

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS - UFGD**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E AMBIENTAIS - FCBA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA**  
**GERAL/BIOPROSPECÇÃO**

ANA CAROLINA DA COSTA

**XILANASES DE *Trichoderma piluliferum* E *Trichoderma viride*: PRODUÇÃO,  
CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E APLICAÇÕES INDUSTRIAIS**

Dourados, MS  
2016

ANA CAROLINA DA COSTA

**Xilanases de *Trichoderma piluliferum* e *Trichoderma viride*: produção,  
caracterização bioquímica e aplicações industriais**

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais da Universidade Federal da Grande Dourados, FCBA/UFGD para obtenção do título de Mestre em Biologia Geral/Bioprospecção.

Área de Concentração: Bioprospecção

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Simões Ribeiro Leite

Dourados, MS

2016

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).**

C838x Costa, Ana Carolina Da

XILANASES DE *Trichoderma piluliferum* E *Trichoderma viride*: PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E APLICAÇÕES

INDUSTRIAIS / Ana Carolina Da Costa -- Dourados: UFGD, 2016.

48f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Rodrigo Simões Ribeiro Leite

Dissertação (Mestrado em Biologia Geral/Bioprospecção) - Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais, Universidade Federal da Grande Dourados.

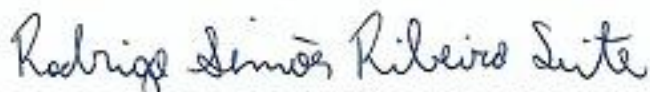
Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

"XILANASES DE *Trichoderma piluliferum* E *Trichoderma viride*: PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E APLICAÇÕES INDUSTRIAIS".

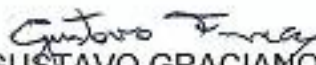
POR

**ANA CAROLINA DA COSTA**

DISSERTAÇÃO APRESENTADA À UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS (UFGD), COMO PARTE DOS REQUISITOS EXIGIDOS PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM BIOLOGIA GERAL - ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: "BIOPROSPECÇÃO".



PROF. DR. RODRIGO SIMÕES RIBEIRO LEITE  
ORIENTADOR - UFGD



PROF. DR. GUSTAVO GRACIANO FONSECA  
MEMBRO TITULAR - UFGD



PROF. DR. JEFFERSON RODRIGUES GANDRA  
MEMBRO TITULAR - UFGD

Aprovada em 26 de agosto de 2016.

Dedico este trabalho aos meus pais, Marco e Yukari, que sempre acreditaram em mim e me deram todo o apoio para conclusão deste trabalho, amo vocês.

## **AGRADECIMENTOS**

*Agradeço em primeiro lugar a Deus por ter iluminado sempre meus caminhos, ter me concedido saúde, paz e discernimento para conduzir este trabalho.*

*Aos meus pais, Marco e Yukari, pelo amor e apoio sempre.*

*Aos meus irmãos, Monique e João Vítor, pelo carinho e pela amizade.*

*À minha família que sempre que precisei esteve me apoiando e me orientando, principalmente aos meus primos Leonora e Luiz (vocês são incríveis!).*

*Ao Gabriel que sempre acreditou em mim e me deu forças para seguir em frente.*

*Aos meus amigos queridos que sempre me alegraram e me deram força.*

*Aos meus companheiros e amigos do laboratório que estiveram dia a dia ao meu lado e que contribuíram diretamente na realização desse trabalho.*

*Ao professor Dr. Rodrigo Simões Ribeiro Leite pela confiança, orientação e aprendizagem durante todo o período em que estive na UFGD.*

*Aos professores Dr. Jefferson Rodrigues Gandra e Dr. Rafael Henrique de Tonissi e Buschinelli de Goes e seus alunos pela disponibilidade em me ajudar nos experimentos de digestibilidade e pela nova parceria formada.*

*Agradeço aos professores Dr. Marcelo Fossa da Paz e Dr. Gustavo Graciano Fonseca pelas colaborações no meu exame de qualificação.*

*Agradeço aos professores Dr. Gustavo Graciano Fonseca e Dr. Jefferson Rodrigues Gandra por aceitarem participar da minha defesa de mestrado.*

*Agradeço aos professores Dr. Marcelo Fossa da Paz e Dra. Eliana Janet Sanjinez Argandoña por aceitarem meu convite como suplentes da banca de minha defesa.*

*Agradeço aos técnicos dos laboratórios da Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais pela ajuda e disponibilidade.*

*Agradeço ao PPG-Bioprospecção, falo dos meus professores, colegas e secretários (Paulo você é DEMAIS!) que me forneceram todo o apoio para eu estar concluindo o processo de formação do mestrado.*

*Agradeço aos órgãos financiadores desse trabalho: CAPES, CNPQ e FUNDECT.*

*E a todos que de alguma maneira me ajudaram na realização desse trabalho.*

**Muito Obrigada!**

O mundo é de Deus e Ele o empresta aos corajosos.

" Sem mim, nada podeis fazer " (Jo 15,5)

## RESUMO

A necessidade do uso da tecnologia enzimática para bioconversão de compostos lignocelulósicos impulsiona pesquisas para reduzir custos e viabilizar o desenvolvimento de diversos produtos e serviços biotecnológicos. O Cultivo em Estado Sólido de microrganismos é uma alternativa de baixo custo que permite empregar resíduos agroindustriais como substrato para produção de enzimas. Este trabalho teve como objeto de estudo as xilanases, enzimas do complexo hemicelulolítico que auxiliam a degradação da parede celular vegetal. Visamos otimizar a produção de xilanase por Cultivo em Estado Sólido de duas linhagens de *Trichoderma* spp. isoladas do Pantanal sul-mato-grossense, caracterizar as enzimas produzidas e avaliar seu potencial para aplicação em dietas de bovinos. Os parâmetros de cultivo avaliados foram: o uso de diferentes resíduos agroindustriais como substrato (farelo de trigo, farelo de soja, casca de arroz, bagaço de cana, palha de milho e sabugo de milho), umidade inicial do meio de cultivo (de 50 a 80%) e tempo de cultivo (de 24 a 120 horas). As enzimas foram caracterizadas quanto ao efeito de pH e temperatura sobre sua função catalítica. Os extratos obtidos da otimização dos parâmetros de cultivo foram avaliados quanto ao potencial catalítico e digestibilidade *in vitro* de diferentes forragens. O fungo *T. piluliferum* teve melhor produção da enzima xilanase, cerca de 301,8 U g<sup>-1</sup> (30,18 U mL<sup>-1</sup>), quando cultivado em farelo de trigo, com 75% de umidade, por 96 horas. O pH ótimo da enzima produzida por *T. piluliferum* foi 4,5, obtendo como temperatura ótima 50°C. A enzima foi estável em uma faixa de pH que variou de 3,0 a 10,0 e manteve-se estável por uma hora a 40°C. Para o fungo *T. viride* os melhores parâmetros de cultivo foram: farelo de trigo como substrato, 65 e 70% de umidade inicial e tempo de cultivo de 48 horas. A xilanase produzida por esse fungo apresentou pH ótimo de 6,0, temperatura ótima de 45°C e foi estável a faixa de pH que variou de 3,0 a 10,0, mantendo sua atividade após uma hora à 40°C. Ambos os extratos enzimáticos produzidos foram eficazes no aumento da digestibilidade de forragens: Feno Tifton 185, silagem de cana e silagem de milho. O uso de enzimas xilanases produzidas neste trabalho como aditivos alimentares para bovinos pode trazer benefícios a nutrição animal. As xilanases presentes nos extratos enzimáticos se mostraram promissoras para produção de xilooligossacarídeos. Os extratos enzimáticos produzidos apresentaram baixa atividade de celulasas, indicando também potencial para aplicação em processos de biobranqueamento da polpa de celulose em indústrias de papel e celulose.

**Palavras-chave:** 1) Cultivo em Estado Sólido 2) Digestibilidade 3) Hemicelulase



## ABSTRACT

The need for the use of enzyme technology for bioconversion of lignocellulosic compounds boosts researches to cheapen and facilitate the development of several biotechnological products and services. Solid State Cultivation of microorganisms is a low-cost alternative that allows us to use agro-industrial by-products as a substrate for the enzymes production. In this study we investigated the xylanase, enzyme of the hemicellulolytic complex which assist the degradation of plant cell wall. We aimed to optimize the production of xylanase by solid state cultivation by two strains of *Trichoderma* spp. isolated from the Pantanal/MS, the characterization of the enzymes produced was investigated and we evaluated its potential for use in cattle diets. The parameters of cultivation evaluated was: the use of different by-products as a substrate (wheat bran, soy bran, rice peel, sugarcane bagasse, corn straw and corn cob), initial moisture content of the medium (50-80%) and cultivation time (from 24 to 120 hours). The enzymes were characterized about the pH effect and temperature effect on its catalytic function. The extracts obtained from the optimization of culture parameters were evaluated for the catalytic potential. The fungus *T. piluliferum* had better production of xylanase enzyme, about 301.8 U g<sup>-1</sup> (30.18 U mL<sup>-1</sup>), when grown on wheat bran, with 75% moisture for 96 hours. The optimum pH of the enzyme produced by *T. piluliferum* was 4.5, obtaining as the optimum temperature 50°C. The enzyme was stable at a pH range which ranged from 3.0 to 10,0 and it remained stable for 1 hour at 40°C. The best culture parameters for the cultivation of *T. viride* were: wheat bran as substrate, 65 and 70% initial moisture content and 48 hours cultivation. The xylanase produced by this fungus had 6.0 as pH optimum and 45°C as optimum temperature, the enzymes was stable at pH range which ranged from 3.0 to 10,0 keeping its activity after 1 hour at 40°C. Both enzyme extracts produced were effective in increasing feed digestibility of: Tifton Hay 185, sugarcane and corn silage. The use of xylanase enzymes produced in this work as feed additives for cattle can benefit animal nutrition. The xylanases present in the enzyme extract proved promising for production xilooligosacáridos. The enzyme extracts showed low cellulase activity, which indicates potential for application in biobleaching processes of cellulose pulp in the pulp and paper industries.

Keywords: 1) Solid State Cultivation; 2) Digestibility 3) Hemicellulase

## LISTA DE FIGURAS

### Capítulo 1:

- Figura 1 - Estrutura da parede celular vegetal.....1
- Figura 2 - Estrutura química da hemicelulose, representada por xiloses unidas por ligações  $\beta$ , 1-4 e com uma ramificação de arabinose.....2
- Figura 3 - Enzimas do complexo hemicelulolítico.....4

### Capítulo 2:

- Figura 1 - Produção de xilanase pelos isolados *Trichoderma piluliferum* e *Trichoderma viride* por Cultivo em Estado Sólido. **A)** Influência de diferentes substratos; **B)** Influência de diferentes proporções de farelo de trigo e bagaço de cana; **C)** Influência de diferentes umidades; **D)** Influência do tempo de produção. A produção média com letras diferentes indicam diferenças significativas de acordo com o teste de Tukey para  $p < 0,05$ .....22
- Figura 2- Caracterização bioquímica da xilanase produzida pelos fungos *T. piluliferum* e *T. viride*. **A)** pH ótimo; **B)** Temperatura ótima; **C)** Estabilidade ao pH; **D)** Estabilidade a temperatura.....26
- Figura 3 - Tempo de meia vida ( $t_{1/2}$ ) das xilanases realizado a 45°C utilizando os extratos produzidos pelos fungos *Trichoderma piluliferum* e *Trichoderma viride*.....27
- Figura 4 - Cromatografia em Camada Delgada (CCD) do produto da reação de hidrólise por 10 minutos de xilana beechwood (0,5%) pelas enzimas produzidas por *T. piluliferum* (A) e *T. viride* (B). Como padrões para análise do hidrolisado foram utilizados xilose e xilana (0,1%).....29
- Figura 5 - Porcentagem de Digestibilidade In Vitro de Fibra em Detergente Neutro (DIVFDN) de diferentes forragens sem tratamento enzimático e tratadas com 6 U. L<sup>-1</sup>de xilanase utilizando extrato enzimático de: A) *T. piluliferum* e B) *T. viride*.....31

## LISTA DE TABELAS

### *Capítulo 2:*

Tabela 1 - Perfil catalítico dos extratos dos fungos *T. piluliferum* e *T. viride*.....28

Tabela 2 - Teores médios de matéria seca (MS), Fibra em Detergente Neutro (FDN), Fibra em Detergente Ácido (FDA) e Hemicelulose dos alimentos incubados.....32

## LISTA DE ABREVIACES

CCD: Cromatografia de Camada Delgada

CES: Cultivo em Estado Sólido

CMCase: Carboximetil Celulase

CS: Cultivo Submerso

DIVFDN: Digestibilidade *in vitro* de Fibra em Detergente Neutro

DIVMS: Digestibilidade *in vitro* de Massa Seca

DNS: 3,5-cido Dinitrosalicílico

FDN: Fibra em Detergente Neutro

FDA: Fibra em Detergente cido

FPase: Atividade de Papel Filtro

*g*: Força Gravitacional

MS: Massa Seca

PNA: Polissacarídeo não-amiláceo

rpm: Rotações Por Minuto

*t*<sub>1/2</sub>: tempo de meia vida

TNT: Tecido não-tecido

*T*<sub>p</sub>: Tampão

U: Unidade de Atividade Enzimática ( 1U  a quantidade de enzima capaz de liberar 1µmol de produto por minuto de reação)

XOS: Xilooligossacarídeos

## SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 - REVISÃO DE LITERATURA .....	1
1.1. XILANASES .....	1
1.2. APLICAÇÕES INDUSTRIAIS DAS XILANASES .....	4
1.3. CULTIVO EM ESTADO SÓLIDO .....	6
2. OBJETIVOS .....	7
2.1. OBJETIVO GERAL .....	7
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	7
3. REFERÊNCIAS.....	8
CAPÍTULO 2 - ESTUDO DO POTENCIAL CATALÍTICO DE XILANASES PRODUZIDAS POR <i>Trichoderma piluliferum</i> E <i>Trichoderma viride</i> COMO ADITIVO ENZIMÁTICO NA ALIMENTAÇÃO DE BOVINOS VISANDO O AUMENTO DE DIGESTIBILIDADE.....	14
INTRODUÇÃO .....	14
MATERIAL E MÉTODOS .....	15
MICRORGANISMOS .....	15
CULTIVO EM ESTADO SÓLIDO .....	15
EXTRAÇÃO DAS ENZIMAS .....	16
DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE XILANASE.....	16
EFEITO DO pH E TEMPERATURA SOBRE A ATIVIDADE ENZIMÁTICA.....	16
AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CATALÍTICO DOS EXTRATOS ENZIMÁTICOS PRODUZIDOS .....	17
CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD).....	17
DIGESTIBILIDADE <i>IN VITRO</i> UTILIZANDO XILANASE COMO SUPLEMENTO ENZIMÁTICO .....	18
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	19
CULTIVO EM ESTADO SÓLIDO PARA PRODUÇÃO DE XILANASES.....	19
CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DAS XILANASES PRODUZIDAS .....	23
PERFIL CATALÍTICO DOS EXTRATOS ENZIMÁTICOS.....	27
DIGESTIBILIDADE <i>IN VITRO</i> .....	30
CONCLUSÕES .....	32
REFERÊNCIAS.....	33

## CAPÍTULO 1 - REVISÃO DE LITERATURA

### 1.1.XILANASES

O uso de enzimas no contexto industrial é uma prática comum e até indispensável em alguns processos. As enzimas podem formar compostos altamente desejáveis e catalisar reações de modo seguro e limpo. Dentre esses catalizadores destacamos a ação das xilanases, que vem sendo aplicadas em diversos segmentos industriais. As xilanases são enzimas do complexo hemicelulolítico, ou seja, atuam sobre a fibra de hemicelulose presente na parede das células vegetais (KNOB et al., 2014; MENEGUETTI, 2013; OLIVEIRA, 2010;).

