. The material was incubated in bacteriological incubator at 30 °C. The experiment consisted of a factorial (2x6x6), two treatments (palm fermented with *Aspergillus niger* and *Rhizopus sp.*) In six days fermentation (0, 48, 96, 144, 192, 240 h) and six experimental repeats. For fermentation with species *A.niger*, reaching a high of 125.34% in protein levels. For the process with *Rhizopus sp.* reached productions 102.88 g / kg at 244.81 hours which represents an increase of 95.43% compared with the fresh substrate. Also, it can be seen that during the fermentation process was the increment values for non-fibrous carbohydrates (NFC) to about 112.06% palm fermented with *A. niger*, as for the inoculation performed with *Rhizopus sp.* High values of CNF reached 170.11% compared to the values in nature. The bioconversion of palm girl through solid state fermentation byproduct in high added value is an alternative feed for livestock production systems of ruminants in the Brazilian semiarid

**Keywords:** *Aspergillus niger*, *Rhizopus sp.*, semiarid northeastern Brazil.

## 5.1 – INTRODUÇÃO

A palma forrageira é cultivada com relativo sucesso no semiárido nordestino do Brasil desde o início do século XX, assim como nas regiões áridas e semiáridas dos Estados Unidos, México, África do Sul, e etc., por apresentar características morfofisiológicas que a torna apropriada a essas regiões, constituindo-se uma das mais importantes bases de alimentação para bovinos (SANTOS *et al.*, 2012a). A palma é totalmente adaptada às condições edafoclimáticas da região semiárida, apresentam metabolismo diferenciado, fazendo a abertura dos estômatos essencialmente à noite, quando a temperatura ambiente apresenta-se reduzida (FERREIRA *et al.*, 2008).

A palma muitas vezes representa a maior parte do alimento fornecido aos ruminantes durante o período de estiagem nas regiões do semiárido nordestino do Brasil, o que é justificado pelas seguintes qualidades: a) rica em água, mucilagem e resíduo mineral; b) apresentam alto coeficiente de digestibilidade da matéria seca e c) alta produtividade (TOSTO *et al.* 2006; NUNES, 2011).

Contudo, o fornecimento da palma forrageira *in natura* como único alimento não atende as necessidades nutricionais do rebanho, de maneira especial a porcentagem de proteína disponível nesta forrageira que é considerado baixo, mostrando-se inferior às outras culturas, como o sorgo, milho, capim-elefante, etc. Assim uma das recomendações para elevar o teor protéico na palma forrageira, a fim de reduzir a necessidade de

suplementação, é o uso de adubações nitrogenadas e fosfatadas durante o cultivo, que são alternativas relativamente onerosas. Em contra partida o enriquecimento protéico a partir da fermentação aeróbica de microrganismos torna-se possível reduzir custos relativos alimentação de rebanhos durante o período de estiagem.

Uma das formas promissoras para o aumento protéico por meio do desenvolvimento de processos biotecnológicos que possibilita a produção de um grande número de metabólitos de interesse industrial. A fermentação em estado sólido tem gerado vários produtos, dentre eles a chamada proteína unicelular ou *single cell protein* (SCP) a qual tem sido alvo de estudo mundial devido à possibilidade de aplicação na dieta alimentar (CAMPOS *et al.*, 2005). A SCP ou proteína microbiana é produzida a partir de microrganismos tais como: algas, fungos e bactérias, cuja biomassa produzida tem contribuído para o teor protéico do substrato ou para agregar valores a produtos e subprodutos agroindustriais.

Os fungos filamentosos, em destaque algumas espécies dos gêneros *Rhizopus* e *Aspergillus*, são considerados como os mais promissores na produção de biomassa, uma vez que além de elevarem o teor protéico, produzem proteínas com atividade catalítica específica e com elevada digestibilidade e ausência de substâncias tóxicas (SANTOS *et al.* 2010). Objetivou-se é avaliar o enriquecimento protéico, e degradação de teores fibrosos relacionado ao o perfil químico-bromatológico da palma doce, com variação do tempo de fermentação de 0 a 240 horas utilizando duas espécies fúngicas filamentosas o *Aspergillus niger* e o *Rhizophus sp.*

## **5.2 – MATERIAIS E METODOS**

### **5.2.1 – Materiais**

A amostra foi coletada no campo Agrostológico da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – Campus de Itapetinga durante o mês de janeiro de 2012. As mostras constituíram de cortes de base da palma forrageira (*Nopaleaco chenillifera* (L.) Lyons - Cactaceae) cv. considerando as raquetes mais antigas, que representam um maior percentual de fibras em relação as mais novas. Após a higienização com água corrente, as raquetes foram secas em estufa de secagem (SOLAB SL 102, Piracicaba-SP, Brasil) a 70°C por 24 horas, e trituradas em moinho tipo Willey (ACB LABOR, São Paulo-SP, Brasil) a uma granulométrica aproximada de 2 mm (SANTOS *et al.*, 2012a). O teor de água inicial do substrato estudado foi de 2% (m/m) foi obtida a partir do determinador de umidade infravermelho (MARTE ID200, São Paulo-SP, Brasil)

### 5.2.2 – Fermentação em estado sólido

O farelo de palma foi esterilizados em autoclave vertical, (PRISMATEC - CS30 - Itu - SP, Brasil) a 121 °C por 15 min. Os microorganismos utilizados foram *Rhizopus sp.* do Laboratório Aproveitamento de Resíduos de Agroindústrias. A cultura esporulada (PDA HIMEDIA inclinado, acidificado a pH 5,02) foi suspenso em 1% de solução de Tween 80 (VETEC) (SANTOS *et al.*, 2012b). O número de esporos em suspensão foi contado em câmara de Neubauer dupla espelhada em microscópio binocular (BIOVAL L1000, São Paulo - SP - Brasil). A quantidade de  $10^9$  esporos por grama de substrato seco foi adicionada à suspensão. As fermentações ocorreram em frascos Erlenmeyer de 500 mL contendo 40 g de farelo de palma. O farelo de palma foi hidratado com água destilada estéril até atingir o teor de água de 85% (m/m) como relatado em Santos *et al.*, 2012a. A fermentação em estado sólido ocorreu a 30 °C em incubadora bacteriológica refrigerada (SOLAB SL 222/CFR Piracicaba, SP - Brasil) (SANTOS *et al.*, 2011).

### 5.2.3 – Composição químico-bromatológica

As amostras foram moídas a 2 mm para a padronização das análises. A concentração de fibra em detergente neutro (FDN) e fibra em detergente ácido (FDA) foram quantificadas de acordo com a metodologia descrita por Van Soest *et al.* (1991). Alfa-amilase (SIGMA) estável ao calor foi utilizada para a análise de FDN. Os valores de lignina (LIG) determinada pelo método do ácido sulfúrico (QUIMIS), celulose (CEL), hemicelulose (HEM), material mineral (MM), extrato etéreo (EE) foram analisados segundo os protocolos descritos pela AOAC (1995), em que todos os constituintes químicos são relatados com base na matéria seca (MS).

A Concentração de nitrogênio total (NT) foi determinado pelo método Kjeldahl (AOAC, 1990), com base nestes valores calculou-se a estimativa de proteína bruta PB ( $PB = NT \times 6,25$ ).

Os valores de carboidratos não fibrosos (CNF) foram obtidos a partir da fórmula:  $CNF = 100 - (PB + FDN + EE + MM)$ , para os valores de carboidratos totais foi utilizado a fórmula:  $CHOT = 100 - (PB + EE + MM)$  (SNIFFEN *et al.* (1992).

Para a determinação de cinzas insolúveis em detergente neutro (CIDIN), nitrogênio insolúvel em detergente ácido (NIDA), cinzas insolúveis em detergente ácido (CIDA), nitrogênio insolúvel em detergente neutro (NIDIN) e nitrogênio insolúvel em

detergente ácido (CIDA), foram utilizadas metodologias descritas por Silva & Queiroz (2002).

### 5.2.5 – Análise estatística

O experimento constituiu de um delineamento inteiramente casualizado com (palma fermentada com *Aspergillus niger* e *Rhizopus p.*), em seis tempos fermentativos (0, 48, 96, 144, 192, 240 h) e seis repetições experimentais. Através desse experimento foi avaliado o perfil químico-bromatológico ao longo do processo fermentativo da palma forrageira. A análise de variância (ANOVA) foi realizada e a diferença entre as médias dos tratamentos realizados foi determinada através do Teste de Fisher e regressão. Para comparação das médias experimentais foi utilizado o teste de Tukey. O software estatístico utilizado foi o *Statistical Analysis System* versão 9.3 (SAS - Inst. Inc., Cary, NC).

