

Higor Alexandre Rodrigues Maia

Potencial celulolítico de *Trichoderma longibrachiatum* proveniente do rúmen bovino

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Produção Animal Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Produção Animal.

Área de Concentração: Produção Animal

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Robson Duarte

Coorientadora: Prof^a Dra. Janette Maria da Silva Alves

MONTES CLAROS

2017

FICHA CATALOGRÁFICA

N754d
2017

Maia, Higor Alexandre Rodrigues.
Potencial celulolítico de *Trichoderma longibrachiatum* proveniente do rúmen bovino / Higor Alexandre Rodrigues Maia. Montes Claros, MG: Instituto de Ciências Agrárias/UFMG, 2017.
56 f.: il.

Dissertação (Mestrado em Produção Animal) Universidade Federal de Minas Gerais, 2017.

Orientador: Prof. Eduardo Robson Duarte.

Banca examinadora: Junio Cota Silva, Mara Lúcia Albuquerque Pereira, Janette Maria da Silva Alves.

Referências: f: 50-54.

1. Celulases. 2. *Brachiaria decumbens*. 3. Alimentação animal. I. Maia, Higor Alexandre Rodrigues Maia. II. Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Minas Gerais. III. Potencial celulolítico de *Trichoderma longibrachiatum* proveniente do rúmen bovino.

CDU: 631.53

ELABORADA PELA BIBLIOTECA COMUNITÁRIA UNIVERSITÁRIA DO ICA/UFMG

Higor Alexandre Rodrigues Maia

Potencial celulolítico de *Trichoderma longibrachiatum* proveniente do rúmen bovino

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Produção Animal da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Produção Animal.

Área de Concentração: Produção Animal

Linha de Pesquisa: Nutrição e Alimentação animal

Orientador: Dr. Eduardo Robson Duarte
Instituto de Ciências Agrárias da UFMG

Aprovado pela banca examinadora constituída pelos professores:

Prof^a. Dr Mara Lúcia Albuquerque Pereira
(UESB)

Prof. Dr Junio Cota Silva
(ICA/UFMG)

Prof. Dr Eduardo Robson Duarte
Orientador
(ICA/UFMG)

Montes Claros, 22 de fevereiro de 2017

Dedico:

À minha esposa, Thaynar Souto, pelo amor incondicional, paciência e companheirismo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por essa graça concedida.

Ao professor Dr. Eduardo Robson Duarte, pela orientação, amizade, companheirismo e paciência. Terei sempre como exemplo de profissional dedicado e de ser humano. Serei eternamente grato a tudo que me possibilitou e permitiu alcançar.

À minha esposa, Thaynar, pelo amor incondicional, paciência, dedicação e incentivo irrestrito e fundamental durante estes anos.

Aos meus pais, Carlúcio (*in memoriam*) e Arlete, pelo amor, capacitação e ensinamentos ao longo da vida, fundamentais nesta trajetória.

Aos meus irmãos, Glenda, Nayara e Carlúcio, pelas alegrias, amizade e incentivos.

Aos meus tios, tias, primos e primas que contribuíram com carinho, amizade e incentivos para concretização deste trabalho.

À família Souto pela amizade, carinho e orações. A mãe Lia, agradeço pelo acolhimento e amor. Aos meus afilhados pelo amor e carinho.

Aos meus amigos e parceiros de laboratório, Cláudio, Pricila, Valdo, Andressa, Sabrina, Lilian, Fernanda e Katchuce que contribuíram diretamente para realização desta pesquisa. Obrigado pelos momentos de descontração.

À Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), à coordenação do Mestrado em Produção Animal e a Secretaria.

E a todos que, diretamente ou indiretamente, contribuíram com este trabalho e caminharam juntos comigo. A vocês meus sinceros agradecimentos.

“A verdadeira viagem de descobrimento não consiste em procurar novas paisagens, mas em ter novos olhos”

Marcel Proust

RESUMO

Fungos da microbiota ruminal apresentam potencial biotecnológico auxiliando e promovendo hidrólise da fibra vegetal. A vegetação fibrosa é a base da dieta dos ruminantes e a degradação das paredes celulares é fundamental para o sistema digestivo dos ruminantes.. Nesta pesquisa, avaliou-se a produção de celulases por *Trichoderma longibrachiatum*, proveniente do fluido ruminal de bovinos, em fermentação submersa de *Brachiaria decumbens* ou bagaço de cana. Avaliou-se o crescimento desse fungo com duas fontes de nitrogênio e o efeito do pH inicial sobre a produção enzimática de *T. longibrachiatum*. Posteriormente comparou-se o potencial do bagaço de cana-de-açúcar e da *B. decumbens* para a produção de celulases pelo fungo. As fermentações foram conduzidas em tubos de ensaio, em meio fermentativo contendo caldo Sabouraud, a fonte de nitrogênio e a fonte de carbono acondicionada em saquinhos de TNT. Os tubos foram incubados em *Shaker* de bancada com agitação de 120 rpm, a 39 °C durante dez dias. O delineamento foi inteiramente casualizado e após as fermentações foram avaliados os parâmetros pH final, biomassa fúngica, degradação da matéria seca do substrato, proteínas totais e quantificação de enzimas celulolíticas. Verificou-se que o fungo, em meio suplementado com sulfato de amônio, desenvolve-se melhor e promoveu melhor síntese protéica em meio com pH inicial 4,5 ($P < 0,05$). Os meios fermentativos contendo *B. decumbens* produziram maiores concentrações de celulases em comparação com aqueles suplementados com bagaço de cana ($P < 0,05$). Os extratos enzimáticos obtidos com 24 horas iniciais da fermentação promoveram maior liberação de açúcares redutores totais, para ambos os substratos. Nesta pesquisa, constatou-se que a produção de celulases pelo isolado de *T. longibrachiatum* e suas aplicações na hidrólise de materiais lignocelulósicos são promissoras para suplementação de ração animal para ruminantes e para fins biotecnológicos..