A parede celular vegetal confere as células vegetais integridade estrutural, proteção, sinalização e coordenação no crescimento e desenvolvimento (RODRIGUES, 2012). Essa estrutura envolve as células vegetais e é formada por fibras de celulose, hemicelulose, pectina e proteínas solúveis inseridas em uma matriz de lignina, a qual confere rigidez a parede celular vegetal (Figura 1) (BON et al., 2008; ZHANG et al., 2014).

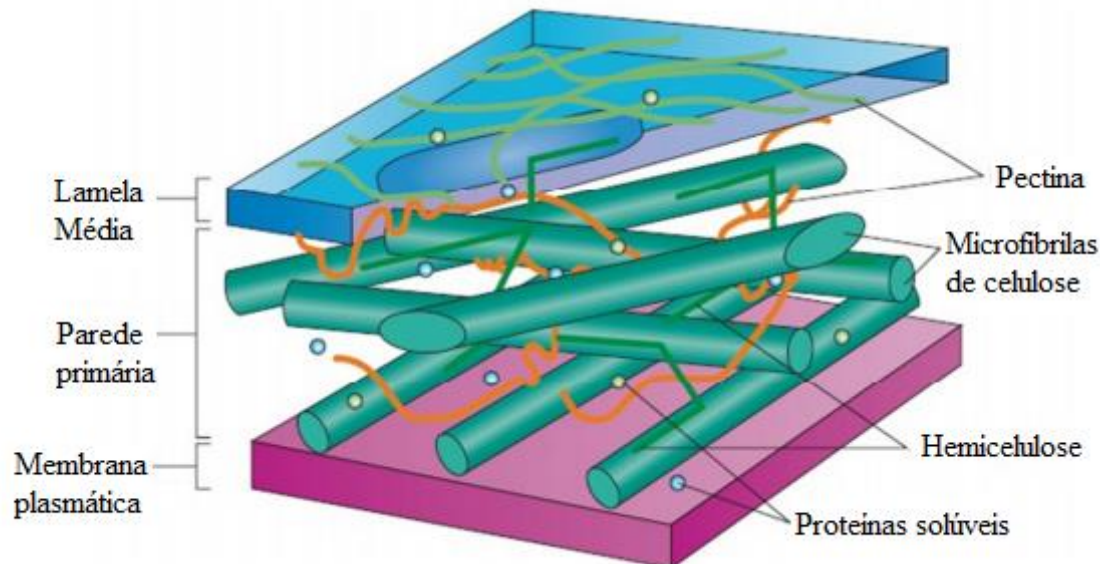


Figura 1 - Estrutura da parede celular vegetal

Fonte: modificado de STICKLEN, 2008.

As hemiceluloses estão complexadas e ligadas em alguns pontos com as fibras de celulose através de ligações de hidrogênio, formando o complexo celulose-

hemicelulose o qual facilita o arranjo paralelo das fibras de celulose (DURAN et al., 2008; RODRIGUES, 2012; RUEGGER e TAUK-TORNISIELO, 2002). A pectina presente na parede determina seu grau de porosidade, armazena cálcio e é responsável por liberar moléculas sinalizadoras de defesa da planta (DE-SOUZA, 2011). As proteínas, por sua vez, tem papel estrutural e enzimático. A lignina é um composto amorfo de natureza aromática que interage com as fibras de celulose e hemicelulose na parede celular vegetal conferindo a ela rigidez e proteção aos tecidos de danos físicos e de ataques de microrganismos fitopatógenos (SALIBA et al., 2001). A proporção destes componentes da parede celular vegetal pode variar de acordo com a espécie e idade da planta, no geral, podemos atribuir cerca de 90% da massa da parede aos carboidratos nela presentes (RODRIGUES, 2012).

Dentre os carboidratos que formam a parede celular vegetal podemos destacar a hemicelulose, segundo polímero mais abundante na natureza, ficando atrás apenas da celulose (ALVES-PRADO et al., 2010). Os componentes hemicelulósicos incluem polissacarídeos com estruturas lineares e/ou ramificadas (ALVES-PRADO et al., 2010; DURAN et al., 2008; RUEGGER e TAUK-TORNISIELO, 2002). As unidades que formam as cadeias de hemicelulose podem ser aldo-pentoses, como xilose, arabinose e ramnose, aldo-hexoses, como glicose, manose e galactose, ácidos urônicos como os ácidos glucurônicos e galacturônicos (BON et al., 2008; HOFFMAN, 2013; TERRONE, 2013).

A xilana é o principal componente da hemicelulose, podendo chegar a 70% da sua composição. Ela consiste de um polissacarídeo formado por monômeros de xilose unidos por ligações glicosídicas ( $\beta$ -1,4), podendo apresentar ramificações com os outros grupos de açúcares já citados (ALVES-PRADO et al., 2010) (Figura 2).

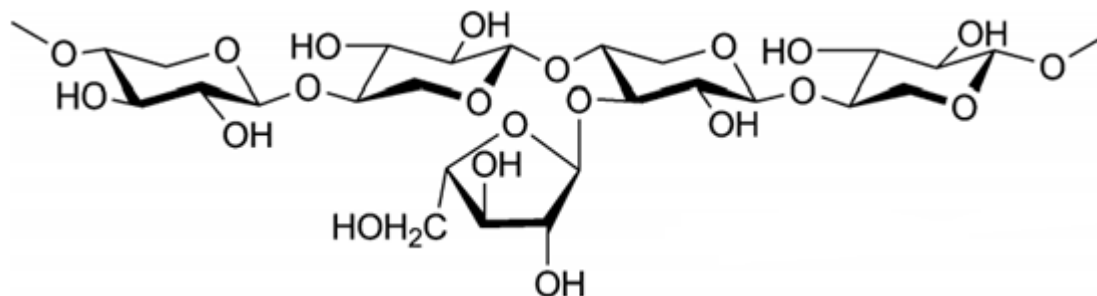


Figura 2 - Estrutura química da hemicelulose, representada por xiloses unidas por ligações  $\beta$ , 1-4 e com uma ramificação de arabinose.

Fonte: Modificado de DHEPE e SAHU, 2010.

Para obtenção de xilose ou xilooligossacarídeos é necessário promover o desarranjo da parede celular vegetal e da hemicelulose, para isso alguns autores propõem a utilização de processos biotecnológicos, mais precisamente da utilização de enzimas microbianas de degradação da parede celular vegetal, como as hemicelulases (GOWDHAMAN et al., 2014; MITTAL et al., 2013; THOMAS et al., 2013).

As enzimas hemicelulolíticas formam um complexo capaz de degradar a hemicelulose presente na parede celular vegetal e podem ser classificadas em dois grupos: as que degradam a cadeia principal (despolimerizantes) e as que degradam as cadeias laterais (desramificantes) (MAGALHÃES, 2005). As principais enzimas envolvidas na degradação da hemicelulose são as xilanases, estas enzimas atuam na cadeia central da hemicelulose, a xilana, reduzindo drasticamente o grau de polimerização deste polissacarídeo. Existem dois tipos de xilanases: As endo-1,4- $\beta$ -xilanases (EC 3.2.1.8) que atacam internamente o esqueleto estrutural da molécula liberando xilooligossacarídeos e as  $\beta$ -D-xilosidades (EC 3.2.1.37) que hidrolisam externamente a cadeia de xilana e pequenos xilooligosacarídeos liberando xilose (KESHWANI e CHENG, 2009; KNOB et al., 2014).

Para que ocorra a hidrólise completa da hemicelulose é preciso a ação sinérgica de enzimas acessórias capazes de clivar as cadeias laterais como as  $\alpha$ -arabinofuranosidas (EC 3.2.1.55) que hidrolisam as terminações não-redutoras de  $\alpha$ -L-1,2-,  $\alpha$ -L-1,3- e  $\alpha$ -L-1,5-arabinofuranosil (NUMAN e BHOSLE, 2006), as feruloil esterases (EC 3.1.1.73) que clivam as ligações entre o polissacarídeo de xilana e o feruloil (ABOKITSE, et al., 2010), as  $\alpha$ -glucuronidas (EC 3.2.1.139), que liberam os ácidos glicurônicos da xilana (LEE et al., 2009) e as acetilxilano esterases responsáveis pela desacetilação das xilanas e xilooligossacarídeos (EC 3.1.1.72) (HOFFMAN, 2013) (Figura 3).

O uso de todo o complexo enzimático para degradação completa da hemicelulose depende do objetivo de sua aplicação. No entanto, a utilização das xilanases reduzem consideravelmente o nível de polimerização da hemicelulose resultando em significativa desorganização da estrutura da parede celular vegetal (KHANDEPARKER e NUMAN, 2008).



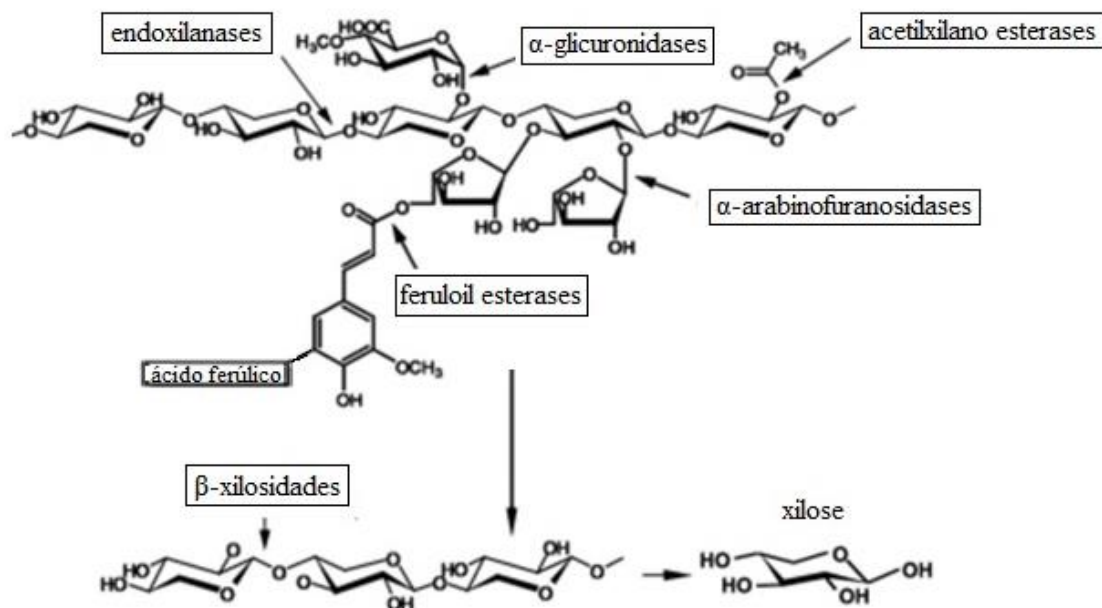


Figura 3 - Enzimas do complexo hemicelulolítico.

Fonte: Modificado de SUN et al., 2012.

## 1.2. APLICAÇÕES INDUSTRIAIS DAS XILANASES

As xilanases vem sendo aplicadas em diversos segmentos industriais, como na produção de etanol de segunda geração, nas indústrias alimentícias, farmacêuticas, odontológicas, no branqueamento de polpas de papel e celulose e no desenvolvimento de rações animais como suplemento enzimático (KNOB et al., 2014; MENEGUETTI, 2013; OLIVEIRA, 2010).

Na produção de etanol de segunda geração, algumas espécies de microrganismos são capazes de utilizar a xilose, proveniente da quebra enzimática da xilana, como fonte de carbono e metabolizá-la em etanol, como os gêneros de leveduras: *Brettanomyces*, *Candida*, *Clavispora*, *Kluyeromyces*, *Pachysolen*, *Pichia* e *Schizosaccharomyces*. Outras espécies como *Sacharomyces cerevisiae* vem sendo estudadas para essa aplicação através da inserção de genes por engenharia genética (HA et al., 2011; MARTINS, 2011; WEI et al., 2013).

As xilanases são utilizadas na panificação para decomposição de polissacarídeos não amiláceos, fibrosos e insolúveis, como hemicelulose, que desfavorecem a formação da malha de glúten e prejudicam a qualidade do miolo. Essas enzimas provocam mudanças na massa do pão quanto ao seu tempo de desenvolvimento, consistência, extensibilidade e resistência a quebra (BECKER et al., 2009; OLIVEIRA, 2010).

Nas indústrias farmacêuticas as xilanases são utilizadas para produção de xilooligossacarídeos (XOS) e xilose. Os podem XOS ser utilizados como prebióticos

tanto para indústria farmacêutica quanto alimentícia, auxiliando a proliferação de microrganismos benéficos ao intestino quando consumidos por humanos e/ou animais (SADAF e KHARE, 2014).

A xilose, produto final da hidrólise de XOS pelas  $\beta$ -xilosidases pode, através da bioconversão utilizando a enzima xilose redutase, ser transformada em xilitol, amplamente utilizado como: edulcorante pelos diabéticos e anticariogênico em pastas de dente e enxaguantes bucais (RAFIQUL e MIMI., 2012). Outra aplicação da xilose é em testes de absorção intestinal, o qual utiliza deste açúcar como referência para absorção de açúcares pelo intestino (PERIN et al., 2001).