A análise de variância (ANOVA) para os modelos foi realizada, e a importância do modelo foi examinada pelo teste estatístico de Fisher (teste F), através do teste de diferenças significativas entre as fontes de variação nos resultados experimentais. Neste tipo de planejamento é possível, por meio da análise de regressão dos pontos experimentais, gerar modelos quadráticos (RODRIGUES & IEMMA, 2005).

## 5.3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise dos processos fermentativos realizados através do teor protéico do material cultivado, mostrou-se satisfatória. Os dados da composição químico-bromatológica das fermentações para cada período avaliado são apresentadas nas Tabelas 1 e 2, de acordo com a média de seis repetições amostrais. O tempo zero, para ambos os tratamentos, foi atribuído aos valores da palma forrageira *in natura*, os resultados estão expostos em g/kg.

**Tabela 5.1** – Média dos teores de químico-bromatológicos (g/kg) durante a fermentação em estado sólido da palma forrageira, sob diferentes espécies fúngicas: *Aspergillus niger* (A) e *Rhizopus sp.* (B).

Nutriente (g/kg)	0 h	48 h	96 h	144h	192 h	240 h	Regressão	R <sup>2</sup>	F	p	CV(%)
FDN* - A	654,9	638,54	597,26	539,7	458,08	421,66	$Y = -1,0507x + 677,77$	0,966	12,78	0,0002	7,45
FDN* - B	654,9	647,16	609,41	573,78	494,62	441,4	$Y = -0,929x + 681,69$	0,942	21,52	0,0005	12,45
FDA* - A	386	373,10	352,86	321,62	281,2	249,76	$Y = -0,5882x + 398$	0,971	21,45	0,0002	10,83
FDA* - B	386	380,74	356,64	331,3	296,62	260,72	$Y = -0,5382x + 399,92$	0,959	26,45	0,0002	14,85
LIG* - A	66,74	64,42	61,44	58,18	54,78	50,48	$Y = -0,0675x + 67,446$	0,991	30,01	0,0001	6,69
LIG* - B	66,74	66,74	65,74	58,84	54,42	51,34	$Y = -0,0685x + 68,231$	0,972	15,78	0,0001	11,91
CEL* - A	319,26	308,68	291,42	263,44	226,42	199,28	$Y = -0,5206x + 330,56$	0,967	15,45	0,0003	8,96
CEL* - B	319,26	315	293,66	272,46	242,20	209,38	$Y = -0,4696x + 331,68$	0,957	25,56	0,0003	9,45
HEM* - A	268,9	265,44	244,4	218,08	176,88	171,91	$Y = -0,4625x + 279,77$	0,946	17,59	0,0002	9,47
HEM* - B	268,9	266,42	252,76	242,48	198	180,68	$Y = -0,3909x + 281,78$	0,902	14,26	0,0002	11,52
MM* - A	103,02	101,86	101,26	101,16	101,04	101,01	$Y = -0,0077x + 102,55$	0,823	24,58	0,0002	15,45
MM* - B	103,02	102,82	102,68	102,25	101,38	101,04	$Y = -0,0087x + 103,24$	0,927	19,59	0,0002	8,24
EE* - A	32,98	32,9	32,6	32,28	31,32	27,31	$Y = -0,0116x + 33,755$	0,958	16,25	0,0002	17,25
EE* - B	32,98	32,28	32,22	30,94	30,74	30,56	$Y = -0,0107x + 32,906$	0,923	20,16	0,0002	6,46
PB* - A	52,64	77,6	88,46	106,72	130,82	114,78	$Y = -0,0016x^2 + 0,6661x + 49,29$	0,834	30,45	0,0002	12,74
PB* - B	52,64	63,36	80,52	96,08	117,52	97,34	$Y = -0,0011x^2 + 0,4946x + 47,72$	0,882	18,19	0,0001	8,93
MS* - A	121,42	112,32	98,02	93,66	89,66	80,42	$Y = -0,1651x + 119,06$	0,963	26,54	0,0001	8,45
MS* - B	121,42	117,91	108,76	102,58	98,88	91,93	$Y = -0,1255x + 121,97$	0,987	26,25	0,0001	9,49

FDN – fibra em detergente neutro; FDA – fibra em detergente ácido; LIG – lignina; CEL – celulose; HEM – hemicelulose; MM – matéria mineral; EE – extrato etéreo; PB – Proteína Bruta; MS – matéria seca.

\* Com base na matéria seca.

Como não foi adicionado nitrogênio inorgânico nos tratamentos, o aumento do percentual de N-protéico encontrado se justifica pela conversão da matéria seca com o substrato em proteína fúngica, enquanto parte do carbono é perdido na forma de CO<sub>2</sub>. Santos *et al.* (2010) observou que na fermentação da glicose em meio aeróbico, metade do carbono é oxidado a CO<sub>2</sub> no fornecimento de energia para o crescimento da espécie fúngica e a outra metade é convertida em material celular, foi avaliado que o consumo da matéria seca, em 240 horas de fermentação com os valores experimentais, foi obtido uma redução dos índices de matéria seca totalizado em e 26,30 e 18,56% para a palma fermentada com *Aspergillus niger* e *Rhizopus sp.*

Nota-se que o tempo de fermentação ótimo de produção protéica, calculado a partir da regressão, foi 118,62 g/kg a 208,15 h para processo fermentativo com a espécie *A.niger*, atingindo uma elevação de 125,34% nos índices proteicos. Para o processo com *Rhizopus sp.* atingiu produções de 102,88 g/kg a 244,81 horas que representa um aumento de 95,43% em relação ao substrato *in natura*.

Almeida *et al.* (2009) analisaram a bioconversão do mandacaru para produção de bioprodutos, e verificaram que durante a fermentação sólida do mandacaru o fungo do *A. niger* teve um aumento protéico de 76,9% no tempo de 72 h de fermentação na temperatura de 30 °C a uma espessura da camada de 1 cm.

Campos (2008), pesquisou o enriquecimento nutricional da palma forrageira e observou que o teor máximo de proteína bruta alcançado no biorreator de tambor rotativo foi de 43,27%, obtendo um aumento protéico de 6,44 vezes utilizando a levedura *Sacharomyces cerevisiae*. O mesmo autor também observou que os melhores resultados para obtenção de proteína bruta e enriquecimento protéico foi no tempo de 8 horas de fermentação em bandejas e 4 horas para fermentação em tambores rotativos.

De Gregorio *et al.* (2002), utilizaram polpa de limão, resíduo da indústria de suco, para o crescimento de *A.niger* e *Trichoderma viride* e consequente obtenção de proteína unicelular soluvel. Após 14 dias de cultivo sólido, *A. niger* produziu 25,6 % de proteína bruta e o fungo *T.viride*, após 25 dias, produziu 31,9 %. Silveira & Furlong (2007), observaram o aumento protéico de 1,6 vezes em farelo de trigo enriquecido com *Rhizopus sp.*, já Campos *et al.* (2005), quantificou o aumento protéico de 2,0 vezes em bagaço do pedúnculo de caju enriquecido com *S.cerevisiae*.

Em estudo realizado com enriquecimento protéico de farelo de arroz com o fungo *A. oryzae*, as condições ótimas para o processo de enriquecimento demonstrou: 60% de umidade, temperatura 28 °C, pH 6,0, concentração do 10<sup>9</sup> esporos/g de substrato e

granulometria de 0,3 mm. Rudravaram *et al.* (2006) entre as várias fonte de nitrogênio testadas o sulfato de amônio (0,6% p/p) apresentou máximo enriquecimento protéico de 24,30% em relação à amostra *in natura*.

O enriquecimento protéico da palma pode se constituir em alimento alternativo aos grãos de cereais e concentrados de origem animal bem como fontes protéicas de elevada qualidade pois os compostos nitrogenados acrescidos durante a fermentação encontram-se mais disponíveis no processo de absorção do ruminante, em comparação com a proteína natural dos vegetais, além de ser uma opção econômica, ambiental e social; possibilitando a incorporação do produto dentro das estratégias de alimentação dos animais nos atuais sistemas de produção do semiárido brasileiro. Com a fermentação da palma miúda utilizando espécies fúngicas foi possível alcançar teores protéicos mais elevados do que aos da silagem de sorgo e milho (86 g/kg), silagem de sorgo forrageiro (91 g/kg), silagem de girassol (121 g/kg) de acordo com os valores relatados Viana *et al.* (2012).