Palavras-chave: Celulose. Alimentação animal. Coquetel celulolítico. *Brachiaria decumbens*.

ABSTRACT

Fungi of the ruminal microbiota present biotechnological potential, as they have cellulolytic activities that aid and promote the hydrolysis of the vegetal fiber. The fibrous vegetation is the basis of the ruminant diet and the degradation of the cell walls is fundamental to the digestive system of ruminants. In this research, the production of cellulases by *Trichoderma longibrachiatum*, from the ruminal fluid of cattle, was evaluated in submerged fermentation of *Brachiaria decumbens* or sugarcane bagasse. It was evaluated the growth of this fungus with two sources of nitrogen and the effect of the initial pH on the enzymatic production of *T. longibrachiatum*. Subsequently, we compared the potential of sugarcane bagasse and *B. decumbens* for the production of cellulases by the fungus. The fermentations were conducted in test tubes, in a medium fermentation containing Sabouraud broth, the nitrogen source and the carbon source packed in TNT sachets. The tubes were incubated on shaker bench with shaking at 120 rpm, at 39 ° C for ten days. The design was completely randomized and after the fermentations the final pH, fungal biomass, substrate dry matter degradation, total proteins and cellulolytic enzyme quantification were evaluated. It was verified that the fungus, in medium supplemented with ammonium sulfate, develops better and promoted better protein synthesis in medium with initial pH 4,5. The fermentative media containing *B. decumbens* produced larger concentrations of cellulases compared to those supplemented with sugarcane bagasse ($P < 0.05$). The enzymatic extracts obtained with 24 hours of fermentation promoted greater release of total reducing sugars for both substrates. In this research, it was verified that the production of cellulases by the *T. longibrachiatum* isolate and its applications in the hydrolysis of lignocellulosic materials purposes are promising for animal feed supplementation for ruminants and for biotechnological.

Keywords: Cellulose: Animal feeding. Cellulolytic cocktail. *Brachiaria decumbens*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Composição da parede celular vegetal.....	16
Figura 2: Ligação glicosídica tipo β -D (1,4) da molécula de celulose.....	17
Figura 3: Estrutura típica da hemicelulose mostrando as diferentes ligações e compostos encontrados nas ramificações.....	17
Figura 4: Fragmento de estrutura da lignina.....	18
Figura 5: Representação esquemática de um sistema celulolítico.....	20
Figura 1.1: Valores de pH no decorrer do processo fermentativo por <i>Trichoderma longibrachiatum</i> com bagaço de cana e <i>Brachiaria decumbens</i> suplementados com sulfato de amônio ou ureia. Média dos valores observados nas fermentações, ensaios realizados em triplicata.....	34
Figura 1.2: Crescimento de massa fúngica no decorrer do processo fermentativo por <i>Trichoderma longibrachiatum</i> com bagaço de cana e <i>Brachiaria decumbens</i> suplementados com sulfato de amônio ou ureia. Média dos valores observados nas fermentações, ensaios realizados em triplicata.....	34
Figura 1.3: Comportamento do pH das fermentações de bagaço de cana (BC) ou <i>Brachiaria decumbens</i> (BD) por <i>Trichoderma longibrachiatum</i> em meios tamponados com acetato de sódio (pH 4,5) ou fosfato de sódio (pH 6,8) ao longo dos períodos de incubações.....	36
Figura 1.4: Massa de <i>Trichoderma longibrachiatum</i> (mg) em fermentações com bagaço de cana ou <i>Brachiaria decumbens</i> em meios tamponados com acetato de sódio (pH 4,5) ou fosfato de sódio (pH 6,8) ao longo de dez dias.....	37
Figura 1.5: Valores médios das degradações dos substratos bagaço de cana (BC) e <i>Brachiaria decumbens</i> (BD) fermentados em meios tamponados com acetato de sódio ou fosfato de sódio por <i>T. longibrachiatum</i> ao longo de dez dias de fermentação.....	38