As xilanases podem ser utilizadas no biobranqueamento da polpa de celulose. A hemicelulose presente na parede celular vegetal liga a lignina às fibras de celulose. Dessa forma, as xilanases desestruturam a organização polimérica da parede celular vegetal, facilitando a remoção da lignina, reduzindo a quantidade de agentes químicos necessários para o branqueamento da polpa de celulose, o que minimiza a contaminação ambiental por compostos organoclorados (BECKER et al., 2009; BOTELLA et al., 2007; KNOB et al., 2014).

Entre as diversas aplicações das xilanases, destacamos seu uso na pecuária, atividade de grande importância econômica para o Brasil. As xilanases podem ser utilizadas como suplemento enzimático na dieta de ruminantes, a fim de contribuir com o aumento da digestibilidade dos alimentos. Algumas formulações de rações levam em seus ingredientes subprodutos agroindustriais ricos em hemicelulose, polissacarídeo não amiláceos (PNA), de lenta degradação. O uso de enzimas exógenas como suplemento alimentar contribui no aumento da taxa e extensão da digestão de forragem por ruminantes. Isso porque as enzimas hemicelulolíticas tornam-nas mais digestivas, além de auxiliarem na exposição de proteínas, amido e outros componentes da dieta (MENEGUETTI, 2013; NIELSEN et al., 2008; VIANA et al., 2011).

Alguns trabalhos também relatam que o uso de enzimas exógenas pode acelerar o desenvolvimento do rúmen em bezerros, antecipar o período de desmame, prevenir a ocorrência de distúrbios gastrintestinais, aumentar a resistência do organismo contra infecções e também diminuir a contaminação ambiental devido à diminuição da produção de metano pelo animal, já que este juntamente com o CO<sub>2</sub> são os principais causadores do efeito estufa (CAMPESTRINI et al., 2005; NOGUEIRA et al., 2013).

### 1.3. CULTIVO EM ESTADO SÓLIDO

A aplicação das xilanases em larga escala ainda apresenta alguns problemas a serem superados, como elevado custo de produção e baixa estabilidade das enzimas (ALVES-PRADO et al., 2010). Esses problemas podem ser superados pela seleção de linhagens hiperprodutoras da enzima de interesse, associada à otimização do processo de cultivo em meios de baixo valor agregado (LEITE et al., 2008).

A bioprospecção de microrganismos produtores de enzimas de degradação da parede celular vegetal é uma estratégia que vem sendo utilizada por pesquisadores brasileiros devido à elevada biodiversidade do país, atualmente ainda pouco explorada (PIROTA et al., 2015; MEDEIROS et al., 2003; GONÇALVES et al., 2013).

Para produção de enzimas de interesse industrial, duas metodologias são mais utilizadas, sendo elas: Cultivo Submerso (CS) e Cultivo em Estado Sólido (CES). Ambas tecnologias permitem a produção enzimática a partir de microrganismos que naturalmente produzem um complexo multiproteico de degradação dos componentes da parede celular vegetal (ALVES-PRADO et al., 2010). A escolha do método a ser empregado depende de fatores como custo, aplicação, adaptação do microrganismo ao meio de cultivo e ampliação de escala (AFONSO, 2012).

O Cultivo Submerso se caracteriza pelo desenvolvimento microbiano em uma matriz contendo nutrientes dissolvidos ou em suspensão, onde os parâmetros de pH, temperatura e oxigenação são de mais fácil controle quando comparados com o CES. O cultivo submerso, é mais indicado para processos que utilizam microrganismos unicelulares como bactérias e leveduras. Na maioria das vezes este tipo de cultivo utiliza meios de cultura quimicamente mais puros, assim o CS geralmente se torna um processo caro, sendo utilizado quando o custo de produção não é o problema principal (PINHEIRO, 2006).

Visando reduzir o custo de produção de enzimas industriais, trabalhos anteriores sugerem o Cultivo em Estado Sólido (DELABONA et al., 2012; LEITE et al., 2007; TERRASAN e CARMONA, 2015), que caracteriza-se pela técnica de crescimento de um microrganismo sobre uma matriz porosa, sólida e úmida, porém na ausência de água livre entre as partículas do substrato. Essa é uma metodologia indicada para fungos filamentosos devido à proximidade ao habitat natural desses microrganismos (SINGHANIA et al., 2009). O CES possibilita o uso de resíduos agroindustriais como matriz para o crescimento e desenvolvimento microbiano. Os resíduos agroindustriais são substratos complexos e apresentam em sua composição celulose, hemicelulose,

pectina, lignina e outros polímeros de origem vegetal (BOCCHINI-MARTINS et al., 2011). Geralmente, o cultivo de fungos decompositores de biomassa vegetal em resíduos agroindustriais resulta na produção de extratos enzimáticos ricos em diversas enzimas de degradação da parede celular vegetal. No entanto, a presença de outras enzimas no meio fermentado que não a de interesse pode ser um motivo de aumento de custo, pois se torna necessário a adição de etapas de purificação para retirada das outras enzimas. A obtenção de extratos enzimáticos ricos em xilanases e livres de celulases a partir do cultivo microbiano em resíduos agroindustriais é um desafio para aplicação em indústrias de papel e celulose, por exemplo, pois a presença de celulases na etapa de biobranqueamento da polpa de celulose pode afetar a qualidade da mesma (CARMONA et al., 2005; DA-SILVA et al. 2005).

Visto que o CES é uma metodologia indicada para produzir enzimas de degradação da parede celular com reduzido custo e aproveitando resíduos da agroindústria, utilizamos esta metodologia para produção de xilanases por duas linhagens selecionadas pelo nosso grupo de pesquisa para produção de xilanase, para que possamos contribuir com o incentivo ao uso de enzimas em larga escala.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. OBJETIVO GERAL**

O objetivo deste trabalho foi produzir xilanases com potencial biotecnológico pelo Cultivo em Estado Sólido dos fungos *Trichoderma piluliferum* e *Trichoderma viride*, utilizando resíduos agroindustriais como substratos.

### **2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Os objetivos específicos deste trabalho foram: determinar as condições ótimas de cultivo para produção de xilanase, caracterizar bioquimicamente as xilanases produzidas, avaliar o potencial catalítico dos extratos enzimáticos e determinar a digestibilidade de forrageiras suplementadas com os extratos enzimáticos.

### 3. REFERÊNCIAS

ABOKITSE, K.; WU, M.; BERGERON, H.; GROSSE, S.; LAU, P.C. Thermostable feruloyl esterase for the bioproduction of ferulic acid from triticale bran. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 87, p. 195-203, 2010. doi: 10.1007/s00253-010-2441-6.

AFONSO, L.C. Produção de celulases por cultivo em estado sólido e aplicação na hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar. 2012. 119 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

ALVES-PRADO, H.F.; PAVEZZI, F.C.; LEITE, R.S.R.; OLIVEIRA, V.M.; SETTE, L.D.; DA-SILVA, R. Screening and production study of microbial xylanase producers from Brazilian Cerrado. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 161, p. 333-346, 2010. doi: 10.1007/s12010-009-8823-5.

BECKER, N.B.; BARATTO, C.M.; GELINSKI, J.M.L.N. Properties of commercial  $\alpha$ -amylase and xylanase enzymes and its influence on the dough rheology and quality of form bread. **Evidência**, v.9, p. 67-82, 2009.

BOCCHINI-MARTINS, D.A.; ALVES-PRADO, H.F.; LEITE, R.S.R.; FERREIRA, H.; MORETTI, M.M.S.; DA-SILVA, R.; GOMES, E. Agroindustrial wastes as substrates for microbial enzymes production and source of sugar for bioethanol production. **Integrated Waste Management**, v. 2, p. 319-360, 2011. doi: 10.5772/23377.

BOTELLA, C.; DIAZ, A.; DE ORY, I.; WEBB, C.; BLANDINO, A. Xylanase and pectinase production by *Aspergillus awamori* on grape pomace in solid state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 42, p. 98-101, 2007. doi:10.1016/j.procbio.2006.06.025.

CARMONA, E.C.; FIALHO, M.B.; BUCHGNANI, E.B.; COELHO, G.D.; BROCHETO-BRAGA, M.R.; JORGE, J.A. Production, purification and characterization of a minor form of xylanase form *Aspergillus versicolor*. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 359-364, 2005. doi:10.1016/j.procbio.2004.01.010.

BON, E.P.S.; FERRARA, M.A.; CORVO, M.L. Enzimas em biotecnologia: produção, aplicações e mercado. Rio de Janeiro: **Interciência**, 2008. 506 p.

CAMPESTRINI, E.; SILVA, V.T.M.; APPELT, M.D. Utilização de enzimas na alimentação animal. **Revista Eletrônica Nutritime**, v. 2, p. 259-272, 2005.

DA-SILVA, R.; LAGO, E. S.; MERHEB, C. W.; MACCHIONE, M. M.; PARK, Y. K.; GOMES, E. Production of xylanase and CMCase on solid state fermentation in different residues by *Thermoascus aurantiacus* miehe. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 36, p. 235-241, 2005. doi: 10.1590/S1517-83822005000300006.

DELABONA, P.S.; PIROTA, R.D.P.B.; CODIMA, C.A.; TREMACOLDI, C.R.; RODRIGUES, A.; FARINAS, C.S. Using amazon forest fungi and agricultural residues as a strategy to produce cellulolytic enzymes. **Biomass and Bioenergy**. v. 37. p. 243-250, 2012. doi:10.1016/j.biombioe.2011.12.006.

DE-SOUZA, C.R. Caracterização da mobilização dos polissacarídeos da parede celular em palha de cana de açúcar submetida às condições de campo. 2011. 64 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto Butantan, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

DHEPE, P.L.; SAHU, R. A solid-acid-based process for the conversion of hemicellulose. **Green Chemistry**, v. 12, p. 2153-2156, 2010. doi: 10.1039/c004128a.

DURAN, N.; MARQUES, S.; SALLES, B.C.; MEDEIROS, R.G.; FILHO, E.X.F. Enzimas na indústria de polpa e papel. In: BOM, E.P.S. (Org.). Enzimas em biotecnologia: produção, aplicações e mercado. Rio de Janeiro: Editora Interciência Ltda, p. 205-239, 2008.

GONÇALVES, F.A.; LEITE, R.S.R.; RODRIGUES, A.; ARGANDOÑA, E.J.S.; FONSECA, G.G. Isolation, identification and characterization of a novel high level  $\beta$ -glucosidase-producing *Lichtheimia ramosa* strain. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 2, p. 377-384, 2013. doi: 10.1016/j.bcab.2013.06.006.

GOWDHAMAN, D.; MANASWINI, V.S.; JAYANTHI, V.; DHANASRI, M.; JEYALAKSHMI, G.; GUNASEKAR, V.; SUGUMARAN, K.R.; PONNUSAMI, V. Xylanase production from *Bacillus aerophilus* KGJ2 and its application in xylooligosaccharides preparation. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 64. p. 90-98, 2014. doi:10.1016/j.ijbiomac.2013.11.012.

HA, S.J.; GALAZKA, J.M.; KIM, S.R.; CHOI, J.H.; YANG, X.; SEO, J.H.; GLASS, N.L.; CATE, J.H.D.; JIN, Y.S. Engineered *Saccharomyces cerevisiae* capable of simultaneous cellobiose and xylose fermentation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, p. 504-509, 2011. doi: 10.1073/pnas.1010456108.

HOFFMAN, Z.B. Estudos funcionais e estruturais de hemicelulases para potencial aplicação biotecnológica. 2013. 66 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Funcional e Molecular) - Instituto de Biologia, Campinas, 2013.

KESHWANI, D.R.; CHENG, J.J. Switchgrass for bioethanol and other value-added applications: A review. **Bioresource Technology**, v. 100, p.1515-1523, 2009.doi:10.1016/j.biortech.2008.09.035

KHANDEPARKER, R.; NUMAN, M.T. Bifunctional xylanases and their potential use in biotechnology. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 35, p. 635-644, 2008. doi: 10.1007/s10295-008-0342-9.

KNOB, A.; FORTKAMP, D.; PROLO, T.; IZIDORO, S.C.; ALMEIDA, J.M. Agro-residues as alternative for xylanase production by filamentous fungi. **BioResources**, v. 3, p. 5738-5773, 2014.

LEE, C.C.; WAGSCHAL, K.; KIBBLEWHITE-ACCINELLI, R.E.; ORTS, W.J.; ROBERTSON, G.H.; WONG, D.W.S. An  $\alpha$ -glucuronidase enzyme activity assay adaptable for solid phase screening. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 155, p. 314-320, 2009. doi:10.1007/s12010-008-8408-8.

LEITE R.S.R.; ALVES-PRADO H.F., CABRAL H., PAGNOCCA F.C., GOMES E., DA-SILVA R. Production and characteristics comparison of crude  $\beta$ -glucosidases produced by microorganisms *Thermoascus aurantiacus* e *Aureobasidium pullulans* in agricultural wastes. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 43, p. 391-395, 2008. doi:10.1016/j.enzmictec.2008.07.006.

LEITE, R. S. R.; BOCCHINI-MARTINS, D. A.; MARTINS, E. S.; SILVA, D.; GOMES, E.; SILVA, R. Production of cellulolytic and hemicellulolytic enzymes from *Aureobasidium pullulans* on solid state fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 137-140, p. 281-288, 2007. doi: 10.1007/s12010-007-9058-y.

MAGALHÃES, P.O. Purificação de hemicelulases e de uma  $\beta$ -glicosidase de *Ceriporiopsis subvermispora* produzidas em condições de biopolpação. 2005. 131 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia Industrial) - Faculdade de Engenharia Química de Lorena, Lorena, 2005.

MARTINS, G.M.; Isolamento e seleção de leveduras fermentadoras de xilose. 2011. 104 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2011.

MEDEIROS, R.G. et al. Production of xylan-degrading enzymes from Amazon forest fungal species. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 52, p. 97-100, 2003. doi:10.1016/S0964-8305(02)00179-8.

MENEGUETTI, C. Associação de enzimas em rações para frangos de corte. 2013. 96 f. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2013.

MITTAL, A. NAGAR, S. GUPTA, V.K. Production and purification of high levels of cellulase-free bacterial xylanase by *Bacillus* sp. SV-34S using agro-residue. **Annals of Microbiology**, v. 63, p. 1157-1167, 2013. doi: 10.1007/s13213-012-0574-9.