Prolongado o tempo do processo fermentativo, foi observada uma redução do teor protéico no material fermentado, comportamento semelhante foi encontrado por Suhet (1999) e Araújo (2003). Essa redução pode ser atribuída a uma possível desnaturação das proteínas do microrganismo ou morte celular, não ocorrendo mais o processo fermentativo, uma vez que, a influência do efeito do binômio tempo-temperatura pode desencadear esse fenômeno celular. Outra provável explicação para o fato pode ser a volatilização de  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_3^-$  e  $\text{NO}_2^-$  no decorrer do tempo de cultivo.

Araújo *et al.* (2008) descreve a queda da produção protéica em relação ao tempo fermentativo a uma provável volatilização do nitrogênio, produção de amônia e desnaturação gradativa da proteína celular do microrganismo. O nitrogênio corresponde em média, 8-14% do peso seco da biomassa de bactérias e/ou fungos. Estes resultados estão coerentes, pois, quando colocados em um meio de cultivo apropriado, os microrganismos começam a dividir-se ativamente, retirando do meio os nutrientes necessários para a produção de novos microrganismos. Este processo continua até que algum dos nutrientes se esgote (substrato limitante).

**Tabela 5.2** – Média dos teores de químico-bromatológicos (g/kg) durante a fermentação em estado sólido da palma forrageira, sob diferentes espécies fúngicas: *Aspergillus niger* (A) e *Rhizopus sp.* (B).

Nutriente (g/kg)	0 h	48 h	96 h	144h	192 h	240 h	Regressão	R <sup>2</sup>	F	p	CV(%)
CNF* - A	157,16	150,68	179,82	218,22	276,86	333,22	$Y = 0,7722x + 126,67$	0,909	27,45	0,0002	7,26
CNF* - B	157,16	219,42	254,02	292,62	373,1	424,52	$Y = 1,0931x + 155,63$	0,986	15,81	0,0001	8,67
CHOT* - A	811,36	787,64	777,68	759,84	768,14	756,91	$Y = 3,123x^2 - 34,851x + 846,28$	0,909	28,45	0,0002	15,89
CHOT* - B	811,36	801,54	784,58	770,73	747,36	763,06	$Y = 0,0008x^2 - 0,4384x + 815,69$	0,901	14,62	0,0001	7,31
CIDN* - A	73,32	72,74	72,14	71,45	70,78	70,32	$Y = -0,0128x + 73,332$	0,998	26,47	0,0002	7,25
CIDN* - B	73,32	73,18	73,04	72,83	72,63	72,22	$Y = -0,0044x + 73,396$	0,956	17,64	0,0001	8,29
CIDA* - A	66,14	65,94	65,44	65,11	64,87	64,59	$Y = -0,0067x + 66,155$	0,986	15,86	0,0001	6,65
CIDA* - B	66,14	65,75	65,63	65,07	64,69	64,31	$Y = -0,0077x + 66,186$	0,983	18,91	0,0002	14,65
NNP** - A	7,25	7,85	7,98	8,26	8,39	8,09	$Y = 3 \cdot 10^5 x^2 + 0,012x + 7,2664$	0,956	19,37	0,0004	7,75
NNP** - B	7,25	7,36	7,79	8,22	8,57	8,82	$Y = -0,0077x + 66,186$	0,981	14,32	0,0002	15,22
NIDN** - A	2,22	2,36	2,72	3,21	3,79	3,96	$Y = 0,008x + 2,0805$	0,971	26,59	0,0001	6,68
NIDN** - B	2,22	2,39	2,66	2,87	3,04	3,22	$Y = 0,0043x + 2,2219$	0,995	23,54	0,0001	10,31
NIDA ** - A	1,56	1,76	1,87	2,09	2,28	2,81	$Y = 0,0048x + 1,4881$	0,933	31,85	0,0003	7,86
NIDA ** - B	1,56	1,79	1,84	1,96	2,05	2,19	$Y = 0,0024x + 1,609$	0,971	24,66	0,0002	8,45

CNF – carboidratos não fibrosos; CHOT – carboidratos totais; CIDN – cinzas em insolúveis detergente neutro; CIDA – cinzas em insolúveis detergente ácido; NNP – nitrogênio não proteico; NIDN – nitrogênio insolúvel em detergente neutro; NIDA - nitrogênio insolúvel em detergente ácido.

\* Com base na matéria seca.

\*\* Com base no nitrogênio total.

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey, a 1% de probabilidade.

A espécies fúngicas filamentosas possuem a capacidade de decomposição dos polímeros orgânicos de celulose, hemicelulose e lignina, e são grandes responsáveis na produção de proteínas solúveis e enzimas extra celulares, como afirma Santos *et al.* (2012b). O efeito decrescido pode ser observado nos valores de CIDIN, CIDA e MM, também, para ambos os tratamentos que tiveram um comportamento semelhante segundo o teste de médias, o que também pode se justificar pela queda do percentual carbonáceo, convertido em outros compósitos durante a fermentação.

É notado que a bioconversão da biomassa (palma doce) a outros tipos de compostos, neste trabalho é possível observar a elevação dos índices protéicos em contrapartida a redução dos valores quantificados às fibras, de acordo com as tabelas nutricionais, são de 280 g/kg para FDN e 210 g/kg para FDA, os valores encontrados ao longo do processo fermentativo não estiveram abaixo desses índices. Os resultados obtidos assemelharam-se aos de Araujo *et al.* (2008), isto é, ao oferecer o farelo de palma forrageira fermentada aos animais, não é necessário associá-la com alimentos ricos em proteínas ou em fibras para suprir a deficiência destes nutrientes, não acarreta problemas para estimular a produção de saliva e manutenção das condições normais do rúmen.

O que, também, pode ser observado que durante o processo fermentativo foi o incremento dos valores de carboidratos não fibrosos (CNF) cerca de 112,06% para a palma fermentada com o *A. niger*, já para a inoculação realizada com o *Rhizopus sp* a elevação nos valores de CNF atingiu 170,11% em relação aos valores *in natura*, segundo os valores anteriormente apresentados na Tabela 2.

O pode ser notado pelos valores crescentes de nitrogênio não protéico (NNP), NIDA e NIDIM durante o processo fermentativo, para ambos tratamentos, porém é possível notar que os valores destes componentes sofreram um aumento relativamente baixo o que garante o sucesso da produção de proteína verdadeiramente assimilável durante o processo fermentativo. Uma grande variedade de compostos nitrogenados orgânicos e inorgânicos são utilizados para suprir as necessidades desse elemento durante a biossíntese. A amônia representa a forma inorgânica de nitrogênio mais assimilável pelos microrganismos (Pandey *et al.*, 1994).

Os alimentos concentrados ricos em fibra solúvel em detergente neutro podem representar uma importante fonte de energia para os animais ruminantes: primeiro por seus benefícios ao ambiente ruminal, sem reduzir drasticamente o pH, proporcionando maior eficiência microbiana e melhor aproveitamento da FDN dos alimentos volumosos, e segundo, pela dificuldade de utilização desses alimentos para nutrição de

monogástricos, pois esses animais não produzem enzimas capazes de digerir os carboidratos encontrados na fibra solúvel em detergente neutro.

Além do melhor sincronismo entre energia livre por meio da maior disponibilidade de carboidratos solúveis no alimento e proteína unicelular livre proporcionada pelo crescimento fúngico, a utilização da fermentação em estado sólido possivelmente disponibiliza maior quantidade de matéria potencialmente degradável no rúmen, propiciando maior aporte de substrato para a fermentação microbiana ruminal e a produção de ácidos graxos voláteis (AGVs). Em relação aos valores EE sofreram um ajuste linear decrescente, porém com pouca variação durante efeito fermentativo, m hipótese pode ser relacionado pela facilidade de das espécies fúngicas filamentosas em quebrar os lipídios em diversos substratos como afirma Amorim *et al.* (2012).

#### **5.4 – CONCLUSÃO**

Os aumentos dos teores de proteína bruta no farelo de palma doce, após o enriquecimento protéico, apresentam resultados representativos em relação aos valores destes nutrientes na forma *in natura*.