Figura 1.6: Valores médios dos teores de proteínas nos extratos de bagaço de cana (BC) e <i>Brachiaria decumbens</i> (BD) fermentados em meios tamponados com acetato de sódio ou fosfato de sódio por <i>T. longibrachiatum</i> ao longo de dez dias de fermentação.....	40
Figura 1.7: Concentração de açúcares redutores totais liberados pela ação das Celulases totais produzidas por <i>T. longibrachiatum</i> no decorrer das fermentações nos substratos bagaço de cana (BC) ou <i>Brachiaria decumbens</i> (BD) em diferentes períodos avaliados.....	41
Figura 1.8: Concentração de açúcares redutores totais liberados pela ação das carboximetilcelulases produzidas por <i>T. longibrachiatum</i> no decorrer das fermentações nos substratos bagaço de cana (BC) ou <i>Brachiaria decumbens</i> (BD) em diferentes períodos avaliados.....	42
Figura 1.9: Concentração de açúcares redutores totais liberados pela ação das avicelases produzidas por <i>T. longibrachiatum</i> no decorrer das fermentações nos substratos bagaço de cana (BC) ou <i>Brachiaria decumbens</i> (BD) em diferentes períodos avaliados.....	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição bromatológica da <i>Brachiaria decumbens</i> proveniente da zona rural do município de Montes Claros/MG e do bagaço de cana proveniente da Usina São Judas Tadeu (SADA) localizada em Jaíba/MG.....	29
Tabela 2: Valores de pH, massa de fungo e degradabilidade do substrato, coletadas após 240 horas de fermentação submersa de bagaço de cana (BC) ou <i>Brachiaria decumbens</i> (BD) sob agitação a 120 rpm a 39 °C.....	33
Tabela 3: Valores de pH ao término do período de fermentação do bagaço de cana (BC) ou <i>Brachiaria decumbens</i> (BD) em meios tamponados com acetato de sódio (pH 4,5) ou fosfato de sódio (pH 6,8), incubados a 39°C.....	35
Tabela 4: Valores de massa fúngica (mg) ao término das fermentações do bagaço de cana (BC) e <i>Brachiaria decumbens</i> (BD) em meios tamponados com acetato de sódio (pH 4,5) e fosfato de sódio (pH 6,8), incubados a 39°C.....	37
Tabela 5: Teores de proteína total (µg/mL) ao término do período de fermentação do bagaço de cana (BC) e <i>Brachiaria decumbens</i> (BD) em meios tamponados com acetato de sódio (pH 4,5) e fosfato de sódio (pH 6,8), incubados a 39°C.....	39
Tabela 6: Açúcares totais (µmol/L) liberados pela ação das celulasas totais produzidas por <i>T. longibrachiatum</i> após dez dias de fermentação do bagaço de cana (BC) ou <i>Brachiaria decumbens</i> (BD) em meios tamponados com acetato de sódio (pH 4,5) ou fosfato de sódio (pH 6,8), incubados a 39°C.....	41
Tabela 7: Açúcares totais (µmol/L) liberados pela ação das carboximetilcelulasas produzidas por <i>T. longibrachiatum</i> após dez dias de fermentação do bagaço de cana (BC) e <i>Brachiaria decumbens</i> (BD) em meios tamponados com acetato de sódio (pH 4,5) e fosfato de sódio (pH 6,8), incubados a 39°C.....	43

Tabela 8: Açúcares totais ($\mu\text{mol/L}$) liberados pela ação das avicelases produzidas por *Trichoderma. longibrachiatum* após dez dias de fermentação do bagaço de cana (BC) ou *Brachiaria decumbens* (BD) em meios tamponados com acetato de sódio (pH 4,5) ou fosfato de sódio (pH 6,8), incubados a 39°C.....

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVOS	16
2.1 Objetivo Geral.....	16
2.2 Objetivos Específicos.....	16
3 REVISÃO DE LITERATURA	17
3.1 Biomassa lignocelulósica.....	17
3.2 Pré-tratamento de materiais lignocelulósicos.....	19
3.2.1 Pré-tratamento físico.....	20
3.3 Microrganismos e enzimas.....	20
3.4 Uso de substratos lignocelulósicos para produção de celulasas por fermentação em estado sólido e fermentação submersa.....	21
3.5 Referências.....	23
4 POTENCIAL CELULOLÍTICO DE <i>Trichoderma longibrachiatum</i> PROVENIENTE DO RÚMEN BOVINO	26
RESUMO.....	26
ABSTRACT.....	26
INTRODUÇÃO.....	27
MATERIAL E MÉTODOS.....	28
RESULTADOS.....	34
DISCUSSÃO.....	46
CONCLUSÃO.....	49
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	50
6 REFERÊNCIAS	51
ANEXOS	56

1 INTRODUÇÃO

Biomassas lignocelulósicas constituem o composto orgânico mais abundante em nosso planeta. São polissacarídeos, formados por celulose, hemicelulose, lignina e pequenas frações de outros componentes, são consideradas matérias-primas altamente renováveis (SILVA, 2016). O principal constituinte da parede celular vegetal é a celulose que representa 40% da reserva de carbono presente na biosfera. A vegetação fibrosa é considerada base da dieta dos ruminantes e a degradação das paredes celulares vegetais é fundamental para o sistema digestivo dos ruminantes. As interações simbióticas entre microrganismos ruminais e ruminantes atende às necessidades protéicas, energéticas e vitamínicas, contribuindo para o crescimento e a produção animal (Oliveira *et al.*, 2007).

A celulose pode ser hidrolisada por processos químicos, enzimáticos ou pela combinação dos dois métodos. Na natureza essa degradação ocorre de maneira lenta, visto que a lignina e a cristalinidade dos substratos limitam as ações de microrganismos (PALONEN *et al.* 2004).

Atualmente, pesquisas têm analisado biomassas lignocelulósicas que se adéquam ao processo de hidrólise enzimática. A matéria-prima ideal deve ser de fácil acesso, estar disponível em grande quantidade, ser barata e fácil de ser processada (JUHÁSZ *et al.*, 2005). O bagaço de cana de açúcar vem sendo amplamente avaliado na literatura como co-produto agroindustrial com potencial para produção desses complexos enzimáticos. O Brasil é o maior produtor de cana-de-açúcar do mundo, na safra 2016/2017, apresentou área cultivada, destinada à moagem, de nove milhões de hectares, com produtividade média de 72 t/ha (CONAB, 2016). A cada três toneladas de cana é gerada uma tonelada de bagaço, quantidade suficiente para que o bagaço possa ser utilizado como matéria-prima em diversos processos (CRUZ, 2008).

Brachiaria decumbens também atende a esses requisitos como matéria-prima, porém poucos estudos relacionam sua utilização à produção de complexos enzimáticos. Atualmente, 70 milhões de hectares de pastagens são formadas por espécies do gênero *Brachiaria*. Aproximadamente, 35 milhões de ha são constituídos pela espécie *B. decumbens*. A produção de matéria seca varia conforme o manejo e em média corresponde a 15 t/ha/ano de matéria seca (ALVIM *et al.*, 2002).