NIELSEN, P.H.; DALGAARD, R.; KORSEBAK, A.; PETTERSSON, D. Environmental assessment of digestibility improvement factors applied in animal production: Use of Ronozyme® WX CT Xylanase in Danish pig production. **LCA Case Studies**, v.13, p. 1-8, 2008. doi: 10.1065/lca2007.07.352.

NOGUEIRA, S.C.P.; BERTPÁGLIA, L.; LEANDRO, G.S.; REIS, R.A.; JORGE, J.A.; POLIZELI, M.L.T.M. Estabilidade xilanásica no rúmen e digestibilidade *in vitro* de volumosos tratados com extrato enzimático de *Aspergillus niveus*. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v.7, p. 46-60, 2013.

NUMAN, M.T.; BHOSLE, N.B.  $\alpha$ -L-Arabinofuranosidases: the potential applications in biotechnology. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 33, p. 247-260, 2006. doi:10.1007/s10295-005-0072-1.

OLIVEIRA, D.S. Aplicação de xilanase e/ou ciclodextrina glicosiltransferase (CGTASE) na produção de pães. 2010. 150f. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Universidade "Júlio de Mesquita Filho", São José do Rio Preto, 2010.

PERIN N.M.; PIRES, M.M.S.; NASSAR, S.M. Absorção intestinal de D-xilose em crianças infectadas pelo Vírus da Imunodeficiência Humana. **Gastroenterologia Pediátrica**, v. 38, p. 261 - 268, 2001. doi: 10.1590/S0004-28032001000400009.

PINHEIRO, T.L.F. Produção de lipases por fermentação em estado sólido e fermentação submersa utilizando *Penicillium verrucosum* como microrganismo. 2006. 106 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim, 2006.

PIROTA, R.D.P.B.; TONELOTTO, M.; DELABONA, P.S.; TREMACOLDI, C.R.; FARINAS, C.S. Characterization of fungi isolated from the Amazon region for the potential of biomass-degrading enzymes production. **Ciência Rural**, v. 45, p. 1606-1612, 2015. doi: 10.1590/0103-8478cr20141241.

RAFIQUL, I.S.M. e MIMI SAKINAH, A.M. Kinetic studies on acid hydrolysis of *Meranti* wood sawdust for xylose production. **Chemical Engineering Science**, v. 71, p. 431-437, 2012. doi: 10.1016/j.ces.2011.11.007.



RODRIGUES, M.J.C.R. Proteome characterization of sugarcane primary cell wall. 2012. 180 f. Tese (Doutorado em Ciência) - Faculdade de Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

RUEGGER, M.J.S.; TAUKE-TORNISIELO, S.M. Xylanase production by filamentous fungi isolated from soil of the ecological station of Juréia-Itatins, SP, Brazil. **Holos Environment**, v.2, p.185-194, 2002.

SADAF, A.; KHARE, S.K. Production of *Sporotrichum thermophile* xylanase by solid state fermentation utilizing deoiled *Jatropha curcas* seed cake and its application in xylooligosaccharide synthesis. **Bioresource Technology**, v. 153, p. 126-130, 2014. doi: 10.1016/j.biortech.2013.11.058.

SALIBA, E.O.S.; RODRIGUEZ, N.M.; MORAIS, S.A.L.; PILÓ-VELOSO, D. Lignins - Isolation methods and chemical characterization. **Ciência Rural**, v. 31, p. 917 - 928, 2001. doi: 10.1590/S0103-84782001000500031.

SINGHANIA, R.R.; PATEL, A.K.; SOCCOL, C.R.; PANDEY, A. Recent advances in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 44. p. 13-18, 2009. doi:10.1016/j.bej.2008.10.019.

STICKLEN, M.B. Plant Genetic Engineering for biofuel production: towards affordable cellulosic ethanol. **Nature Reviews Genetics**, v. 9, p. 433-443, 2008. doi: 10.1038/nrg2336.

SUN, J.; TIAN, C.; DIAMOND, S.; GLASS, N.L. Deiphering Transcriptional regulatory mechanisms associated with hemicellulose degradation in *Neurospora crassa*. **Eukaryotic Cell**, v. 11, p. 482-493, 2012. doi: 10.1128/EC.05327-11.

TERRONE, C.C. Xilanase de *Penicillium chrysogenum*: Produção em um resíduo agroindustrial, purificação e propriedades bioquímicas. 2013. 77 f. Dissertação (Mestre em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2013.

TERRASAN, C.R.F.; CARMONA, E.C. Solid-State Fermentation of brewer's spent grain for xylanolytic enzymes production by *Penicillium janczewskii* and analyses of the fermented substrate. **Bioscience Journal**, v. 31, p. 1826-1836, 2015. doi: 10.14393/BJ-v31n6a2015-30044.

THOMAS, I.; SINDHU, R.; PANDEY, A. Identification and characterization of a highly alkaline and thermotolerant novel xylanase from *Streptomyces* sp. **Versita**, v. 8, p. 1022-1027, 2013. doi: 10.2478/s11756-013-0248-5.

VIANA, M.T.S.; ALBINO, L.F.T., ROSTAGNO, H.S.; SILVA, E.A.; VIEIRA, R.A.; RIBEIRO JUNIOR, V. Utilização de xilanase em dietas compostas por milho e farelo de soja de poedeiras comerciais em postura. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 40, p. 385-390, 2011. doi: 10.1590/S1516-35982011000200021.

WEI, N.; XU, H.; KIM, S.R.; JIN, Y.S. Deletion of *FPSI* encoding aquaglyceroporin Fps1p, improves xylose fermentation by engineered *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, p. 3193-3201, 2013. doi: 10.1128/AEM.00490-13.

ZHANG, X.; ROGOWSKI, A.; ZHAO, L.; HAHN, M.G.; AVCI, U.; KNOX, J.P.; GILBERT, H.J. Understanding how the complex molecular architecture of mannan-degrading hydrolases contributes to plant cell wall degradation. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 289, p. 2002-2012, 2014. doi:10.1074/jbc.M113.527770.

## **CAPÍTULO 2 - POTENCIAL CATALÍTICO E APLICAÇÃO DE XILANASES PRODUZIDAS POR *Trichoderma piluliferum* E *Trichoderma viride* COMO ADITIVOS ENZIMÁTICOS NA ALIMENTAÇÃO DE BOVINOS VISANDO O AUMENTO DE DIGESTIBILIDADE.**

### **INTRODUÇÃO**

O Brasil destaca-se atualmente no cenário mundial quanto às atividades pecuárias. No ano de 2014, cerca de 1,25 milhões de toneladas de carne foram exportadas para o mercado internacional (KASTNER, 2015). O volume de carne vendida para o exterior vem crescendo, nos cinco primeiros meses de 2016 a exportação de carne bovina cresceu 12% em relação ao ano de 2015 (FREITAS, 2016). Apesar da atividade pecuária ser de extrema importância para a economia brasileira, ainda há muito o que evoluir no contexto de nutrição animal. Devido às variações climáticas, em alguns períodos do ano a pastagem se torna insuficiente em termos nutricionais, sendo necessário a suplementação alimentar para auxiliar o desenvolvimento do animal (FAGUNDES et al., 2008; KASTNER, 2015).

Como alternativa de suplementação alimentar em ruminantes, a adição de complexos enzimáticos tem ganho destaque atualmente, tendo como objetivo aumentar a digestibilidade de ração e volumosos. As enzimas fibrolíticas expõem os nutrientes presentes nas células vegetais tornando as fibras mais disponíveis ao ataque microbiano no rúmem, fazendo com que o animal tenha maior aproveitamento de nutrientes em alimentos de difícil degradabilidade (CYSNEIROS et al., 2013; NOGUEIRA et al., 2013).

A suplementação de enzimas na dieta de bovinos além de aumentar a digestibilidade dos alimentos, pode contribuir para aceleração do desmame, aumento da resistência contra infecções e diminuição da contaminação ambiental devido a redução de liberação de metano pelos animais (CAMPESTRINI et al., 2005).

Dentre as enzimas fibrolíticas, destacamos a ação das xilanases, enzimas que hidrolisam a cadeia principal da hemicelulose (xilana). Este polissacarídeo faz a ligação da lignina às fibras de celulose, dessa forma, as xilanases desestruturam a organização polimérica da parede celular vegetal facilitando a remoção da lignina e expondo a fibra de celulose e outros nutrientes presente nas células vegetais (BECKER et al., 2009; BOTELLA et al., 2007; KNOB et al., 2014).

Apesar da interessante ação destas enzimas, alguns problemas devem ser superados para aplicação das xilanases em larga escala, como o elevado custo de

produção. Visando reduzir o valor destes biocatalisadores, diversos trabalhos avaliam a produção destas enzimas pelo Cultivo em Estado Sólido (CES) de fungos filamentosos em resíduos agroindustriais (BOCCHINI et al., 2011; COLLA et al., 2012; COSTA et al., 2016; RODRIGUEZ-ZUNINGA et al., 2011; SADAF e KHARE, 2014; TERRASAN e CARMONA, 2015).

Recentemente o grupo de pesquisa do Laboratório de Enzimologia e Processos Fermentativos (LEPFER) da Universidade Federal da Grande Dourados isolou duas linhagens fúngicas com considerável potencial para produção de xilanase, quando cultivadas em estado sólido utilizando resíduos agroindustriais. Tais características estimularam a elaboração deste trabalho, visando a obtenção de extratos enzimáticos de baixo custo e com características apreciáveis para aplicações industriais, principalmente como suplementos alimentares para ruminantes, visando o aumento da digestibilidade de forragens.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **MICROORGANISMOS**

Os microrganismos utilizados no presente trabalho foram fungos filamentosos mesófilos isolados de amostra de solo do pantanal sul-mato-grossense, identificados pela Micoteca URM (UFPE) como *Trichoderma piluliferum* (Is.30) e *Trichoderma viride* (Is. 33). As linhagens foram armazenadas no Laboratório de Enzimologia e Processos Fermentativos da Universidade Federal da Grande Dourados, sendo mantidas em tubos de ensaio contendo 5mL de meio *Sabouraud dextrose ágar*, a 5°C. As culturas também foram conservadas em óleo mineral sendo repicadas anualmente para garantir sua viabilidade.

### **CULTIVO EM ESTADO SÓLIDO**

O cultivo dos microrganismos foi efetuado em frascos Erlenmeyer de 250mL, contendo 5g de substratos umedecidos com solução nutriente (sulfato de amônia 0,1%, sulfato de magnésio hepta-hidratado 0,1% e nitrato de amônia 0,1% - m/v). O material foi autoclavado a 121°C durante 20 minutos. Para o preparo dos inóculos, os isolados foram cultivados em 40 mL de meio *Sabouraud dextrose ágar* a 28°C por 72 horas. A seguir foi realizado a raspagem da superfície do meio com 25 mL de solução nutriente para obtenção da suspensão microbiana. A inoculação dos microrganismos nos resíduos

agroindustriais se deu pela transferência de 5mL da solução de inóculo, contendo cerca de  $10^6$  esporos por grama de substrato (GARCIA et al., 2015). O processo de cultivo ocorreu a 28°C e alguns parâmetros foram variados para determinação das condições ótimas de crescimento e produção das enzimas. Os parâmetros avaliados foram: diferentes resíduos agroindustriais (farelo de trigo, farelo de soja, casca de arroz, bagaço de cana, palha de milho e sabugo de milho), diferentes proporções de farelo de trigo e bagaço de cana como substrato (5g:0g; 3,75g:2,5g; 2,5g:2,5g; 1,25g:3,75g; 0g:5g), umidade inicial do meio (50-80%) e tempo de cultivo (24 - 120 horas). Todos os ensaios foram realizados em duplicatas e analisados por teste Tuckey.

### **EXTRAÇÃO DAS ENZIMAS**

As enzimas foram extraídas pela adição de 50 mL de água destilada nos frascos Erlenmeyer contendo os meios cultivados. Os frascos foram mantidos em agitação por 1 hora à 150 rpm a 25°C, em seguida os meios foram filtrados em tecido sintético (nylon) e posteriormente centrifugados a 1500 x g a 10°C. O extrato enzimático, sobrenadante da centrifugação, foi utilizado para os ensaios enzimáticos.

### **DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE XILANASE**

A atividade de xilanase foi determinada com 0,1mL do extrato enzimático e 0,9mL de solução tampão acetato de sódio 0,1M, pH 4,5, contendo 0,5% de xilana (Beechwood). Após 10 minutos a 50°C, a reação foi interrompida pela adição de 1mL de DNS (3,5-ácido dinitrosalicílico). A mistura foi deixada em ebulição por 10 minutos e posteriormente resfriada em banho de gelo. Após o acréscimo de 8 mL de água destilada, foi determinada a quantidade de produto liberado por espectrofotometria a 540nm (MILLER, 1959). Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 $\mu$ mol de produto por minuto de reação.

### **EFEITO DO pH E TEMPERATURA SOBRE A ATIVIDADE ENZIMÁTICA**

O pH ótimo foi determinado mensurando a atividade da enzima a 50°C em diferentes valores de pH (3,0 - 8,0) utilizando tampão McIlvaine 0,1M. A temperatura ótima foi determinada pela dosagem da atividade enzimática em diferentes temperaturas (30 a 70°C), no respectivo pH ótimo da enzima. A estabilidade da enzima ao pH foi avaliada incubando-a por 24 horas a 25°C em diferentes valores de pH. Os tampões utilizados foram McIlvaine 0,1M (3,0 - 8,0), Tris-HCl 0,1M (8,0 - 8,5) e Glicina-NaOH

0,1M (8,5 – 10,5). A termoestabilidade foi estudada incubando a enzima por 1 hora em diferentes valores de temperatura (30 a 50°C). As atividades residuais foram determinadas nas condições ótimas de pH e temperatura da enzima (COSTA et al., 2016). Para a determinação do tempo de meia-vida ( $t_{1/2}$ ) das enzimas, os extratos produzidos pelos fungos *Trichoderma piluliferum* e *Trichoderma viride* foram incubados a 45°C por diferentes tempos e posteriormente realizou-se a dosagem de atividade enzimática utilizando os mesmos extratos.

### **AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CATALÍTICO DOS EXTRATOS ENZIMÁTICOS PRODUZIDOS**

A atividade enzimática de CMCase e FPase foram quantificadas de acordo com o método descrito por Ghose (1987) usando 3% de carboximetilcelulose, e uma tira de papel Whatman (6 x 1 cm) respectivamente. O açúcar redutor liberado foi quantificado pelo método de DNS descrito por Miller (1959). A atividade de Avicelase foi mensurada utilizando o substrato Avicel a 1%. As atividades de  $\beta$ -glicosidase e  $\beta$ -xilosidase foram mensuradas com substrato sintético p-nitrofenil- $\beta$ -D-glucopiranosideo 4 mM e p-nitrofenil- $\beta$ -D-xilopiranosideo 4 mM, respectivamente. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 $\mu$ mol de produto por minuto de reação.