#### **5.5 – AGRADECIMENTOS**

Ao Banco do Nordeste do Brasil (BNB), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

#### **5.6 – REFERÊNCIAS**

- ALMEIDA, M.M.; CONRADO, L. de S.; SILVA, F.L.H. da; FREIRE, R.M.M.; VALENÇA, A.R. Caracterização de frutos do mandacaru provenientes de duas cidades paraibanas. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v.11, p.15-20, 2009.
- ARAUJO, L.F.; SILVA, F.L.H.; BRITO, E.A. OLIVEIRA JÚNIOR S.; SANTOS, E.S. Enriquecimento protéico da palma forrageira com *Saccharomyces cerevisiae* para alimentação de ruminantes. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia** , v.60, n.2, p. 401-407, 2008.

AOAC. (ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS). **Official methods of analysis**. 15.ed. Washington: AOAC, 1990

BOHNERT, D. W.; DELCURTO, T.; CLARK, A. A.; MERRILL, M. L.; FALCK, J.; HARMON, D. L. Protein supplementation of ruminants consuming low-quality cool season forage: Differences in intake and digestibility. **Journal of Animal Science**, v.89, n.11, p.3707-3717, 2011.

CAMPOS, A.R.N.; SANTANA, R.A.C. de; DANTAS, J.P.; OLIVEIRA, L. de S.C.; DE GREGORIO, A.; MANDALARI, G.; ARENA, N.; NUCITA, F.; TRIPODO, M. M.; LO CURTO, R. B.; SCP and crude pectinase production by slurry-state fermentation of lemon pulps. **Bioresource Technology**, v. 83, n. 2, p. 89-94, 2002.

DE GREGORIO, A.; MANDALARI, G.; ARENA, N.; NUCITA, F.; TRIPODO, M. M.; LO CURTO, R. B. SCP and crude pectinase production by slurry-state fermentation of lemon pulps. **Bioresource Technology**, v.83, n.2, p.89-94, 2002.

YASUHARA T., NOKIHARA K. High-throughput analysis of total nitrogen content that replaces the classic Kjeldahl method. **Journal of agricultural and food chemistry**, v.49, p.4581-4583, 2001.

MARQUES A. G. ; SANTOS, C. T.; SOARES, C V. P.,; MONTEIRO, I. A. B.; GUIMARÃES, D. M. F.; FRANCO, M. Fermentação de farelo de cacau por *Aspergillus niger* para obtenção de lipase. **Estudos Tecnológicos**, v. 8, p. 24-27, 2012.

NUNES C. S. Usos e aplicações da palma forrageira como uma grande fonte de economia para o semiárido nordestino. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v.6, n.1, p. 58-66, 2011.

RODRIGUES, M.I.; IEMMA, A.F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos**. 1ª Ed. Campinas, SP: Editora Casa do Pão, 2005. 326p

- RUDRAVARAM, R.; LINGA, V. R.; CHANDEL, A. K.; POGAKU. Optimization of protein enrichment of deoiled rice bran by solid state fermentation using *Aspergillus oryzae* MTCC 1846. **International Journal of Food Engineering**, vol. 2, n. 4, p 1556-3758, 2006.
- SANTOS, T. C. ; ABREU FILHO, G. ; FONSECA, S. F. ; ROCHA, T. J. O. ; FRANCO, M. . Palma forrageira como matéria prima para a produção de enzimas celulolíticas. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 7, n. 2, p. 270-276, 2012a.
- SANTOS, T. C. ; GOMES, D. P. P.; BONOMO, R. C. F. ; FRANCO, M. Optimisation of solid state fermentation of potato peel for the production of cellulolytic enzymes. **Food Chemistry**, v. 133, n. 15, p. 1299-1304, 2012b.
- SANTOS, T. C.; CAVALCANTI, I. S.; BONOMO, R. C. F.; SANTANA, N. B.; FRANCO, M. . Optimization of productions of cellulolytic enzymes by *Aspergillus niger* using residue of mango a substrate. **Ciência Rural**, v. 41, n. 12. p. 2210-2216, 2011.
- SANTOS, T. C.; GOMES, D.P.P.; FILHO, G.A.; FRANCO, M. Enriquecimento proteico dos resíduos sólidos do Processamento de frutas. **Enciclopédia Biosfera**, v.6, n.11, p. 1-7, 2010.
- SILVA, F.L.H. da. Enriquecimento protéico do bagaço do pedúnculo de caju por cultivo semi-sólido. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v.5, n.2, p.1-11, 2005.
- SILVA, J.D.; QUEIROZ, A.C. **Análise de alimentos: Métodos químicos e biológicos**. 3ª. Edição. Ed. Viçosa: UFV, 2002. 235p.
- SILVEIRA, C.M.; FURLONG, E.B.; Caracterização de compostos nitrogenados presentes em farelos fermentados em estado sólido. **Ciência Tecnologia de Alimentos**, v.27, p.805-811, 2007.

- SNIFFEN, C.J.; O'CONNOR, J.D.; VAN SOEST, P.J.; FOX, D.G.; RUSSELL, J.B. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: II. Carbohydrate and protein availability. **Journal of Animal Science**, v.70, n.12, p.3562-3577, 1992.
- ROBERTSON, J.B.; VAN SOEST, P.J. The detergent system of analysis and its application to human foods. In: JAMES, W.P.T.; THEANDER, O. (Eds.). **The analysis of dietary fiber in food**. New York: Marcel Dekker, 1981. p123-158.
- VAN SOEST, P.J., ROBERTSON, J.B., LEWIS, B.A. Symposium: carbohydrate methodology, metabolism, and nutritional implications in dairy cattle. **Journal Dairy Science**, v.74, n.10, p.3583-3597, 1991.
- VIANA, P. T.; PIRES, A. J. V.; OLIVEIRA, L B. ; CARVALHO, G. G. P.; RIBEIRO, L. S. O; CHAGAS, D. M. T.; NASCIMENTO FILHO, C. S.; CARVALHO, A. O. Fracionamento de carboidratos e de proteína das silagens de diferentes forrageiras. **Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, v. 41, n.2, p. 292-297, 2012.

## CAPÍTULO VI

### **Cinética ruminal de frações nutricionais da palma forrageira *in natura* e enriquecida com proteína fúngica através da fermentação em estado sólido**

**Resumo:** Avaliou-se, por meio da técnica *in situ*, a degradabilidade da matéria seca, fibra detergente neutro e fibra detergente ácido da palma forrageira variedade miúda (*Nopalea cochenillifera* (L.) Lyons - Cactaceae), *in natura* e enriquecida proteínicamente por meio da fermentação em estado sólido por 196 horas com as espécies fúngicas *Aspergillus niger* e *Rhizopus sp* a 30 °C. Para o ensaio da degradabilidade as amostras foram pré-secas em estufa à 60°C por 72 horas, e logo após foram moídas em moinho tipo Wiley com peneira que apresentava crivos de 2 mm e acondicionadas em sacos de nylon com dimensões de 5 x 10 cm, na quantidade de aproximadamente 20 mg de matéria seca/cm<sup>2</sup>. As amostras foram retiradas nos tempos 0, 3, 6, 12, 24, 48, 72, 96 e 120 horas. Ao avaliar a degradabilidade ruminal da matéria seca (MS), da fibra em detergente neutro (FDN), da fibra em detergente ácido (FDA) e da proteína bruta (PB) das forrageiras, verificou-se que a palma fermentada com *A. niger* e *Rhizopus sp*. obteve índices mais elevados para a maioria dos constituintes. A palma inoculada com os fungos filamentosos obteve maiores coeficientes de degradabilidade potencial da MS, da FDN, da FDA e da PB, quando comparada a palma *in natura*. Com isso a bioconversão da palma constitui excelente alternativa alimentar para animais ruminantes.