Em regiões semiáridas, a quantidade de forragem disponível e a qualidade da pastagem são comprometidas durante períodos secos, quando a digestibilidade da forrageira é reduzida pela lignificação fisiológica da parede celular vegetal (GERÔNIMO, 2011). As espécies fúngicas produzem enzimas lignocelulolíticas de ação sinérgica, contribuindo para a degradação dos materiais lignocelulósicos na natureza. A remoção do complexo de lignina oferece o potencial para libertar celulose e outros hidratos de carbono para processos industriais e para alimentação de ruminantes (DASHTBAN *et al.*, 2010).

Microrganismos, principalmente os fungos, são os responsáveis pela produção de coquetéis enzimáticos, ricos em celulasas, hemicelulasas, pectinases, ligninases e outras enzimas que, de forma conjunta, atuam na degradação dos materiais lignocelulósicos

(FARINAS, 2011). A ação sinérgica ocorre como resultado da atuação corporativa das enzimas do complexo, onde o produto de uma gera o substrato para outra (ROUSSOS e RAIMBOLT, 1982).

Fungos da microbiota ruminal apresentam potencial biotecnológico, pois possuem habilidades mecânicas e enzimáticas que auxiliam e promovem a hidrólise da fibra vegetal (CERDÀ, 2003). Os fungos têm aplicação para a produção de enzimas que facilitam a degradação de polissacarídeos em ruminantes. As culturas microbianas de *Aspergillus oryzae*, *Saccharomyces cerevisiae* e os extratos desses fungos têm sido utilizados como suplementos em dietas de ruminantes, aumentando a produtividade em 7-8%.

Os fungos anaeróbios do rúmen podem assumir maior importância para a digestão das forragens tropicais, produzindo enzimas ativas na degradação da celulose e da hemicelulose lignificada (CERDÀ, 2003; PAUL *et al.*, 2004). No entanto, é necessário avaliar o comportamento desses fungos isoladamente, sem a interação com outros microrganismos e seus metabólitos.

Bovinos de corte alimentados em pastagens tropicais lignificadas apresentam diversos fungos no líquido ruminal com predomínio de *Aspergillus spp.* e *Trichoderma spp.* (ABRÃO *et al.*, 2014), que demonstraram potencial para suplementação na alimentação animal, bem como para fins industriais (FACCHINI *et al.*, 2011; GOMES *et al.*, 2014). A adição de aditivos microbianos contendo fungos exógenos e suas enzimas a dietas de ruminantes promovem aumento da produção de leite por meio da otimização da digestão (KUNG *et al.*, 2000, YANG *et al.*, 2000).

As biomassas lignocelulósicas podem constituir substratos para crescimento fúngico e produção de complexos enzimáticos (CASTRO e PEREIRA, 2010; SHARMA e ARORAB, 2015). O alto custo de produção dessas enzimas limita o processo em escala comercial (SIQUEIRA *et al.*, 2010). A diminuição dos gastos é possível com melhoramento do meio de cultivo, adicionando-se co-produtos agrícolas ou materiais renováveis de baixo custo como matéria prima e com suplementação de nitrogênio assimilável para o fungo, (SINGH *et al.*, 2009; CASTRO *et al.*, 2010; MAEDA *et al.*, 2011).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a produção de celulases por *Trichoderma longibrachiatum* proveniente do ambiente ruminal bovino em fermentação submersa de *Brachiaria decumbens* ou bagaço de cana.

2.2 Objetivos Específicos

Otimizar o meio de cultura para a fermentação e o crescimento desse fungo com duas de fontes de nitrogênio não protéico.

Analisar o efeito do pH inicial sobre a produção enzimática de *T. longibrachiatum*, comparando-se o potencial do bagaço de cana-de-açúcar ou da *Brachiaria decumbens* para a produção de celulases.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Biomassa lignocelulósica

A biomassa lignocelulósica é formada por celulose (32-50%), hemicelulose (19-25%) e lignina (23-32%), uma pequena parte de ácidos orgânicos, sais e minerais (HAMELINCK *et al.*, 2005; PANDEY *et al.*, 2000). As proporções dos componentes nas células vegetais variam de acordo com a espécie, maturidade e local de cultivo da planta (PRASAD *et al.*, 2006).

A parede celular vegetal é uma estrutura complexa que diferencia as células vegetais das animais (Figura 1). É formada por agrupamentos de macromoléculas e apresentam composições químicas muito diferentes (SUN e CHENG, 2002).