### **CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD)**

A hidrólise de 900 $\mu$ L de xilana 0,5% (Beechwood) foi realizada em banho-maria com a adição de 100 $\mu$ L de extrato enzimático nos respectivos pH e temperatura ótimos para enzima de cada fungo por 10 minutos. A reação foi paralisada em banho de gelo. Os produtos da hidrólise enzimática de xilana foram analisados por Cromatografia em Camada Delgada (CCD) em placas de sílica-gel G-60 (10 x 15 cm), usando soluções de xilose e xilana (0,1% - m/v) como padrões. A fase móvel utilizada foi uma solução de n-butanol/etanol/água destilada (5:3:2; v/v/v). As placas foram reveladas em orcinol (0,2% - m/v) em uma solução de metanol:ácido sulfúrico (9:1 - v/v) e aquecidas em chapa de aquecimento até a aparição das manchas.

## DIGESTIBILIDADE *IN VITRO* UTILIZANDO XILANASE COMO SUPLEMENTO ENZIMÁTICO

Para avaliar o efeito da adição de xilanase sobre a digestibilidade em ruminantes foram avaliadas 5 alimentos distintos, sendo eles: *Brachiaria Brizantha*, *Panicum maximum* cv mombaça, Feno de Tifton 185, silagem de cana de açúcar e silagem de milho. Os coeficientes de digestibilidade *in vitro*, foram determinados utilizando o inóculo ruminal e a solução tampão, sendo adicionado 6U de xilanase por litro, quantidade recomendada de xilanase comercial da marca Fibrozyme™. Os experimentos foram realizados em número de 6 repetições e os valores apresentados representam as médias dos experimentos. Ensaio sem adição das enzimas foram realizados como controle. O inóculo ruminal foi proveniente de dois bovinos da raça Jersey, adultos, castrados, com peso corporal médio de 380 kg, e providos de cânula ruminal. Os animais estavam em pastagem de capim Marandu - *U. brizantha*. A coleta de líquido ruminal foi realizada no período da manhã antes da primeira refeição via cânula ruminal. O líquido ruminal foi mantido em banho-maria a 39°C e o recipiente purgado com CO<sub>2</sub> antes e após a coleta. O material coletado foi transferido para uma garrafa térmica pré-aquecida, previamente purgada com CO<sub>2</sub> e fechada hermeticamente. Posteriormente, o material foi filtrado em quatro camadas de tecido de algodão (gaze) e utilizado nas incubações. Para o preparo das soluções utilizou-se os seguintes reagentes: Solução A: Dihidrogenofosfato de potássio (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 10g), sulfato de magnésio (MgSO<sub>4</sub>. 7 H<sub>2</sub>O – 0,5g), cloreto de cálcio di-hidratado (CaCl<sub>2</sub>.2 H<sub>2</sub>O – 0,1g) e ureia (0,5 g) para o volume final de 1L. Para preparo da solução B utilizou: carbonato de sódio (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> – 15g) e sulfeto de sódio (Na<sub>2</sub>S. 9 H<sub>2</sub>O – 1,0g) para o volume final de 1L. As soluções A e B foram misturadas na relação 1:5 atingindo o pH de 6,8 na temperatura constante de 39°C. A DIVMS das dietas foi determinada de acordo com metodologia descrita por Tilley e Terry (1963), utilizando rúmen artificial TE-150 - Tecnal. Foram pesados 0,5 gramas de amostra em saquinhos de TNT - 100 g/m, cortados e selados a um tamanho de 5 × 5 cm, conforme Casali et al. (2008). Foram utilizados dois saquinhos sem amostra (brancos) em cada jarro para correção dos dados. Os saquinhos com amostra foram colocados nos jarros e distribuídos equitativamente. Em seguida, foram adicionados 1.280 mL da solução tampão e 320 mL do inóculo ruminal e acrescentado CO<sub>2</sub> para manter as condições anaeróbias em cada jarro. Após este procedimento, os jarros permaneceram no rúmen artificial a 39°C durante 48 horas com agitação contínua de acordo com o método descrito por Tilley and Terry (1963). A

seguir os saquinhos foram submetidos a lavagem com água destilada, sendo transferidos para secagem em estufa 105°C por 12 horas. Na sequência os saquinhos foram pesados e analisados quanto a digestibilidade *in vitro* da massa seca e aos teores de Fibra em Detergente Neutro (FDN). A digestibilidade *in vitro* de Fibra em Detergente Neutro (DIVFDN) foi obtida pelo cálculo da diferença entre a concentração de fibra na amostra antes e depois da incubação. As frações de FDN foram determinadas pela metodologia de Van Soest et al. (1991) com uso do analisador de fibra da Tecnal (TE-149).

Com o objetivo de comparar as amostras que passaram pela digestão *in vitro* com as amostras não digeridas, 500 mg de cada uma das forragens foram avaliadas quanto ao teor (%) de Fibra em Detergente Neutro (FDN) e Fibra em Detergente Ácido (FDA) de acordo com a metodologia de Van Soest et al. (1991). A porcentagem de hemicelulose presente nas forragens foi determinada pela diferença de FDN e FDA.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### CULTIVO EM ESTADO SÓLIDO PARA PRODUÇÃO DE XILANASES

Dentre os diversos resíduos agroindustriais avaliados como substrato para produção de xilanases para ambos os isolados, o farelo de trigo se mostrou mais promissor, atingindo cerca de 270 U g<sup>-1</sup> de substrato seco (27 U mL<sup>-1</sup>) pelos dois isolados (Figura 1A).

Thomas et al. (2013) também obtiveram melhor produção de xilanase quando utilizaram o farelo de trigo como substrato para produção de xilanase pelo fungo *Streptomyces sp.* Leite et al. (2007) obtiveram a melhor produção de xilanase pelo fungo *Aureobasidium pulluans* também em farelo de trigo, cerca de 5 U mL<sup>-1</sup>, valor abaixo do encontrado no presente trabalho para as duas espécies de *Trichoderma spp.* O farelo de trigo tem grande capacidade para absorção de água. Outros autores também relatam esse resíduo como bom substrato para cultivo em estado sólido e para produção de xilanase (COSTA et al., 2016; GOWDHAMAN et al., 2014; MASUI et al., 2012; RODRIGUEZ-ZUNIGA et al., 2011; RUEGGER e TAUKE-TORNISIELO, 2002). Por ser um resíduo agrícola e apresentar baixo custo, pode contribuir para redução do custo de produção da enzima (DELABONA et al., 2012; MASUI et al., 2012; MITTAL et al., 2013).



Considerando os resultados obtidos no presente trabalho, diferentes proporções de farelo de trigo e bagaço de cana foram avaliados para o cultivo dos microrganismos. O bagaço de cana foi utilizado com objetivo de reduzir a compactação do farelo de trigo, visando favorecer a transferência de massas durante o crescimento microbiano, contribuindo para o aumento da velocidade de crescimento e produção enzimática (DELABONA et al., 2012; PENHA et al., 2012). No entanto isso não foi observado para *T. piluliferum* e *T. viride* (Figura 1B), pois quanto maior a quantidade de bagaço de cana adicionada ao cultivo, menor foi a produção enzimática. Isso pode ser justificado devido a composição desses resíduos. O farelo de trigo apresenta equilíbrio adequado entre fonte de carbono e nitrogênio, e é rico em vitaminas do complexo B (DELABONA et al., 2012; LEITE et al., 2007) enquanto o bagaço de cana apresenta elevada recalcitrância devido sua composição rica em lignina, dificultando o acesso microbiano as fibras de celulose e hemicelulose, o que resultou em menor produção enzimática pelos microrganismos (MAGALHÃES, 2011). Apesar de contribuir para não compactação do substrato, a adição de bagaço de cana ao farelo de trigo desfavoreceu a composição nutricional do substrato utilizado para o cultivo dos microrganismos. Dessa forma, os cultivos subsequentes foram realizados utilizando apenas farelo de trigo como substrato.

Para estabelecer a umidade ideal do meio, cultivamos as duas linhagens em diferentes porcentagens de umidade. Para *T. piluliferum* a umidade inicial ideal para produção de xilanase foi de 75 e 80% não havendo diferença significativa entre essas duas umidades, porém a fim de utilizar menores quantidades de água, o valor de 75% foi adotado para os testes seguintes. Para *T. viride* a maior produção de xilanase foi observada nos cultivos contendo 65,70 e 75% de umidade, sendo de 65% de umidade selecionado para a execução dos ensaios subsequentes. (Figura 1C). O Cultivo em Estado Sólido simula o ambiente no qual os fungos filamentosos estão inseridos. Este tipo de cultivo requerer que o substrato esteja isento de água livre entre as partículas da matriz sólida. No entanto, é necessário umidade suficiente para garantir o funcionamento metabólico do fungo, mas sem reduzir a porosidade do substrato rompendo sua estrutura sólida. Elevadas umidades comprometem a difusão de oxigênio no meio além de proporcionar um ambiente propício a contaminação bacteriana, não desejada (DA-SILVA et al, 2005; SADAF e KHARE, 2014; KNOB et al., 2014).

Para determinar o tempo ideal de cultivo para produção de xilanase pelas linhagens fúngicas, amostras foram retiradas a cada 24 horas, completando um total de

120 horas de cultivo. A maior produção de xilanase por *T. piluliferum* foi obtida com 72 e 96 horas de cultivo, aproximadamente  $301,8 \text{ U g}^{-1}$  de substrato seco (ou  $30,18 \text{ U mL}^{-1}$ ) (Figura 1D). O fungo *T. viride* apresentou maior produção da enzima com apenas 48 horas de cultivo, cerca de  $671,8 \text{ U g}^{-1}$  de substrato seco (ou  $67,18 \text{ U mL}^{-1}$ ). Pereira et al. (2015) obtiveram a melhor produção de xilanase pelo fungo *Myceliophthora thermophila* também com 48 horas de cultivo em estado sólido, obtendo cerca de  $1138 \text{ U g}^{-1}$  utilizando como substrato bagaço de cana com farelo de soja.

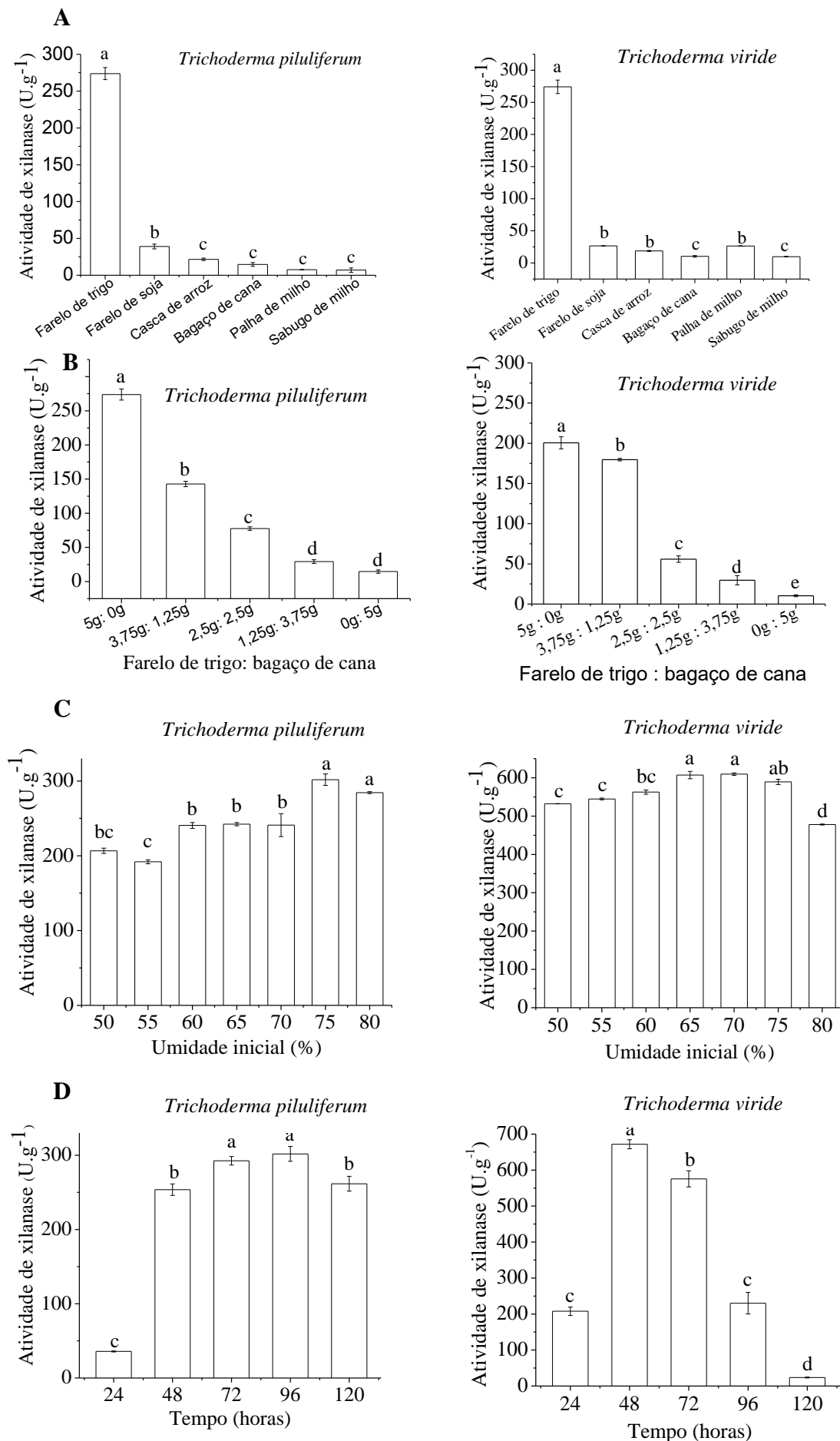


Figura 1 - Produção de xilanase pelos isolados *Trichoderma piluliferum* e *Trichoderma viride* por Cultivo em Estado Sólido. **A)** Influência de diferentes substratos; **B)** Influência de diferentes proporções de farelo de trigo e bagaço de cana; **C)** Influência de diferentes umidades; **D)** Influência do tempo de produção. A produção média com letras diferentes no mesmo gráfico indicam diferenças significativas de acordo com o teste de Tukey para  $p < 0,05$ .