**Palavras chaves:** degradabilidade aparente, degradabilidade potencial, proteína unicelular fúngica.

### **Kinetics of nutritional fractions of fresh forage cactus and enriched with fungal protein by solid-state fermentation**

**Abstract:** Was evaluated by means of *in situ* technique, the degradability of dry matter, neutral detergent fiber and acid detergent fiber variety of cactus girl (*Nopalea cochenillifera* (L.) Lyons - Cactaceae), fresh and enriched through fermentation to protein content in solid state by 196 hours with the fungal species *Aspergillus niger* and *Rhizopus sp* to 30 °C. To test for degradation, the samples were pre-dried at 65 °C for 72 hours, and were then ground in a Wiley mill type sieve that had a 2 mm sieve and packed into bags nylon with dimensions of 5 x 10 cm, the amount of approximately 20 mg of material seca/cm<sup>2</sup>. Samples were taken at times 0, 3, 6, 12, 24, 48, 72, 96 and 120 hours. In assessing the degradability of dry matter (DM), neutral detergent fiber (NDF), acid detergent fiber (ADF) and crude protein (CP) of forage, it was found that the palm fermented with *A. niger* and *Rhizopus sp*. obtained higher rates higher for most constituents. The palm with filamentous fungi showed higher coefficients of degradability of DM, NDF, and CP FDA compared the palm *in natura*. With that the bioconversion of palm is an excellent alternative to feed ruminant animals.

**Keywords:** apparent degradability, potential degradability, protein-celled fungi.

## 6.1 – INTRODUÇÃO

A região semiárida, anualmente, passa por longos períodos de secas, o que provoca estacionalidade na produção de forragens e força os produtores a aumentarem os custos de produção, em razão da demanda por alimentos concentrados. No entanto, nos últimos anos, é maior o número de pesquisas com enfoque nos alimentos forrageiros alternativos, adaptados à região, para atender às exigências de manutenção e produção dos animais, à custo viável nos períodos críticos de prolongadas estiagens.

Nessa busca por alimentos que possibilitem a produção animal nos períodos críticos do ano, há várias décadas, a palma doce (*Nopalea cochenillifera* (L.) Lyons - Cactaceae) destaca-se por apresentar características morfofisiológicas que a tornam tolerante a longas estiagens (LIRA, 2006). Este alimento possui elevados índices de carboidratos, principalmente não fibrosos (WANDERLEY et al., 2002), importante fonte de energia para os ruminantes (VAN SOEST, 1994). Porém um grande fator que interfere no consumo amplo da palma é o teor de proteína bruta, que pode variar de 30 a 50 g/kg abaixo do necessário para o consumo em ruminantes, que está entre 90 g/Kg ou superior, assim a produção de proteína unicelular via fermentação em estado sólido é uma alternativa encontrada para suprir essa carência.

A geração de proteína celular para consumo animal é considerada como uma via de enriquecimento de alimentos alternativos, a qual elimina as restrições sazonais e de variações climáticas que existem em safras agrícolas, já que a seleção de microrganismos pode ser baseada no valor nutricional e no conteúdo protéico (ARAUJO et al., 2008). A produção em larga escala pode vir a se constituir numa das soluções ao problema de deficiência alimentar existente hoje. Portanto, a produção de células microbianas para ração animal vem sendo explorada em função de buscas de alternativas de aumento da quantidade e qualidade da alimentação (ARAUJO et al., 2008).

Aliada ao consumo de nutrientes, a obtenção de estimativa de digestibilidade é essencial para se conhecer o valor energético dos alimentos, notadamente via nutrientes digestíveis totais.

A composição nutricional dos alimentos produzidos sob condições tropicais é diferente da dos alimentos obtidos em regiões de clima temperado (Van Soest, 1994), assim como a produtividade animal em regiões tropicais é baixa quando comparada à de regiões temperadas, devido ao fato de que as plantas tropicais produzem grande quantidade de matéria seca, porém, com baixo valor nutritivo, assim sendo, a taxa de degradabilidade das gramíneas temperadas difere das gramíneas tropicais.

A sincronização entre a degradação ruminal de carboidratos e de proteínas é necessária para determinar as taxas de degradação da matéria seca e das diferentes frações que compõem os carboidratos e as proteínas (BALSALOBRE et al., 2003). Carvalho et al. (2006) afirma, que o conhecimento das taxas de degradação e passagem desses alimentos poderá fornecer dados necessários à formulação e balanceamento de dietas destinadas ao consumo animal.

Baseado no que foi exposto, o presente trabalho teve como objetivo determinar a cinética da degradação ruminal da matéria seca, proteína bruta, fibra em detergente neutro e fibra em detergente ácido da palma doce *in natura* e com os inoculantes fúngicos *Aspergillus niger* e *Rhizopus sp.*

## **6.2 – MATERIAL E MÉTODOS**

### **6.2.1 – Materiais**

A amostra foi coletada no campo Agrostológico da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – Campus de Itapetinga durante o mês de janeiro de 2012. As mostras constituíram de cortes de base da palma doce (*Nopaleaco chenillifera* (L.) Lyons - Cactaceae) cv. considerando as raquetes mais antigas (corte de base), que representam um maior percentual de fibras em relação as mais novas. Após a higienização com água corrente, as raquetes foram secas em estufa de secagem a 65°C por 24 horas (SOLAB SL 102, Piracicaba-SP, Brasil), e trituradas em moinho tipo Willey (ACB LABOR, São Paulo-SP, Brasil) a uma granulométrica aproximada de 2 mm. O teor de água final do substrato, após a secagem foi de 2% (m/m) foi obtida a partir do determinador de umidade infravermelho (MARTE ID200, São Paulo-SP, Brasil)

### **6.2.2 – Fermentação em estado sólido**

O farelo de palma foi esterilizados em autoclave vertical, (PRISMATEC - CS30 - Itu - SP, Brasil) a 121 °C por 15 min. Os microrganismos utilizados foram o *Aspergillus niger* e *Rhizopus sp.* do Laboratório de Aproveitamento de Resíduos de Agroindústrias. A cultura esporulada (PDA HIMEDIA inclinado, acidificado a pH 5,02) foi suspenso em 1% de solução de Tween 80 (VETEC) (SANTOS et al., 2012). O número de esporos em suspensão foi contado em câmara de Neubauer dupla espelhada em microscópio binocular (BIOVAL L1000, São Paulo - SP - Brasil). A quantidade de 10<sup>9</sup> esporos por grama de substrato seco foi adicionada à suspensão. As fermentações ocorreram em frascos Erlenmeyer de 500 mL contendo 40 g de farelo de palma por 196 horas. O farelo de palma

foi hidratado com água destilada estéril até atingir o teor de água de 85% (m/m) como relatado em Santos et al. (2012a). A fermentação em estado sólido ocorreu a 30 ° C em incubadora bacteriológica refrigerada (SOLAB SL 222/CFR Piracicaba, SP - Brasil) (SANTOS et al 2011.).

### 6.2.3 – Composição químico-bromatológica

As amostras foram moídas a 2 mm para a padronização das análises. A concentração de fibra em detergente neutro (FDN) e fibra em detergente ácido (FDA) foram quantificadas de acordo com a metodologia descrita por Van Soest *et al.* (1991) (Tabela 6.1). Alfa-amilase (SIGMA) estável ao calor foi utilizada para a análise de FDN. Os valores de lignina (LIG) determinada pelo método do ácido sulfúrico (QUIMIS), celulose (CEL), hemicelulose (HEM), material mineral (MM), estrato etéreo (EE) foram analisados segundo os protocolos descritos pela AOAC (1995), em que todos os constituintes químicos são relatados com base na matéria seca (MS).

A concentração de nitrogênio total (NT) foi determinado pelo método Kjeldahl (AOAC, 1990), com base nestes valores calculou-se a estimativa de proteína bruta (Tabela 6.1) PB ( $PB = NT \times 6,25$ ).

Os valores de carboidratos não fibrosos (CNF – Tabela 6.1) foram obtidos a partir da fórmula:  $CNF = 100 - (PB + FDN + EE + MM)$ , para os valores de carboidratos totais foi utilizado a fórmula:  $CHOT = 100 - (PB + EE + MM)$  (SNIFFEN *et al.* (1992).

Para a determinação de cinzas insolúveis em detergente neutro (CIDN), nitrogênio insolúvel em detergente ácido (NIDA), cinzas insolúveis em detergente ácido (CIDA), nitrogênio insolúvel em detergente neutro (NIDN) e nitrogênio insolúvel em detergente ácido (CIDA), foram utilizadas metodologias descrita por Silva & Queiroz (2002).