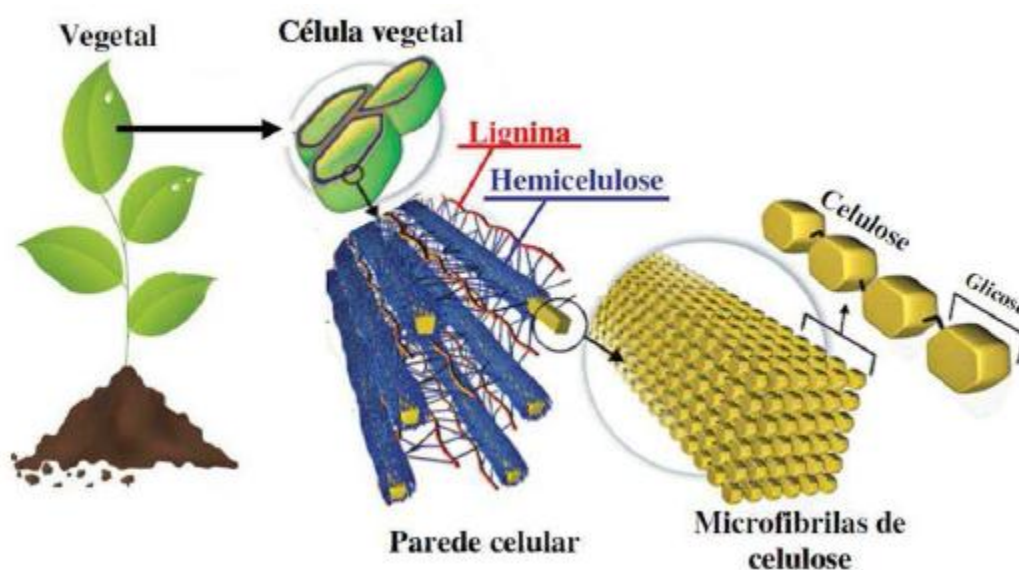


Figura 1: Composição da parede celular vegetal
Fonte: Adaptado de RITTER, 2008

O principal polissacarídeo da parede celular vegetal é a celulose. É constituída de uma molécula simples formada por anéis de β -D-glicopiranosose unidas por ligações do tipo β -D (1,4) glicosídicas (Figura 2), de fórmula geral $(C_6H_{10}O_5)_n$. Representa um polímero natural de um homopolissacarídeo linear que apresenta a celobiose como unidade repetitiva (RABELO, 2010). As moléculas de celulose ligam-se umas as outras por pontes de hidrogênio, formando fibrilas (SÁNCHEZ, 2009).

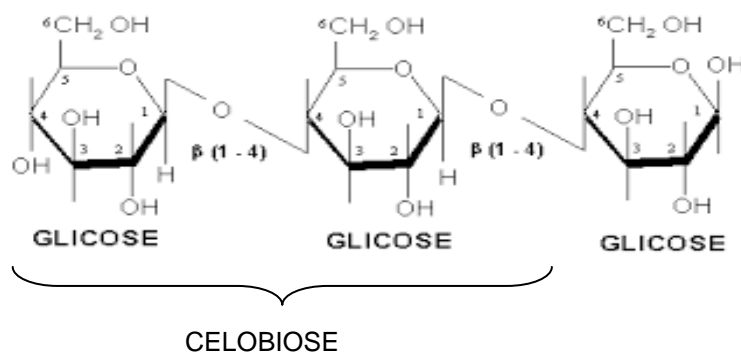


Figura 2: Ligação glicosídica tipo β -D (1,4) da molécula de celulose.
Fonte: Adaptado de Andrade, 2009

O que torna a celulose resistente ao processo de hidrólise são as longas cadeias de glicose, com mais de 7 μm , unidas por lignina formando micelas, combinadas de modo a formar microfibrilas com diâmetro entre 4-10 nm. O conjunto de microfibrilas é denominado de macrofibrilas, que formam a estrutura fibrosa. As microfibrilas de celulose são revestidas com hemicelulose e embebidas em lignina (CARLILE *et al.*, 2001).

Hemiceluloses são heteropolissacarídeos formados por vários resíduos de pentoses (xilose e arabinose) e hexoses (glicose, manose e galactose), ácidos urônicos e grupos acetila. Esses açúcares estão ligados entre si, principalmente por ligações glicosídicas β -1,4 e β -1,3, formando uma estrutura principal composta por um tipo específico de resíduo, a partir da qual surgem ramificações laterais de cadeias curtas de outros compostos. A classificação das hemiceluloses ocorre em função do açúcar predominante na cadeia principal e nas ramificações laterais (BUCKERIDGE, 2010). As hemiceluloses são classificadas como xilanas, mananas, galactanas e arabinanas, de acordo com o monômero constituinte (Figura 3).

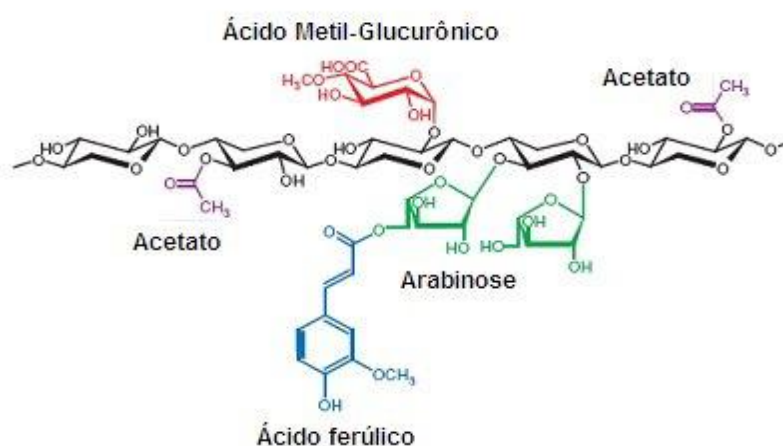


Figura 3: Estrutura típica da hemicelulose mostrando as diferentes ligações e compostos encontrados nas ramificações.
Fonte: DODD; CANN, 2009.

A lignina é o mais importante componente não-carboidrato da biomassa lignocelulósica, sua estrutura é uma complexa macromolécula fenólica e hidrofóbica. Durante o crescimento das plantas, a lignina é depositada na rede de carboidratos da parede celular secundária (SANDGREN *et al.*, 2005). É um heteropolímero amorfo constituído de unidades de fenilpropano (álcool coniferílico, álcool sinapílico e álcool *p*-cumarílico) conectados por diferentes ligações C-C e C-O-C (PAPINUTTI e FORCHIASSIN, 2007; HENDRIKS e ZEEMAN, 2009).

As ligações que predominam na estrutura da molécula de lignina são as ligações éteres (O-4 éter), que sob condições biológicas não são hidrolisáveis conferindo resistência a estrutura aos ataques químicos e enzimáticos (HAMMEL e CULLEN, 2008). A lignina é ligada covalentemente à hemicelulose, principalmente às xilanas, por ligações éster, formando uma matriz complexa que circunda as microfibrilas de celulose. A lignina confere resistência às plantas contra ataques microbianos e ao estresse oxidativo (SANDGREN *et al.*, 2005; HENDRIKS e ZEEMAN, 2009).