A melhor produção de xilanase pelo fungo *Penicillium janczewskii* (371 U g<sup>-1</sup>) obtida por Terrasan e Carmona (2015) foi em 168 horas de cultivo em estado sólido utilizando bagaço de cevada como substrato. Alves-Prado et al. (2010) obtiveram a melhor produção de xilanase (20,6 U mL<sup>-1</sup>) pelo fungo *Neosartorya spinosa* em 72 horas.

Os resultados obtidos no presente trabalho comparados aos descritos na literatura científica citada, permitem inferir que ambos microrganismos utilizados apresentam potencial para produção de xilanase em meios de cultivo de baixo valor agregado e com reduzido tempo de cultivo, o que favorece o custo final de obtenção desses biocatalisadores.

### **CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DAS XILANASES PRODUZIDAS**

As enzimas produzidas nas condições ótimas de cultivo foram caracterizadas bioquimicamente. A enzima produzida por *Trichoderma viride* apresentou atividade ótima em pH 6,0, este resultado difere do encontrado por Irfan et al. (2012) quando estudou a xilanase de *T. viride* e encontrou atividade ótima em pH 5,0 isso provavelmente ocorreu devido aos efeitos do ambiente em que os fungos se encontravam sobre a expressão gênica de proteínas, como as xilanases. A xilanase do fungo *T. piluliferum* apresentou picos de atividade em pH 6,0 e pH 4,5, sendo neste último maior. Acredita-se que este extrato pode apresentar dois picos diferentes devido a existência de duas isoformas de xilanases (Figura 2A).

Alves-Prado et al. (2010) ao estudarem o efeito de pH na enzima xilanase de *Neosartorya spinosa* constataram dois picos de atividade ótima, sugerindo a existência de isoenzimas no extrato enzimático utilizado. Tomas et al. (2013) discutem a presença de 4 isoformas de xilanase produzidas por *Streptomyces sp.* sugerindo que essas diferenças ocorrem devido a polimorfismos na sequência de nucleotídeos, pequenas diferenças genéticas entre alelos do mesmo gene ou ainda a presença de mais de uma cópia de gene de xilanases no material genético. Xilanases produzidas pela bactéria *Bacillus aerophilus* KGJ2 foram descritas por Gowdhaman et al. (2014) apresentando atividade ótima em pH 4,0, sendo mais ácido do que o encontrado neste trabalho. Masui et al (2012) ao estudarem xilanase do fungo *Humicola brevis* encontraram atividade ótima da enzima em pH 5,5. Nossos resultados são similares a maioria encontrada na literatura, nos quais demonstram que o pH ótimo de xilanases produzidas por espécies fúngicas fica dentro da faixa de 4,0 a 6,0 (GUIMARÃES et al., 2013).

A temperatura ótima observada para xilanase produzida pelo *T. piluliferum* foi de 50°C enquanto que a do *T. viride* foi de 45°C (Figura 2B). Guimarães et al. (2013) reportam a temperatura ótima de 55°C para a xilanase produzida pelo fungo *Aspergillus japonico*, valor próximo aos encontrados no presente trabalho.

Após 24 horas incubadas em diferentes valores de pH, as xilanases produzidas pelos dois isolados mantiveram-se estáveis na faixa de pH de 3,0 a 10,0 (Figura 2C). As xilanases produzidas pelo fungo *Aereobasidium pulluans* no trabalho realizado por Leite et al. (2007) foram estáveis por 24 horas na faixa de pH que variou de 3,0 à 8,0. A xilanase produzida por *Streptomyces sp.* no trabalho desenvolvido por Brito-Cunha et al. (2013) manteve-se estável na faixa de pH que variou de 5,0 à 9,0, cuja amplitude é menor quando comparada com os resultados obtidos neste trabalho.

Quanto à termoestabilidade as enzimas mantiveram-se consideravelmente estáveis por 1 hora até 40°C (Figura 2D). Isto pode ser justificado devido ao caráter mesófilo das duas cepas. Guimarães et al. (2013) também descrevem a estabilidade de xilanase produzida pelo fungo *Aspergillus japonico* na faixa de 45 a 50°C. Silva et al. (2015) descrevem a xilanase purificada do fungo mesofílico *Trichoderma inhamatum* como estável à 40°C, valores próximos aos encontrados para as enzimas dos dois isolados. A análise da meia-vida ( $t_{1/2}$ ) das enzimas dos isolados *T. piluliferum* e *T. viride* a 45°C mostrou 50% da atividade residual em aproximadamente 25 e 60 minutos, respectivamente (Figura 3). Sendo assim, podemos afirmar que a xilanase produzida pelo fungo *T. viride* é mais estável à 45°C quando comparada à xilanase produzida pelo *T. piluliferum* que em 25 minutos perde 50% de sua atividade catalítica. A temperatura é o fator que mais influencia a função de biomoléculas, como as proteínas. Normalmente, enzimas mais estáveis são produzidas por microrganismos termófilos. As diferenças observadas entre enzimas estáveis e pouco estáveis estão na composição e sequência de aminoácidos que as formam, na presença de pontes dissulfeto, nas interações iônicas, e nas interações hidrofóbicas da molécula. O aumento da temperatura causa rompimento entre essas interações o que consequentemente causa o desdobramento da proteína (GOMES et al., 2007). A estabilidade de uma enzima será importante de acordo com o objetivo de aplicação da mesma. Processos que demandam de altas temperaturas requerem enzimas estáveis a essa condição.

Trabalhos anteriores relatam que as xilanases podem contribuir na digestibilidade de alimentos fibrosos por animais ruminantes, para isso é necessário que essas enzimas atuem nas condições que serão expostas e mantenham-se estáveis durante

a quebra dos alimentos (FAGUNDES et al., 2008; NOGUEIRA et al., 2013; CYSNEIROS et al., 2013). A temperatura dentro do rúmex de bovinos é em torno de 39°C podendo sofrer pequenas alterações (CYSNEIROS et al., 2013). As enzimas produzidas pelos dois microrganismos estudados neste trabalho tem perfil de quebra de xilana em situações semelhantes ao ambiente ruminal, podendo assim contribuir com o processo de digestão desses animais se utilizadas em dietas de ruminantes. Essas enzimas também podem ser utilizadas no tratamento de forragens a serem oferecidas aos animais. No processo de ensilagem ocorre a acidificação das forragens armazenadas, sendo que o pH neste ambiente fica em torno de 5 e 4,5. Nestas faixas de pH as enzimas estudadas atuam de maneira eficiente e mantém sua estabilidade, o que nos leva a crer que os extratos enzimáticos produzidos tem potencial para aplicação no processo de ensilagem.

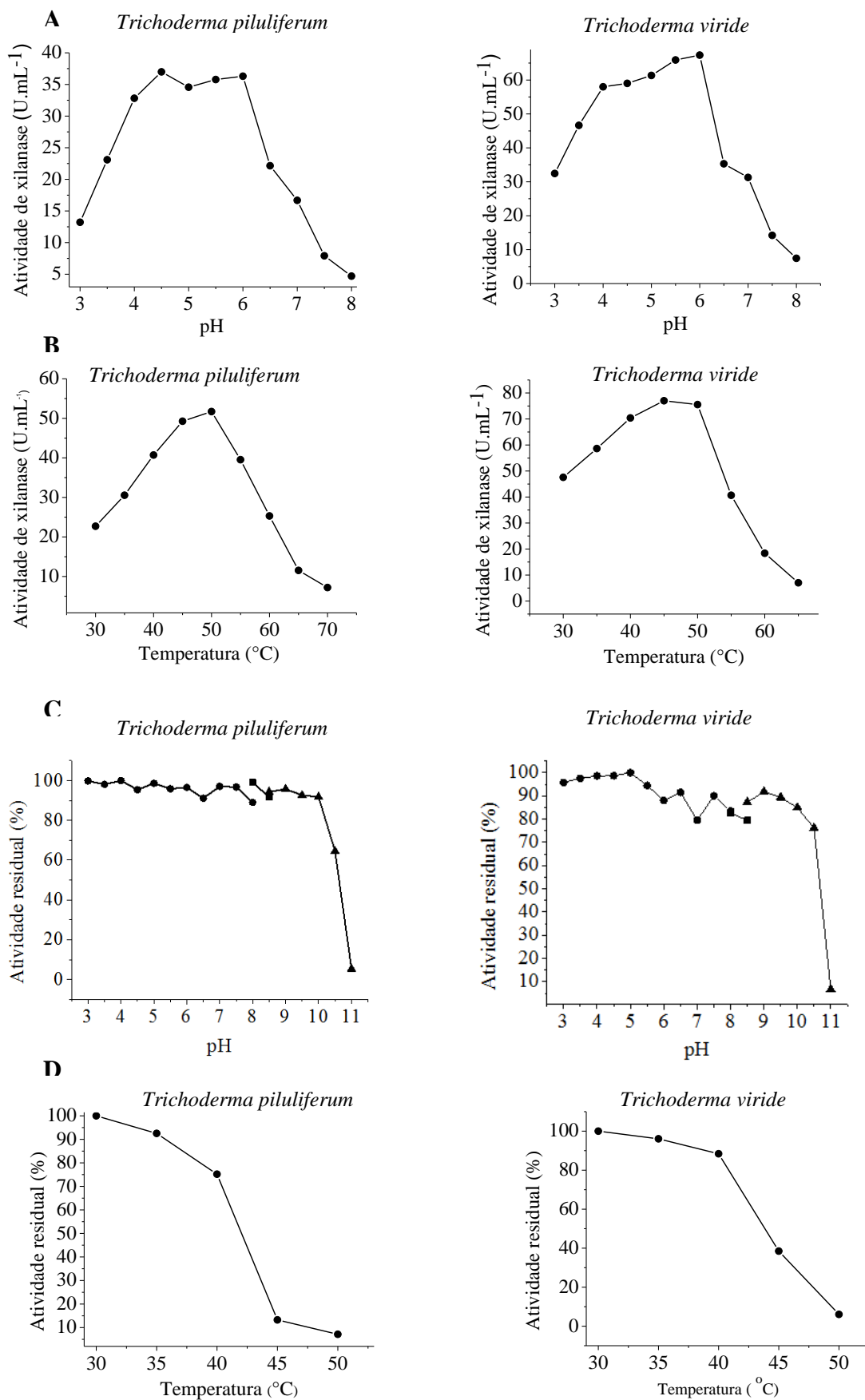


Figura 2- Caracterização bioquímica da xilanase produzida pelos fungos *T. piluliferum* e *T. viride*. **A)** pH ótimo; **B)** Temperatura ótima; **C)** Estabilidade ao pH; **D)** Estabilidade a temperatura.

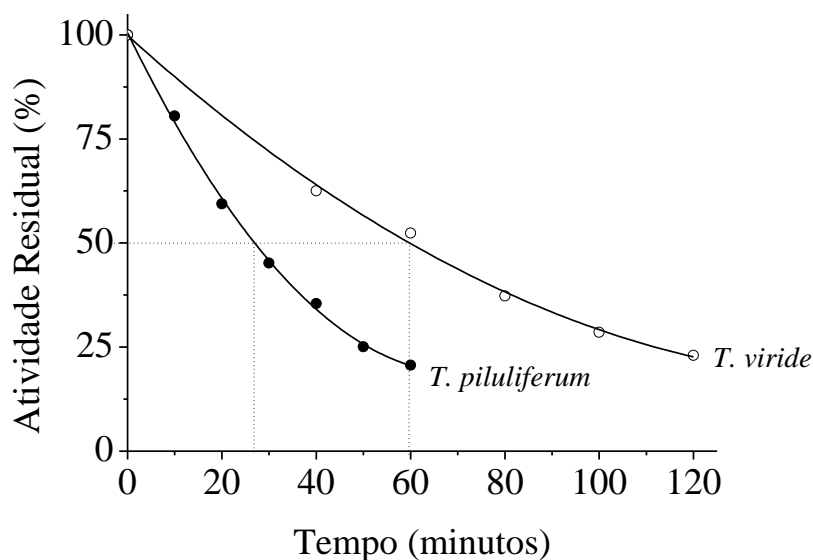


Figura 3 - Tempo de meia vida ( $t_{1/2}$ ) das xilanases realizado a 45°C utilizando os extratos produzidos pelos fungos *Trichoderma piluliferum* e *Trichoderma viride*.

### PERFIL CATALÍTICO DOS EXTRATOS ENZIMÁTICOS

Diferentes substratos foram testados frente a atividade do extrato enzimático afim de estabelecer seu perfil catalítico. Os extratos dos fungos *T. piluliferum* e *T. viride* apresentaram desconsiderável atividade de Avicelase, CMCase,  $\beta$ -glicosidase. O reduzido potencial para degradar celulose foi confirmado pela baixa atividade de FPase (Tabela 1). Porém no estudo realizado por Nathan et al. (2014) o fungo *T. viride* foi capaz de produzir celulasas quando em cultivo submerso utilizando carboximetilcelulose como fonte de carbono. Segundo Okeke et al. (2014) espécies de *Trichoderma* spp. produzem altas concentrações de celulasas e xilanases mas pouca de  $\beta$ -glicosidase, o que difere do encontrado no presente trabalho para produção de celulasas pelos dois isolados pertencentes ao gênero *Trichoderma*. Fato que ilustra a diversidade metabólica microbiana, que possibilita encontrar diferentes potenciais catalíticos dentre uma mesma espécie.



Tabela 1 - Perfil catalítico dos extratos dos fungos *T. piluliferum* e *T. viride*.

Enzima	Substrato	Atividade catalítica extrato <i>T. piluliferum</i> (U.mL <sup>-1</sup> )	Atividade catalítica extrato <i>T. viride</i> (U.mL <sup>-1</sup> )
Avicelase	Avicel	0	0,75
CMCase	Carboximetilcelulose	3,64	5,30
$\beta$ -glicosidase	Nitrofenil $\beta$ -D glicopiranoside	2,46	2,05
FPase	Papel filtro	0,10	0,10
Xilanase	Xilana beechwood	30,18	67,18
$\beta$ -D-xilosidase	Nitrofenil $\beta$ -D xilopiranoside	0,31	0,26

Geralmente, o cultivo de fungos decompositores de biomassa vegetal em resíduos agroindustriais resulta na produção de extratos enzimáticos ricos em diversas enzimas de degradação da parede celular vegetal. No entanto, a presença de outras enzimas no meio fermentado, pode ser um motivo de aumento de custo, pois se torna necessário a adição de etapas de purificação da enzima de interesse (COSTA et al., 2016).