### 6.2.4 – Ensaio de degradabilidade ruminal

As análises foram realizado na Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, no Setor de Bovinocultura de Leite e no Laboratório de Aproveitamento de Resíduos Agroindustrial. Foram utilizados quatro bovinos machos, castrados mestiços (Gir/Holandês), canulados no rúmen, com peso vivo médio de 510 kg, mantidos durante todo o período experimental em piquetes de *Brachiaria decumbens*, acrescido de um quilo de concentrado suplementar na dieta à base de milho, farelo de soja e mistura mineral.

As amostras foram acondicionadas em sacos de nylon com dimensões de 5 x 10 cm, na quantidade de aproximadamente 20 mg de matéria seca/cm<sup>2</sup> do saco. Em cada animal foram incubadas amostras das quatro forrageiras, nos períodos de 0, 3, 6, 24, 48, 72, 96 e 120 horas. Para o tempo correspondente à zero hora, os sacos foram colocados no rúmen com o objetivo de proporcionar o contato mínimo dos microrganismos presente no mesmo com o alimento, e retirados logo após imersão. A incubação foi realizada de forma a se retirar todos os sacos de nylon ao mesmo tempo, promovendo dessa forma, lavagem uniforme do material. Os sacos contendo o resíduo da forragem pós-incubação, foram lavados em água corrente até que a mesma se apresentasse limpa, procedendo-se, então à nova secagem em estufa de 60°C por 72 horas.

A determinação das degradabilidades da matéria seca (MS), proteína bruta (PB), fibra em detergente neutro (FDN) e fibra em detergente ácido (FDA) foram obtidas conforme a metodologia descrita anteriormente, antes e após incubação ruminal e expresso em porcentagem. Com o auxílio do SAEG – Sistema para Análises Estatísticas (RIBEIRO JÚNIOR, 2001), foram calculadas as taxas de degradação da MS, FDN, FDA e PB.

A taxa de degradação da MS, PB e FDN foi calculada, utilizando-se a equação proposta por Ørskov e McDonald (1979):

$$P = a + b (1 - e^{-ct})$$

Em que:

“p” corresponde à degradabilidade potencial; “a” a fração solúvel em água, mas potencialmente degradável; “c” à taxa de degradação da fração b; e “t” ao período de incubação em horas.

Os parâmetros não lineares, “a”, “b” e “c”, foram estimados por meio de procedimentos iterativos de quadrados mínimos. A degradabilidade efetiva (DE) da MS, PB, FDN, no rúmen, foi calculada utilizando o modelo:

$$DE: a + (b \times c / c + k)$$

Onde:

“K” corresponde à taxa estimada de passagem das partículas no rúmen.

As degradabilidades efetivas da MS, PB e FDN foram estimadas para cada forrageira, levando-se em conta as taxas de passagem de 2, 5 e 8%/hora, as quais podem ser atribuídas aos níveis de ingestão alimentar baixo, médio e alto, respectivamente, segundo preconizado pelo Agricultural Research Council – ARC (1984).

### 6.3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com base na composição bromatológica (Tabela 6.1) a palma forrageira fermentada com o *A. niger* e *Rhizopus sp.*, apresentou teor proteico superior à palma *in natura*, além do decaimento do teores fibrosos (FDN, FDA e Lignina) com potencial elevação da quantidade de carboidratos não fibrosos. O que garante a efetibilidade da fermentação em estado solido.

**Tabela 6.1** – Composição bromatológica das amostras utilizadas durante a incubação ruminal

Nutriente (g/kg)	Palma <i>in natura</i>	Palma com <i>A. niger</i>	Palma com <i>Rhizopus sp.</i>
Fibra em detergente neutro <sup>1</sup>	654,9 a	458,08 c	494,62 b
Fibra em detergente ácido <sup>1</sup>	386 a	281,2 c	296,62 b
Lignina <sup>1</sup>	66,74 a	54,42 c	54,75 b
Celulose <sup>1</sup>	319,26 a	226,42 c	242,2b
Hemicelulose <sup>1</sup>	268,9 a	176,88 c	198b
Materia mineral <sup>1</sup>	103,02 a	101,04 a	101,38 a
Extrato etereo <sup>1</sup>	32,98 a	31,32 a	30,74 a
Proteína bruta <sup>2</sup>	52,64 c	130,82 a	117,52 b
Materia seca <sup>1</sup>	121,42 a	89,66 c	98,88 b
Carboidratos não fibrosos <sup>1</sup>	157,16	276,86 b	373,1 a
Carboidratos totais <sup>1</sup>	811,36 a	768,14 b	747,36 c
Cinzas em detergente neutro <sup>1</sup>	73,32 a	70,78 b	72,63a
Cinzas em detergente ácido <sup>1</sup>	66,1 a	64,87 b	64,69 b
Nitrogênio não proteico <sup>2</sup>	7,2 a	8,39b	8,57c
Nitrogênio em detergente neutro <sup>2</sup>	2,2 a	3,79c	3,04b
Nitrogênio em detergente ácido <sup>2</sup>	1,5 a	2,28c	2,05b

<sup>1</sup> Com base na matéria seca.

<sup>2</sup> Com base no nitrogênio total.

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem (P<0,01) pelo teste Tukey.

Os parâmetros analisados em relação as taxas de passagem matéria seca (MS) estão descritos na tabela 6.2. A solubilidade da MS foi maior para a palma fermentada com *Rhizopus sp.* do que para palma *in natura* e a palma fermentada com *A. niger*

( $P < 0,01$ ), porém a palma com *A. niger* se mostrou superior em relação a degradabilidade do que a palma *in natura*. Quanto à fração potencialmente degradável da MS, a palma forrageira *in natura* apresentou o maior porcentagem do que os demais tratamentos, diferiram entre si ( $P < 0,01$ ), conseqüentemente a fração indegradável da palma *in natura* é menor que a da palma fermentada com *Rhizopus sp.*, já com o *A. niger* não diferiu estatisticamente ( $P < 0,01$ ). A cinética de degradação da matéria seca pode ser avaliada na figura 1.

**Tabela 6.2** – Fração solúvel (a), potencialmente degradável (b) e taxa de degradação da fração “b” (c) da matéria seca da palma *in natura*, palma com *A. niger* e *Rhizopus sp.*

Parâmetros	a (%)	b (%)	c (%)	R <sup>2</sup>
Palma <i>in natura</i>	4,3a	87,3a	0,06a	0,938
Palma com <i>A. niger</i>	3,6b	92,1b	0,062a	0,953
Palma com <i>Rhizopus sp.</i>	0,1c	96,1c	0,72b	0,961

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem ( $P < 0,01$ ) pelo teste Tukey.

A solubilidade da MS foi maior para a palma fermentada com *Rhizopus sp.* do que para palma *in natura* e a palma fermentada com *A. niger* ( $P < 0,01$ ), porém a palma com *A. niger* se mostrou superior em relação a degradabilidade do que a palma *in natura*. Quanto à fração potencialmente degradável da MS, a palma forrageira *in natura* apresentou o maior porcentagem do que os demais tratamentos, diferiram entre si ( $P < 0,01$ ), conseqüentemente a fração indegradável da palma *in natura* é menor que a da palma fermentada com *Rhizopus sp.*, já com o *A. niger* não diferiu estatisticamente ( $P < 0,01$ ).

A fração solúvel (a), potencialmente degradável (b) e taxa de degradação da fração “b” (c) da fibra em detergente neutro (FDN) da palma forrageira, palma com *A. niger*, palma com *Rhizopus sp.*, são apresentadas na Tabela 4. Os resultados mostraram que houve diferença ( $P > 0,01$ ) entre os parâmetros analisados. Mesmo não havendo diferença significativa, a taxa de degradação da fração “b” da FDN de palma *in natura* e a palma com *Rhizopus sp.* já a palma com *A. niger* foi menor em relação aos outros tratamentos. Porém valores da fração “b” foram superiores a 94% o que proporciona maior ingestão de matéria seca pelos animais ruminantes em função da alta taxa de desaparecimento num dado intervalo de tempo.

**Tabela 6.3** – Fração solúvel (a), potencialmente degradável (b) e taxa de degradação da fração “b” (c) da fibra em detergente neutro (FDN) da palma *in natura*, palma com *A. niger* e *Rhizopus sp.*

Parâmetros	a (%)	b (%)	c (%)	R <sup>2</sup>
Palma <i>in natura</i>	0,5a	96,6a	0,128a	98,5
Palma com <i>A. niger</i>	5,1c	94,5b	0,123a	98,4
Palma com <i>Rhizopus sp.</i>	2,5b	96,4a	0,140b	99,3

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem (P<0,01) pelo teste Tukey.