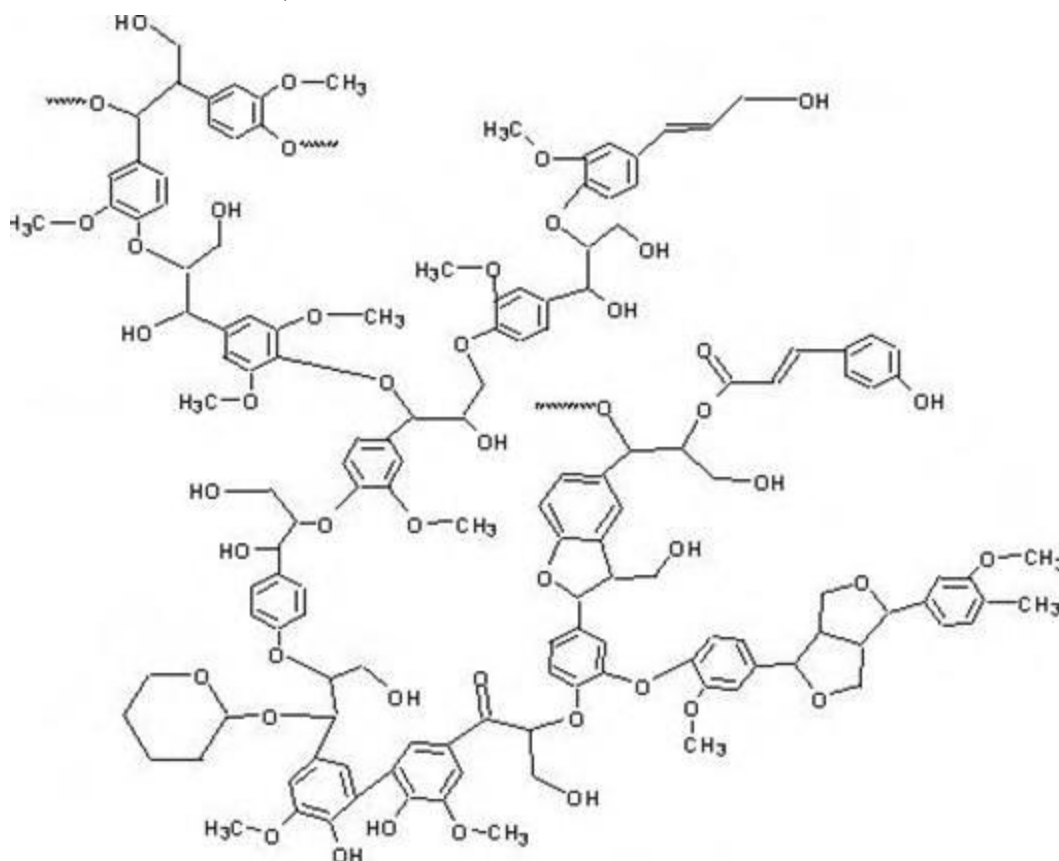


Figura 4: Fragmento de estrutura da lignina.
Fonte: Andrade, 2009.

3.2 Pré-tratamento de materiais lignocelulósicos

A matéria-prima lignocelulósica apresenta em seu estado original características que dificultam ou impedem as ações enzimáticas. O pré-tratamento da biomassa lignocelulósica consiste na manipulação, química, física, biológica ou combinados para permitir ou facilitar o acesso das enzimas aos componentes da parede celular da biomassa lignocelulósica (REF).

O objetivo do pré-tratamento é alterar ou remover impedimentos estruturais ou composicionais, para melhorar as taxas de hidrólise e aumentar os rendimentos de açúcares fermentescíveis a partir da biomassa lignocelulósica (MOSIER *et al.*, 2005).

O pré-tratamento escolhido é determinante para a hidrólise do material lignocelulósico. A celulose, hemicelulose e a lignina terão comportamentos específicos frente à ação do pré-tratamento. Os efeitos destes processos estão associados à dissolução da hemicelulose e alteração da estrutura da lignina, o que favorece o acesso das enzimas hidrolíticas aos componentes da célula vegetal (HENDRIKS e ZEEMAN, 2009). Assim, o pré-tratamento é necessário para alterar a estrutura da biomassa celulósica, tornando-a mais acessível para as enzimas que atuam na conversão de carboidratos em açúcares fermentescíveis (PATEL e ONKARAPPA, 2007).

Na seleção dos pré tratamentos, fatores devem ser observados para obter baixo custo, aumento da liberação de açúcares, redução de perdas pela degradação de carboidratos e redução da produção de subprodutos inibidores (ADSUL *et al.*, 2005 e MARTÍN *et al.*, 2006).

3.2.1 Pré tratamento físico

Os pré tratamentos físicos, como, moagem, microondas e irradiação, são utilizados a fim de favorecerem a hidrólise dos materiais lignocelulósicos. A grande desvantagem deste método reside na alta demanda energética necessária para realização dos processos. Explosão a vapor, explosão de fibra por amônia, explosão de CO₂ ou água quente pressurizada são exemplos. A moagem resulta na redução do tamanho da partícula do substrato, aumentando sua área de superfície e diminui a cristalinidade e o grau de polimerização da celulose (RAMOS, 2003).

3.3 Microrganismo e enzimas hidrolíticas

Os fungos da microbiota ruminal têm recebido grande interesse biotecnológico, pois possuem atividades mecânicas e enzimáticas que auxiliam na degradação de materiais lignocelulósicos (CERDÀ, 2003).