A obtenção de extratos enzimáticos ricos em xilanases e livres de celulases a partir do cultivo microbiano em resíduos agroindustriais é um desafio para a aplicação em indústrias de papel e celulose. As xilanases podem ser utilizadas no processamento da madeira para retirada de lignina através da desorganização da parede celular vegetal com a degradação da hemicelulose, diminuindo a quantidade de compostos organoclorados necessários para o branqueamento da polpa de celulose. A presença de celulases na etapa de biobranqueamento da polpa de celulose pode afetar a qualidade da mesma, por isso um extrato enzimático rico em xilanases e livre de celulases se faz necessário nesta etapa (CARMONA et al., 2005; DA-SILVA et al. 2005). Dessa forma é possível inferir que o extrato enzimático produzido por ambos microrganismos apresentam potencial para o tratamento de polpa de papel e celulose.

O perfil catalítico da xilanase produzida pelos microrganismos também foi avaliado. A atividade de  $\beta$ -D-xilosidase foi desprezível em ambos extratos enzimáticos (Tabela 1), indicando a predominância de atividade endoxilanolítica (endo-1,4- $\beta$ -xilanase). A referida hipótese foi confirmada por Cromatografia de Camada Delgada, sendo possível observar a predominância de xilooligossacarídeos (XOS) nos hidrolisados de xilana de ambos microrganismos (Figura 4). Essa característica indica que as xilanases produzidas no presente trabalho clivam internamente a molécula de xilana liberando XOS. Trabalhos anteriores relatam os XOS como moléculas com

funções prebióticas no intestino humano, aumentando e controlando a proliferação de bifidobactérias e lactobacilos, benéficos ao intestino (LECERF et al., 2012; MENEZES e DURRANT, 2008).

Animais como os bovinos também se beneficiam da proliferação de bifidobactérias e lactobacilos. O controle da microbiota presente no rúmen desses animais favorece a digestão, previne de doenças infecciosas e diminui a ocorrência de distúrbios gastrintestinais (CAMPESTRINI et al., 2005; NOGUEIRA et al., 2013).

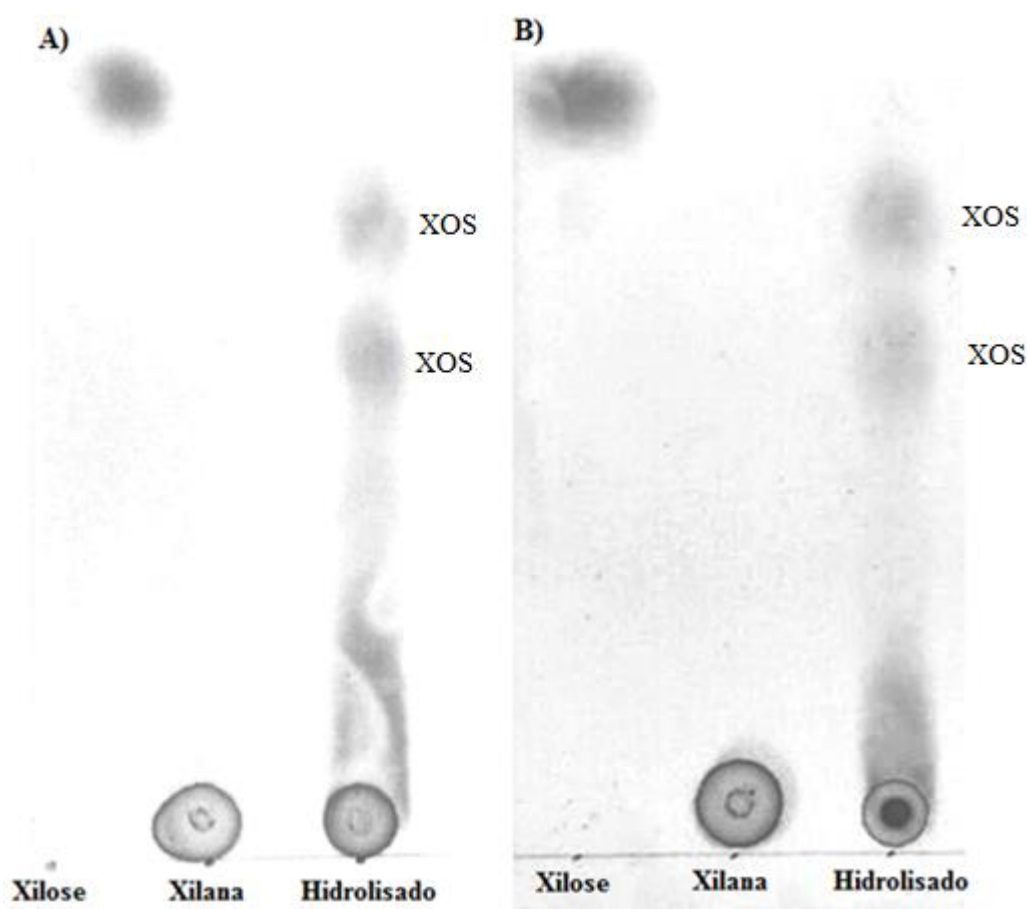


Figura 4 - Cromatografia em Camada Delgada (CCD) do produto da reação de hidrólise por 10 minutos de xilana beechwood (0,5%) pelas enzimas produzidas por *T. piluliferum* (A) e *T. viride* (B). Como padrões para análise do hidrolisado foi utilizado xilose e xilana (0,1%).

## DIGESTIBILIDADE *IN VITRO*

Não é possível estimar o potencial de enzimas exógenas em melhorar a utilização de uma dieta por um animal somente com caracterização bioquímica, por isso ensaios de digestibilidade *in vitro* são necessários (CYSNEIROS et al., 2013). Nesse contexto, os extratos enzimáticos dos fungos *T. piluliferum* e *T. viride* foram estudados quanto sua aplicação na digestibilidade do complexo hemicelulose, celulose e lignina (Fibras em Detergente Neutro) de diferentes forragens utilizadas nas dietas de bovinos.

O uso do extrato enzimático de *T. piluliferum* aumentou a digestibilidade *in vitro* de feno Tifton 185, silagem de cana e silagem de milho em 7,2%, 11,9% e 9,4% respectivamente, quando comparado com a digestibilidade dos controles (Figura 5A). Nos ensaios utilizando o extrato enzimático de *T. viride*, a adição de enzima contribuiu com a digestibilidade dos alimentos feno Tifton 185, silagem de cana e silagem de milho em 5%, 7,6% e 4,8%, respectivamente (Figura 5B).

Nogueira et al. (2013) utilizaram xilanase de *Aspergillus niveus* em condições ruminais de caprinos e obtiveram ganho de 6,2% na digestibilidade *in vitro* de silagem de milho, valor abaixo do encontrado neste trabalho para adição do extrato enzimático de *T. piluliferum*.

A adição de enzimas nas dietas de animais ruminantes pode influenciar positivamente na produção de leite e carne, fatores estes não avaliados no presente trabalho. Schingoethe et al. (1999) observaram aumento de 10,8% e 13,0% na produção de leite e proteína do leite, respectivamente, com a adição de enzimas celulase e xilanase em dietas contendo silagem de milho. Dessa forma, os resultados obtidos poderiam ser ainda mais expressivos se avaliados outros parâmetros relacionados à nutrição animal.

Ainda que a microbiota presente no rúmen seja capaz de digerir a celulose, alguns fatores dificultam a digestão do alimento, como a estrutura e composição da planta e interações entre hemicelulose e lignina (CYSNEIROS, 2013). A adição de xilanases no processo de digestão provoca o desarranjo da hemicelulose expondo as fibras de celulose e nutrientes presentes nos alimentos para que a microbiota do rúmen e as enzimas endógenas possam ter maior acesso a eles (NOGUEIRA et al., 2013).

Para os tratamentos com adição do extrato enzimático dos dois fungos avaliados o aumento de digestibilidade foi evidenciado em alimentos com maiores porcentagens de hemicelulose (Tabela 2). As diferentes porcentagens de digestibilidade quando utilizamos os extratos enzimáticos foram efeito das características das enzimas xilanases

frente a composição e arranjo das fibras das forragens, que apresentam conformações e interações diferentes entre seus polímeros, variando de um alimento para o outro.

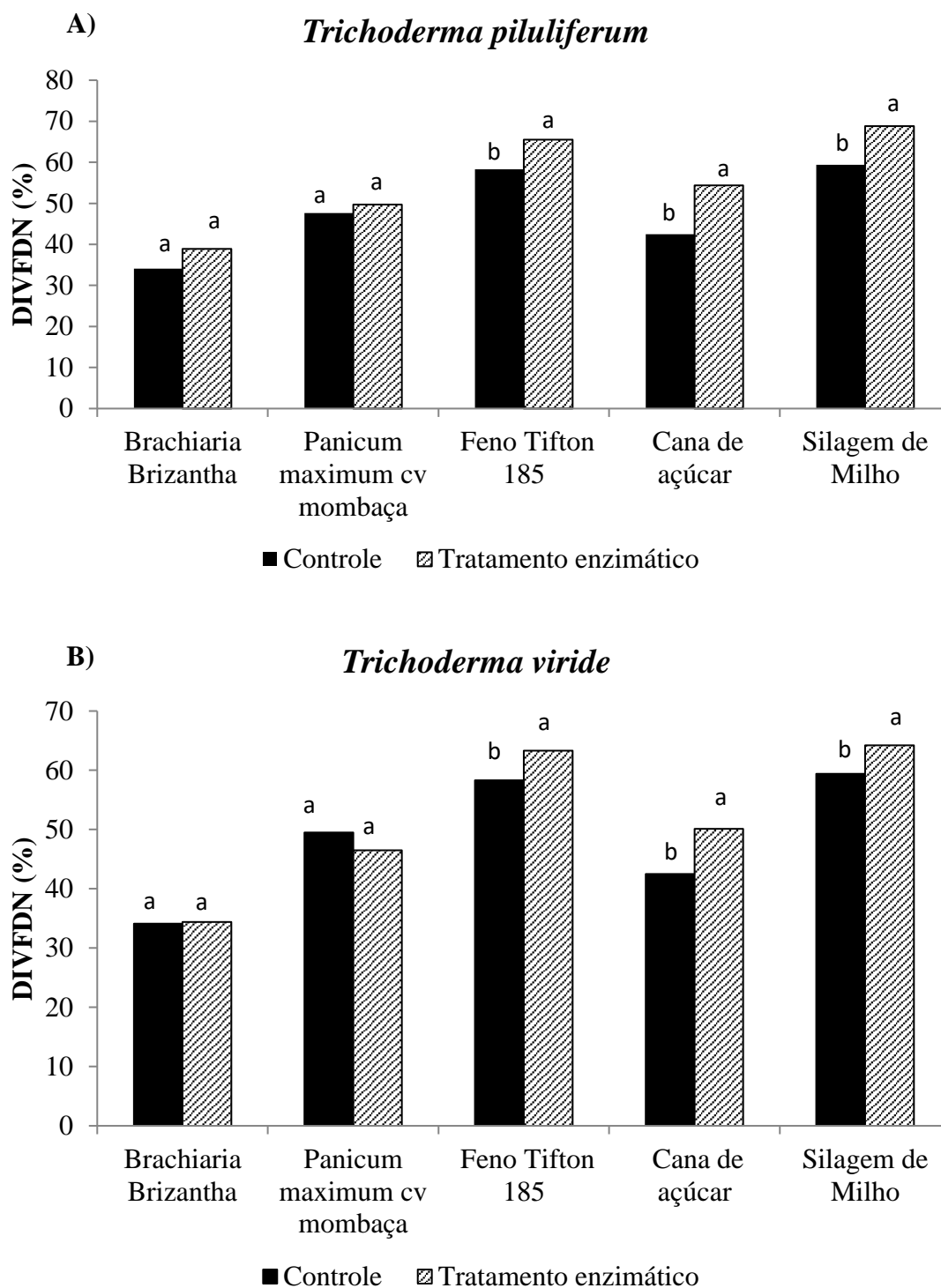


Figura 5 - Porcentagem de Digestibilidade In Vitro de Fibra em Detergente Neutro (DIVFDN) de diferentes forragens sem tratamento enzimático e tratadas com 6 U. L<sup>-1</sup> de xilanase utilizando extrato enzimático de: A) *T. piluliferum* e B) *T. viride*.

O melhor resultado obtido foi na digestibilidade de silagem de cana utilizando principalmente o extrato enzimático produzido pelo *Trichoderma piluliferum* (11,9%). Este alimento é considerado de baixa qualidade pois apresentou baixa digestibilidade nos ensaios sem adição de enzima (controle) (Figuras 5 A e B). Dessa forma, o uso de suplementação enzimática com os extratos enzimáticos estudados aumentou a eficiência do processo de digestão de silagem de cana, o que é extremamente interessante para países como Brasil, que apresenta elevada disponibilidade desse produto.

Tabela 2 - Teores médios de matéria seca (MS), Fibra em Detergente Neutro (FDN), Fibra em Detergente Ácido (FDA) e Hemicelulose dos alimentos incubados, estabelecidos pelo Laboratório de Nutrição Animal da UFGD

Alimento	MS (%)	FDN (%)	FDA(%)	Hemicelulose (%)*
Silagem de Cana	27,60	65,30	42,30	23
Silagem de Milho	28,70	62,80	35,70	27,1
<i>Panicum maximum</i> cv mombaça	25,70	52,40	41,30	11,1
Brachiaria Brizantha	17,69	62,50	45,15	17,35
Feno de Tifton 185	89,53	76,16	43,50	32,66

\*FDN-FDA

O aumento da digestibilidade utilizando xilanases além de ser benéfico em termos nutricionais, aumentando a disponibilidade de nutrientes protegidos pelas fibras da parede celular dos vegetais, diminui a quantidade de nutrientes nas fezes, reduzindo as emissões de metano, garantindo menor poluição ambiental. As enzimas podem ainda auxiliar as trocas de dietas de bezerros em desmame e diminuir a viscosidade do alimento no processo digestivo no rúmen, pois em um ambiente viscoso a digestibilidade de nutrientes da dieta é comprometida devido ao menor acesso ao alimento pelas enzimas endógenas (CAMPESTRINI et al., 2005; FAGUNDES et al., 2008).

## CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos no presente trabalho, podemos inferir que ambos microrganismos apresentaram considerável potencial para produção de xilanases em meios de cultivo de baixo custo e com reduzido tempo, sendo ainda possível ressaltar a importância da otimização dos parâmetros de cultivo, que aumentou cerca de 12 e 150% a produção de xilanase por *T. piluliferum* e *T. viride*, respectivamente.

Os extratos enzimáticos produzidos em condições otimizadas apresentaram potencial para aplicação em diferentes segmentos industriais, como papel e celulose devido a reduzida atividade celulolítica, além de apresentarem predominantemente atividade endoxilanolítica, o que habilita o uso dos mesmos para obtenção de xilooligossacarídeos.

As características bioquímica das xilanases obtidas favorecem a aplicação dessas enzimas na dieta de animais ruminantes, por serem ativas em condições ruminais, sendo confirmada essa hipótese com os ensaios preliminares de digestibilidade *in vitro*, evidenciado pelo aumento significativo da digestibilidade principalmente em alimentos ricos em hemicelulose.

## REFERÊNCIAS

ALVES-PRADO, H. F.; PAVEZZI, F.C.; LEITE, R.S.R.; OLIVEIRA, V.M.; SETTE, L.D.; DA SILVA, R. Screening and production study of microbial xylanase producers from Brazilian cerrado. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 161, p. 333-346, 2010. doi: 10.1007/s12010-009-8823-5.

BECKER, N.B.; BARATTO, C.M.; GELINSKI, J.M.L.N. Properties of commercial  $\alpha$ -amylase and xylanase enzymes and its influence on the dough rheology and quality of form bread. **Evidência**, v. 9, p. 67-82, 2009.

BOCCHINI-MARTINS, D.A.; ALVES-PRADO, H. F.; LEITE, R.S.R.; FERREIRA, H.; MORETTI, M.M.S.; DA-SILVA, R.; GOMES, E. Agroindustrial wastes as substrates for microbial enzymes production and source of sugar for bioethanol production. **Integrated Waste Management**, v. 2, p. 319-360, 2011. doi: 10.5772/23377.

BOTELLA, C.; DIAZ, A.; DE ORY, I.; WEBB, C.; BLANDINO, A. Xylanase and pectinase production by *Aspergillus awamori* on grape pomace in solid state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 42, p. 98-101, 2007. doi:10.1016/j.procbio.2006.06.025.

BRITO-CUNHA, C.C.Q.; CAMPOS, I.T.N.; FARIA, F.P.; BATAUS, L.A.M. Screening and xylanase production by *Streptomyces* sp. grown on lignocelulosic wastes. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 170, p. 598-608, 2013. doi:10.1007/s12010-013-0193-3.

CAMPESTRINI, E.; SILVA, V.T.M.; APPELT, M.D. Utilização de enzimas na alimentação animal. **Revista Eletrônica Nutritime**, v. 2, p. 259-272, 2005.

CARMONA, E.C.; FIALHO, M.B.; BUCHGNANI, E.B.; COELHO, G.D.; BROCHETO-BRAGA, M.R.; JORGE, J.A. Production, purification and characterization of a minor form of xylanase from *Aspergillus versicolor*. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 359-364, 2005. doi:10.1016/j.procbio.2004.01.010.

CASALI, A.O.; DETMANN, E.; VALADARES FILHO, S. C.; PEREIRA, J. C.; HENRIQUES, L. T.; FREITAS, S. G. E PAULINO, M. F. Influência do tempo de incubação e do tamanho de partículas sobre os teores de compostos indigestíveis em alimentos e fezes bovinas obtidos por procedimentos *in situ*. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 37, p. 335-342, 2008.

COLLA, L.M.; REINEHR, C.O.; COSTA, J.A.V. Aplicações e produção de lipases microbianas. **Ciências Exatas Aplicadas e Tecnológicas da Universidade de Passo Fundo**, v. 4, p. 1-14, 2012.

COSTA, A.C.; SCALABRINI, R.P.; SILVESTRE, M.A.; RODRIGUES, A.; PAZ, M.F.; FONSECA, G.G.; LEITE, R.S.R.L. Production of xylanase by a new strain of *Thermoascus aurantiacus*: obtainment of enzymatic extract with reduced cellulolytic activity for application in pulp and paper industries. **Bioscience Journal**, v. 32, p. 1040-1048, 2016. doi: 10.14393/BJ-v32n4a2016-32992.

CYSNEIROS, C.S.S.; FERREIRA, R.N.; OLIVEIRA, M.A.; FAVORETTO, A.O.; ARNHOLD, E.; ULHOA, C.J. Produção, caracterização e avaliação de enzimas fibrolíticas na digestibilidade da forragem de milho. **Ciência Animal Brasileira**, v.14, p. 1-5. doi: 10.5216/cab.v14i4.19491.

DA-SILVA, R.; LAGO, E.S.; MERHEB, C.W.; MACCHIONE, M.M.; PARK, Y.K.; GOMES, E. Production of xylanase and CMCase on solid state fermentation in different residues by *Thermoascus aurantiacus* miehe. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 36, p. 235-241, 2005. doi: 10.1590/S1517-83822005000300006

DELABONA, P.S.; PIROTA, R.D.P.B.; CODIMA, C.A.; TREMACOLDI, C.R.; RODRIGUES, A.; FARINAS, C.S. Using amazon forest fungi and agricultural residues as a strategy to produce cellulolytic enzymes. **Biomass and Bioenergy**. v.37. p.243-250, 2012. doi:10.1016/j.biombioe.2011.12.006.

FAGUNDES, N.S.; CAIRES, C.M.; FAGUNDES, N.S.; BENEDETTI, E. Enzimas na alimentação de bovinos. **Revista Eletrônica Nutritime**, v. 5, p. 498-503, 2008.

FREITAS, A. Brasil está perto de cumprir 100% da Cota Hilton. **Revista DBO**. 2016. Disponível em: <<http://www.portaldbo.com.br/Revista-DBO/Noticias/Brasil-esta-perto-de-cumprir-100-da-Cota-Hilton/16883>> Acesso em: 04 de julho de 2016.

GARCIA, N.F.L.; SANTOS, F. R. S.; GONCALVES, F.A.; PAZ, M. F.; FONSECA, G.G; LEITE, R.S.R. Production of  $\beta$ -glucosidase on solid-state fermentation by *Lichtheimia ramosa* in agroindustrial residues: Characterization and catalytic properties of the enzymatic extract. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 18, p. 314-319, 2015. doi: 10.1016/j.ejbt.2015.05.007.

GHOSE, T.K. Measurement of cellulase activities. **Pure & Applied Chemistry**, v. 59, p. 257 - 268, 1987. doi: 10.1351/pac198759020257.

GOMES, E.; GUEZ, M.A.U.; MARTIN, N.; DA-SILVA, R. Enzimas termoestáveis: fontes, produção e aplicação industrial. **Química Nova**, v. 30, p. 136-45, 2007.

GOWDHAMAN, D.; MANASWINI, V.S.; JAYANTHI, V.; DHANASRI, M.; JEYALAKSHMI, G.; GUNASEKAR, V.; SUGUMARAN, K.R.; PONNUSAMI, V. Xylanase production from *Bacillus aerophilus* KGJ2 and its application in xylooligosaccharides preparation. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 64. p. 90-98, 2014. doi:10.1016/j.ijbiomac.2013.11.012.

GUIMARÃES, N.C.A.; SORGATTO, M.; PEIXOTO-NOGUEIRA, S.C.; BETINI, J.H.A.; ZANOELO, F.F. MARQUES, M.R.; POLIZELI, M.L.T.M.; GIANNESI, G.C. Xylanase production from *Aspergillus japonicus* var *aculeatus*: Production using agroindustrial residues and biobleaching effect on pulp. **Journal of Biocatalysis & Biotransformation**. v. 2. p. 1-6, 2013. doi:10.4172/2324-9099.1000105.

IRFAN, M.; SYED, Q. Partial purification and characterization of xylanase from *Trichoderma viride* produced under SSF. **International Journal of Applied Research in Natural Products**, v. 5, p. 7-11, 2012.

KASTNER, T. Com demanda alta, confinamento do boi deve crescer na pecuária do Brasil. **Folha de São Paulo**. 2015. Disponível em: <<http://www1.folha.uol.com.br/mercado/2015/07/1661854-com-demanda-alta-confinamento-do-boi-deve-crescer-na-pecuaria-do-brasil.shtml>> Acesso em: 04 de julho de 2016.

KNOB, A.; FORTKAMP, D.; PROLO, T.; IZIDORO, S.C.; ALMEIDA, J.M. Agro-residues as alternative for xylanase production by filamentous fungi. **BioResources**, v. 3, p. 5738-5773, 2014.

LECERF, J.M.; DÉPEINT, F.; CLERC, E.; DUGENET, Y.; NIAMBA, C.N.; CAYZEELE, L.R.A.; ABDELNOUR, G.; JARUGA, A; YOUNES, H.; JACOBS, H.; LAMBREY, G.; ABDELNOUR, A.M.; POUILLART P.R. Xylo-oligosaccharide (XOS) in combination with inulin modulates both the intestinal environment and immune status in healthy subjects, while XOS alone only shows prebiotic properties. **British Journal of Nutrition**, v. 108, p. 1847-1858, 2012. doi: 10.1017/S0007114511007252.

LEITE, R.S.R.; BOCCHINI-MARTINS, D.A.; MARTINS, E.S.; SILVA, D.; GOMES, E.; SILVA, R. Production of cellulolytic and hemicellulolytic enzymes from



*Aureobasidium pulluans* on solid state fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 137-140, p. 281-288, 2007. doi: 10.1007/s12010-007-9058-y.

MAGALHÃES, T.S. Estudo de pré-tratamentos de bagaço de cana para produção de etanol celulósico por hidrólise enzimática. 2011. 63 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, 2011.

MASUI, D.C.; ZIMBARDI, A.L.R.L.; SOUZA, F.H.M.; GUIMARÃES, L.H.S.; FURIEL, R.P.M.; JORGE, J.A. Production of a xylose-stimulated  $\beta$ -glucosidase and a cellulase-free thermostable xylanase by the thermophilic fungus *Humicola brevis* var. thermoidea under solid state fermentation. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, p. 2689-2701, 2012. doi: 10.1007/s11274-012-1079-1.

MENEZES, C.R.; DURRANT, L.R. Xylooligosaccharides: production, applications and effects on human health. **Ciência Rural**, v. 38, n. 2, p. 587 - 592, 2008. doi: 10.1590/S0103-84782008000200050.

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

MITTAL, A.; NAGAR, S.; GUPTA, V.K.; Production and purification of high levels of cellulase-free bacterial xylanase by *Bacillus* sp. SV-34S using agro-residue. **Annals of Microbiology**, v. 63, p. 1157-1167, 2013. doi: 10.1007/s13213-012-0574-9.

NATHAN, V.K.; RANI, E.M.; RATHINASAMY, G.; DHIRAVIAM, K.N.; JAYAVEL, S. Process optimization and production kinetics for cellulase production by *Trichoderma viride* VKF3. **Springer plus**, v. 3, p. 2-12, 2014.

NOGUEIRA, S.C.P.; BERTPÁGLIA, L.; LEANDRO, G.S.; REIS, R.A.; JORGE, J.A.; POLIZELI, M.L.T.M. Estabilidade xilanásica no rúmen e digestibilidade in vitro de volumosos tratados com extrato enzimático de *Aspergillus niveus*. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v. 7, p. 46-60, 2013.

OKEKE, B.C. Cellulolytic and xylanolytic potential of high  $\beta$ -glucosidase-Producing *Trichoderma* from decaying biomass. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 174, p. 1581-1598, 2014.

PENHA, M.P.; LEÃO, M.H.M.R; LEITE, S.G.F. Sugarcane bagasse as support for the production of coconut aroma by Solid State Fermentation (SSF). **Bioresources**, v. 7, p. 2366-2375, 2012.

PEREIRA, J.C.; MARQUES, N.P.; RODRIGUES, A.; OLIVEIRA, B.; BOSCOLO, M.; SILVA, R.; GOMES, E.; BOCCHINI-MARTINS, D.A. Thermophilic fungi as new sources for production of cellulases and xylanases with potential use in sugarcane bagasse saccharification. **Journal of Applied Microbiology**, v. 118, p. 928-939, 2015. doi: 10.1111/jam.12757.

RODRIGUEZ-ZUNIGA, U.F.; FARINAS, C.S.; NETO, V.B.; COURI, S.; CRESTANA, S. Produção de celulases por *Aspergillus niger* por fermentação em estado sólido. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 46, p. 912-919, 2011.

RUEGGER, M.J.S.; TAUKE-TORNISIELO, S.M. Xylanase production by filamentous fungi isolated from soil of the ecological station of Juréia-Itatins, SP, Brazil. **Holos Environment**, v. 2, p. 185-194, 2002.

SADAF, A.; KHARE, S.K. Production of *Sporotrichum thermophile* xylanase by solid state fermentation utilizing deoiled *Jatropha curcas* seed cake and its application in xylooligosachharide synthesis. **Bioresource Technology**, v. 153, p. 126-130, 2014. doi: 10.1016/j.biortech.2013.11.058.

SCHINGOETHE, D.J.; STEGEMAN, G.A.; TREACHER, R.J. Response of lactating dairy cows to a cellulase and xylanase enzyme mixture applied to forages at the time of feeding. **Journal of Dairy Science**, v. 82, p. 996-1003, 1999. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(99)75319-1.

SILVA, L.A.O.; TERRASAN, C.R.F.; CARMONA, E.C. Purification and characterization of xylanases from *Trichoderma inhamatum*. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 18, p. 307-313, 2015. doi: 10.1016/j.ejbt.2015.06.001.

TERRASAN, C.R.F.; CARMONA, E.C. Solid-State Fermentation of Brewer's spent grain for xylanolytic enzymes production by *Penicillium janczewskii* and analyses of the fermented substrate. **Bioscience Journal**, v. 31, p. 1826-1836, 2015. doi: 10.14393/BJ-v31n6a2015-30044.

TILLEY, J.M.A.; TERRY, R.A. A two-stage techniques for digestion of forage crops. **Journal of the British Grassland Society**, v. 18, p. 104-111, 1963.

THOMAS, I.; SINDHU, R.; PANDEY, A. Identification and characterization of a highly alkaline and thermotolerant novel xylanase from *Streptomyces* sp. **Versita**, v. 8, p. 1022-1027, 2013. doi: 10.2478/s11756-013-0248-5.

VAN SOEST, P.J.; ROBERTSON, J.B.; LEWIS, B.A. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. **Journal of Dairy Science**, v. 74, p. 3583-3597, 1991.