Em relação a, a fração “a” da FDN deveria ser próxima de zero, estando representada pelas partículas que são perdidas pelos poros dos sacos, uma vez que os constituintes da parede celular são insolúveis em água (JOBIM *et al.*,2011). Porém devido a fermentação em estado solido o numero de partículas solúveis é elevada devido a quebra de porcentagens fibrosas no meio de consumo que no presente trabalho foi a palma forrageira com diferentes inoculantes fúngicos.

A análise dos dados para as variáveis de degradabilidade *in situ* dos carboidratos estruturais presentes na fração FDA (Tabela 6.4), apresentou diferenças significativas (P<0,1), para a fração “a” com relação a palma *in natura* com a palma com *A. niger*, porém quando se compara a palma *in natura* com a palma com *Rhizopus sp.* os tratamentos não se difere entre si. O mesmo tratamento é encontrado para a fração potencialmente degradável “b”, já para a taxa de degradação da fração “b” os três tratamentos não diferem entre si estatisticamente.

**Tabela 6.4** – Fração solúvel (a), potencialmente degradável (b) e taxa de degradação da fração “b” (c) da fibra em detergente ácido (FDA) da palma *in natura*, palma com *A. niger* e *Rhizopus sp.*

Parâmetros	a (%)	b (%)	c (%)	R <sup>2</sup>
Palma <i>in natura</i>	0,1a	98,5a	0,097a	98,4
Palma com <i>A. niger</i>	2,7b	95,5b	0,098a	97,5
Palma com <i>Rhizopus sp.</i>	0,1a	99,0a	0,096a	97,3

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem (P<0,01) pelo teste Tukey.

Na tabela 6.4, é possível analisar a fração “b” para a palma com *A niger* foi menor ao se comparar com a palma in natura e fermentada com *Rhizopus sp.*, isso se dá pelo fato da disponibilidade inicial de FDA (Tabela 6.1) na amostra que é menor do que os outros tratamentos. Na figura 6,3 é possível observar a cinética de degradação do FDA.

Para as taxas de passagem da proteína bruta (PB) (Tabela 6.5), a fração solúvel (a) diferiu estatisticamente ( $P<0,01$ ) para todos os tratamentos, já a taxa de degradação da fração “b” não houve diferença ( $P<0,01$ ) entre a palma *in natura* e a fermentada com *A. niger*, em que a fermentação com *Rhizopus sp* se mostrou superior com o valor de 96,7% (Tabela 6.5), para a taxa de degradação da fração “b” descrita como “c”, os valores das fermentações com o *A. niger* e com *Rhizopus sp.* não diferiram entre si, em que apresenta-se valores de 0,130 e 0,139 respectivamente, já a palma in natura obteve o ince de 0,99, porém o teor de proteína bruta (Tabela 6.1) nas fermentações é superior ao da palma *in natura*, o que pode ser um indicio para a elevação dos teores nesse processo.

**Tabela 6.5** – Fração solúvel (a), potencialmente degradável (b) e taxa de degradação da fração “b” (c) da proteína bruta (PB) da palma *in natura*, palma com *A. niger* e *Rhizopus sp.*

Parâmetros	a (%)	b (%)	c (%)
Palma <i>in natura</i>	4,5b	93,7a	0,099a
Palma com <i>A. niger</i>	6,7c	92,5a	0,130b
Palma com <i>Rhizopus sp.</i>	2,9a	96,7b	0,139b

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem ( $P<0,01$ ) pelo teste Tukey.

O fato de a palma apresentar-se deficiente quanto ao seu conteúdo protéico em torno de 52,64 g/kg (Tabela 6.1) associado à pronta utilização desse nutriente pelos microrganismos ruminais para síntese de proteína microbiana, justifica a predominância na degradabilidade ruminal da proteína bruta desse alimento, o que pode associar relativo sucesso com a fementação em estado solido com a utização das duas espécies fúngicas filamentosas.

Em relação a degradabilidade potencial (DP) (Tabela 6.6) da da matéria seca, tendeu a aumentar ao se comparara a palma forrageira *in natura* (91,6%) com as fermentações realizadas com *A. niger* (95,7%) e *Rhizopus sp* (96,7%) com diferença significativa entre as amostras ( $P<0,01$ ). Sampaio (1994) relata, que forragens com altos valores de DP da matéria seca apresentam tendência a ter maior digestibilidade, o que

denota que a partir da bioconversão da palma por meio da fermentação em estado sólido além da elevação dos índices protéicos ocorre o aumento significativo da digestibilidade do substrato utilizado.

A degradabilidade potencial (DP) da fibra em detergente neutro (Tabela 6.6) teve comportamento semelhante ao observado para a matéria seca, ou seja, tendeu a aumentar com a inclusão dos inoculantes fúngicos, em que a palma *in natura* apresentou um índice de 97,1%, já para a fermentação da palma com o *A. niger* apresentou uma taxa de 99,6%, e com a fermentação realizada com o *Rhizopus sp.* apresentou 98,9%, todos os tratamentos diferiram entre si ( $P < 0,01$ ). Esses dados demonstram a elevação na degradabilidade potencial da palma fermentada com as espécies fúngicas o que garante a efetividade no tratamento biotecnológico.

Em relação a degradabilidade potencial (Tabela 6.6) da fibra em detergente ácido (FDA) sofreu um pequeno decaimento da palma forrageira *in natura* (98,6%) em relação a palma com o *A. niger* (98,2%), o que não afeta os índices de absorção visto que a diminuição foi de 0,4% não diferindo estatisticamente ( $P < 0,01$ ), este declínio pode estar relacionado com os valores iniciais de FDA, que da palma forrageira *in natura* (386 g/kg) é maior do que a palma fermentada com o *A. niger* (281,2 g/kg), em contrapartida a palma fermentada com o *Rhizopus sp.* demonstrou um índice de 99,1% superior ao da palma *in natura*, o que por hipótese denota a maior aceitabilidade deste fungo pela microbiota ruminal com relação a digestibilidade potencial da FDA.

Na degradabilidade potencial (DP) da proteína bruta (Tabela 6.6), é notório a elevação dos valores com relação a fermentação, em que a palma *in natura* foi de 97,1%, com *A. niger* foi de 99,2% e para o *Rhizopus sp.* 99,6% não houve diferença estatisticamente entre a palma fermentada com o *A. niger* e *Rhizopus sp.* ( $P < 0,01$ ), comportamento semelhante a DP da matéria seca e da FDN, em que a fermentação em estado sólido com o uso das duas espécies fúngicas favoreceu a degradabilidade da proteína bruta e conseqüentemente eleva os índices de absorção desde nutriente pelo organismo do ruminante.

**Tabela 6.6** – Degradabilidade potencial (DP) e efetiva (P) da matéria seca (MS), fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente ácido (FDA) e proteína bruta (PB).

Parâmetros	Degradabilidade potencial (DP)	Degradabilidade efetiva (P)		
		2%/hora	5%/hora	8%/hora
Matéria seca (%)				
Palma <i>in natura</i>	91,6a	69,8a	51,9a	41,7a
Palma com <i>A. niger</i>	95,7b	73,2b	54,6b	43,8b
Palma com <i>Rhizopus sp.</i>	96,2b	75,3c	56,8c	45,8c
Fibra em detergente neutro (%)				
Palma <i>in natura</i>	97,1a	84,0a	70,0a	59,9a
Palma com <i>A. niger</i>	99,6c	86,4b	72,3b	62,4b
Palma com <i>Rhizopus sp.</i>	98,9b	86,9b	73,5c	63,8c
Fibra em detergente ácido (%)				
Palma <i>in natura</i>	98,6a	81,7a	65,1a	54,0a
Palma com <i>A. niger</i>	98,2a	82,0a	65,9a	55,3b
Palma com <i>Rhizopus sp.</i>	99,1b	82,0a	65,2a	54,1a
Proteína bruta (%)				
Palma <i>in natura</i>	98,2a	82,5a	66,8a	56,3a
Palma com <i>A. niger</i>	99,2b	86,9b	73,5b	64,0b
Palma com <i>Rhizopus sp.</i>	99,6b	87,4b	74,0b	64,3b

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem ( $P < 0,01$ ) pelo teste Tukey.