As condições ideais de atividade para algumas enzimas, na maioria das vezes, não são as mesmas observadas no rúmen. Sendo assim, enzimas que atuam em pH e temperatura diferentes das condições ruminais podem ser inativadas ou apresentar baixa atividade quando submetidas a outras condições de pH e temperatura (LARA, 2013).

Os fungos do gênero *Trichoderma* correspondem à fase anamórfica do gênero *Hypocrea*, pertencentes à classe dos fungos Mitospóricos, subclasse Hifomicetos, ordem Moniliales, família Moniliacea (SAMUEL e HADAVI, 1996). A principal característica morfológica do gênero *Trichoderma* spp. é a presença de micélio, inicialmente na cor branca e rápido crescimento. Com o desenvolvimento, torna-se cotonoso e compacto com tufo verdes (DOMSH *et al.*, 1980).

O fungo *Trichoderma* spp. é um microrganismo naturalmente encontrado no solo, apresenta importante função ecológica, atuando na decomposição e mineralização dos

resíduos vegetais, contribuindo com a disponibilização de nutrientes para as plantas (MENEZES *et al.*, 2010).

O complexo enzimático produzido por fungos é responsável pela hidrólise da biomassa lignocelulósica, sendo constituído por enzimas com diferentes especificidades para hidrolisar ligações glicosídicas (SÁNCHEZ, 2009).

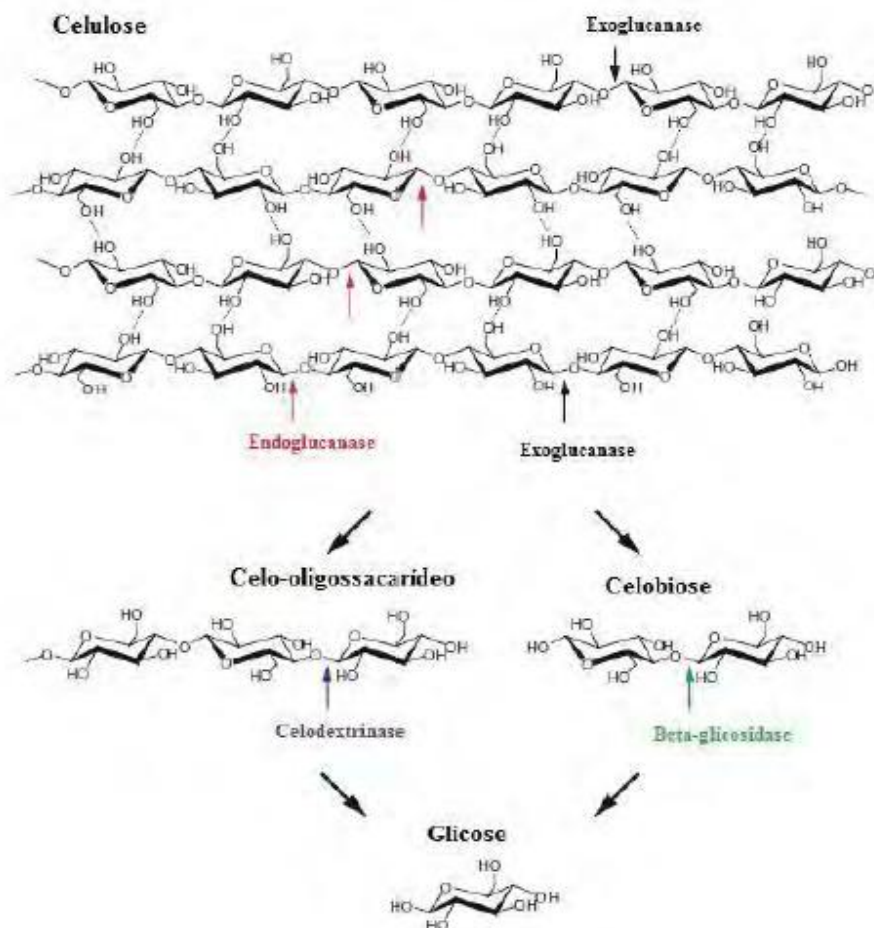


Figura 5: Representação esquemática de um sistema celulolítico.
Fonte: Yeoman *et al.*, 2010.

3.4 Uso de substratos lignocelulósicos para produção de celulasas por fermentação em estado sólido e fermentação submersa

O substrato lignocelulósico ideal deve ser barato, de fácil processamento, disponível em grande quantidade e, sua composição deve ser adequada tanto para a hidrólise quanto para a produção das enzimas celulolíticas (JUHÁSZ *et al.*, 2005).

Em 2002, 70% das pastagens cultivadas no país eram constituídas por espécies do gênero *Brachiaria* e estima-se que 50% das pastagens de *Brachiaria* eram constituídas pela espécie *Brachiaria decumbens*, tornando assim a espécie mais difundida no Brasil (ALVIM *et al.*, 2002).

O bagaço de cana-de-açúcar é obtido em grande quantidade no Brasil, média de 290 kg por tonelada de cana-de-açúcar. Estima-se que a cada ano sejam produzidos de 5 – 12 milhões de toneladas desse material, correspondendo a 30% do total moído. Considerado um

subproduto do qual ficam apenas alguns constituintes do material original restando fibras e alguma quantidade de açúcar (SILVA *et al.*, 2007).

A fermentação em estado sólido envolve sólidos na ausência ou quase ausência de água livre entre as partículas do substrato, porém, com umidade suficiente para o crescimento e metabolismo microbianos. Este processo simula as condições observadas na natureza, onde os fungos filamentosos crescem sobre materiais sólidos (PANDEY, 2003; SINGHANIA *et al.*, 2009).