A degradabilidade efetiva (P) da MS, FDN, FDA e PB, contidos na tabela 6.6, decresceu à medida que aumentou a taxa de passagem (k), se observados todos os níveis de inclusão estudados. Esse comportamento é explicado pelo menor tempo de permanência do alimento no trato digestivo para a ação da microbiota ruminal.

Observou-se (Tabela 6.6) que a degradabilidade efetiva da matéria seca aumentou em todas as taxas de passagem (2, 5 e 8%/hora), com relação a palma forrageira *in natura* com a palma fermentada com *A. niger* e com *Rhizopus sp.*, foi notado que as amostras fermentadas diferiram entre si ( $P < 0,01$ ) em todas as faixas de passagem estudadas, com isso o *Rhizopus sp.* obteve os melhores índices de passagem. Aroeira *et al.* (1996) afirma, que devido às semelhanças entre as digestibilidades da matéria seca e da matéria orgânica como energia disponível, a degradabilidade efetiva da matéria seca pode ser considerada como a energia digerida no rúmen. Portanto a ingestão da palma forrageira fermentada com as espécies fúngicas aqui estudadas garante mais energia liberada no trato ruminal.

A degradabilidade efetiva (P) para a fibra em detergente neutro e fibra em detergente ácido (Tabela 6.6), apresentou o mesmo comportamento da degradabilidade efetiva da matéria seca, em que foi observado a elevação dos índices de passagem em todas as taxas de passagem estudadas, ao se comparar a palma *in natura* com as amostras fermentadas, em que para a degradabilidade da FDN o *A. niger* demonstrou mais efetividade, já para a FDA o *Rhizopus sp.* obteve um maior percentual de passagem.

Para a degradabilidade efetiva da proteína bruta também foi observado a elevação dos índices em comparação a palma *in natura* com as fermentações, as amostras fermentadas com *A. niger* e *Rhizopus sp.* não diferiram estatisticamente entre si ( $P < 0,01$ ). A flora microbiana do rúmen transforma nitrogênio não protéico e protéico degradável (proteína disponível) em proteína microbiana, desde que disponha de energia (RÊGO *et al.*, 2009). Este trabalho se destaca pela presença de proteína unicelular fúngica solúvel em dois tratamentos (*A. niger* e *Rhizopus sp.*) o que garante uma maior disponibilidade de proteína assimilável à palma forrageira conforme é apresentado na Tabela 6.6. Desta forma, a disponibilidade de energia e nitrogênio para os microrganismos é determinada pelas taxas de degradação e passagem pelo rúmen, e influenciam a eficiência e a quantidade de proteína microbiana sintetizada (CARVALHO *et al.*, 2008) e conseqüente os demais nutrientes são disponibilizados da mesma forma.

## 6.4 – CONCLUSÃO

A inclusão dos fungos filamentosos *A. niger* e *Rhizopus sp.* alidados ao tempo de 196 horas em fermentação em estado solido, resulta em uma maior degradabilidade potencial e efetiva, o que possibilita a ser utilizado como fonte de nutricional com base no enriquecimento protéico soluvel em dietas para ruminantes.

## 6.5 – AGRADECIMENTOS

Ao Banco do Nordeste do Brasil (BNB), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

## 6.6 – REFERÊNCIAS

AGRICULTURAL RESEARCH COUNCIL. **The Nutrient Requirements of Ruminant Livestock**. Supplement No.1., 1984.

AOAC. (ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS). **Official methods of analysis**. 15.ed. Washington: AOAC, 1990.

ARAÚJO, L. F.; SILVA, F. L. H.; BRITO, E. A.; OLIVEIRA JÚNIOR, S.; SANTOS, E. S. Enriquecimento protéico da palma forrageira com *Saccharomyces cerevisiae* para alimentação de ruminantes. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.60, n.2, 401-407, 2008.

AROEIRA, L.J.M.; LOPES, F.C.F.; DAYRELL, M.S. Degradabilidade de alguns alimentos no rúmen de vacas holandês/zebu. **Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, v. 25, n. 6, p. 1178-1186, 1996.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS - AOAC. **Official methods of analysis**.18.ed. Washington D.C., 2005.

BALSALOBRE, M.A.A.; CORSI, M.; SANTOS, P.M.; VIEIRA, I, CÁRDENAS, R. R. Composição química e fracionamento do nitrogênio e dos carboidratos do capim-tanzânia irrigado sob três níveis de resíduo pós-pastejo. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.32, p.519-528, 2003.

- CARVALHO, G. G. P.; GARCIA, R.; PIRES, A. J. V.; DETMANN, E.; PEREIRA, O. G.; FERNANDES, F. E. P. Degradação ruminal de silagem de capim-elefante emurcheado ou com diferentes níveis de farelo de cacau. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 37, n. 8, p.1347-1354, 2008.
- CARVALHO, G.G.P., PIRES, A.J.V., VELOSO, C.M., SILVA, F.F. e SILVA, R.R. Degradabilidade ruminal do feno de forrageiras tropicais. **Revista Brasileira Agrociências**, v. 12, p.81-85, 2006.
- JOBIM, C.C. ; FERREIRA, G. A.; BUMBIERIS JÚNIOR, V. H.; CALIXTO JÚNIOR, M.; SANTOS, G. T. Cinética de degradação ruminal dos fenos de alfafa e Tifton-85 e da silagem de milho. **Semina. Ciências Agrárias**, v. 32, p. 747-758, 2011.
- LIRA, M. A.; SANTOS, M.V.F.; CUNHA, M.V.; MELLO, A.C.L.; FARIAS, I.; SANTOS, D.C. A Palma Forrageira na Pecuária do Semi-árido. In: GOMIDE, C.A.M. et al. **Alternativas Alimentares para Ruminantes**. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2006. cap.1, p. 17-33.
- ØRSKOV, E.R.; McDONALD, J. The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. **Journal of Agricultural Science**, v.92, p. 499-503, 1979.
- RÊGO, A. C.; TELES, M. M.; NEIVA, J. N. M.; CANDIDO, M. J. D.; FEITOSA, J. V.; GOMES, F. H. T. Degradação da matéria seca, proteína bruta e fibra em detergente neutro de silagens de capim-elefante contendo pedúnculo de caju desidratado. **Ciência Animal Brasileira**, v. 10, p. 735-744, 2009.
- RIBEIRO JR., J.I. **Análises estatísticas no SAEG** (Sistema para análises estatísticas). Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2001. 301p.
- SAMPAIO, I.B.M.; PIKE, D.J. OWEN, E. Optimal design for studying dry matter degradation in the rumen. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 47, n. 3, p. 373-383, 1995.

- SANTOS, T. C.; CAVALCANTI, I. S.; BONOMO, R. C. F.; SANTANA, N. B.; FRANCO, M. Optimization of productions of cellulolytic enzymes by *Aspergillus niger* using residue of mango a substrate. **Ciência Rural** (UFSM. Impresso), v. 41, p. 2210-2216, 2011b.
- SANTOS, T. C.; GOMES, D. P. P.; BONOMO, R. C. F.; FRANCO, M. Optimisation of solid state fermentation of potato peel for the production of cellulolytic enzymes. **Food Chemistry**, v. 133, p. 1299-1304, 2012.
- SNIFFEN, C.J.; O'CONNOR, J.D.; VAN SOEST, P.J.; FOX, D.G.; RUSSELL, J.B. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: II. Carbohydrate and protein availability. **Journal of Animal Science**, v.70, n.12, p.3562-3577, 1992.
- VAN SOEST, P.J. **Nutritional ecology of the ruminant**. 2.ed. Ithaca: Cornell University Press, 1994. 476 p.
- VAN SOEST, P.J., ROBERTSON, J.B., LEWIS, B.A. Symposium: carbohydrate methodology, metabolism, and nutritional implications in dairy cattle. **Journal Dairy Science**, v.74, n.10, p.3583-3597, 1991.
- WANDERLEY, W.L., FERREIRA, M.A., ANDRADE, D.K.B., VÉRAS, A.S.C., LIMA, L.E. e DIAS, A.M.A.. Palma forrageira (*Opuntia ficus indica* Mill) em substituição à silagem de sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) na alimentação de vacas leiteiras. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 31, p. 273-281, 2002.
- YASUHARA, T.; NOKIHARA, K. High-throughput analysis of total nitrogen content that replaces the classic Kjeldahl method. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 49, p. 4581-4583, 2001.