Existe grande interesse em relação à FES, devido ao potencial de aplicação em bioprocessos. A técnica pode ser empregada em processos de biorremediação, detoxificação biológica de resíduos agroindustriais, bioconversão de biomassa, biotransformação de resíduos agrícolas para enriquecimento nutricional e produção de produtos de alto valor agregado. Metabólitos secundários biologicamente ativos, incluindo antibióticos, alcalóides, fatores de crescimento vegetal, enzimas, ácidos orgânicos e biocombustíveis, podem ser obtidos pelo uso da técnica de FES (SINGHANIA *et al.*, 2009; WANG e YANG, 2007).

As vantagens biotecnológicas da FES são maior produtividade, maior concentração de produtos finais, maior estabilidade dos produtos, menor repressão catabólica, cultivo de microrganismos especializados em substratos insolúveis em água, ou cultivo de misturas de vários fungos (SINGHANIA *et al.*, 2009).

Fatores como temperatura, pH, aeração, atividade de água e umidade, natureza do substrato sólido empregado são importantes para o estabelecimento da FES (SINGHANIA *et al.*, 2009).

A fermentação submersa (Fsm) consiste na utilização de um meio fermentativo líquido onde os nutrientes encontram-se dissolvidos ou suspensos. Atualmente é o método fermentativo preferido para as aplicações comerciais, utilizada pela maioria das indústrias de bioprodutos. Controlar a Fsm é relativamente fácil, uma vez que a transferência de massa, calor e oxigênio são facilitadas e a homogeneidade geralmente é superior. Este processo é mais confiável e reproduzível, de fácil controle e monitoramento o que torna a condução da fermentação e a observação dos parâmetros-chaves mais simples (FAZENDA *et al.*, 2008). Porém, a operacionalização e o grande volume de resíduos gerados encarecem o processo (WANG e YANG, 2007).

3.5 REFERÊNCIAS

- ADSUL, M. G.; GHULE, J. E.; SHAIKH, H.; SINGH, R.; BASTAWDE, K. B.; GOKHALE, D. V.; VARMA, A.J. Enzymatic hydrolysis of delignified bagasse polysaccharides. **Carbohydrate. Polymers**. v. 62, p. 6-10, 2005.
- ANDRADE M. A. **Avaliação do uso de radiação micro-ondas e ultrassom combinados com agentes químicos como pré-tratamentos de bagaço de cana de açúcar para posterior hidrólise enzimática**. 2009. 85 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2009.
- ALVIM, M. J.; BOTREL, M. A.; XAVIER, D. F. **As principais espécies de *Brachiaria* utilizadas no país**. Juiz de Fora: Embrapa Gado de leite, 2002. 4p. (Embrapa Gado de leite. Comunicado Técnico, 22).
- BUCKERIDGE, M. S.; SANTOS, W. D. dos; SOUZA, A. P. As rotas para o etanol celulósico no brasil. In: CORTEZ, L. A. B. (Coord.). **Bioetanol de cana-de-açúcar: P&D para produtividade e sustentabilidade**. São Paulo: Editora Blucher, 2010. p. 365-380.
- CARLILE, M. J.; WATKINSON, S. C.; GOODAY, G. W. **The Fungi**. 2. ed. San Diego: Elsevier Academic Press, 2001. 588 p.
- CERDÀ, A. R. **Fermentación Ruminal, Degradación Protéica y Sincronización Energía-Proteína en Terneras en Cebo Intenso**. Tese (Doutorado em Produção Animal) – Universitat Autònoma de Barcelona, Espanha, 196 f., 2003.
- DODD, D.; CANN, I. K. O. Enzymatic deconstruction of xylan for biofuel production. **GCB Bioenergy**, [S. l.], v. 1, p. 2–17, 2009.
- DOMSCH, K. H.; GAMS, W.; ANDERSON, T. H. **Compendium of soil fungi**. CRC Press, London, 1980. p. 630. (muito antigo)
- FAZENDA, M. L.; SEVIOUR, R.; MCNEIL, B.; HARVEY, L. M. Chapter 2. Submerged Culture Fermentation of “Higher Fungi”: The Macrofungi. **Advances in Applied Microbiology**, v. 63, 2008.
- HAMELINCK, C.N.; VAN HOOIJDONK, G.; FAAIJ, A.P.C. Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short-, middle- and long-term. **Biomass and Bioenergy**, v.28, n.4, p.384- 410, 2005.
- HAMMEL, K.E.; CULLEN, D. Role of fungal peroxidases in biological ligninolysis. **Current Opinion in Plant Biology**, v.11, p. 349–355, 2008.
- HENDRIKS, A. T. W. M.; ZEEMAN, G. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v.100, n.1, p.10-18, 2009.
- JUHÁSZ, T.; SZENGYEL, Z.; RÉCZEY, K.; SIIKA-AHO, M.; VIKARI, L. Characterization of cellulases and hemicellulases produced by *Trichoderma reesei* on various carbon sources. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 3519–3525, 2005.
- LARA, E. C. **Produção e avaliação de enzimas fibrolíticas exógenas na ensilagem de milho**. 2013. 73p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal 2013.
- MAEDA, R.N.; SERPA, V.I.; ROCHA, V.A.L.; MESQUITA, R.A.A.; SANTA ANNA, L.M.M.; CASTRO, A.M. de; DRIEMEIER, C.E.; PEREIRA JUNIOR, N.; POLIKARPOV, I. Enzymatic hydrolysis of pretreated sugar cane bagasse using *Penicillium funiculosum* and *Trichoderma harzianum* cellulases. **Process Biochemistry**, v.46, p.1196-1201, 2011.

MARTÍN C.; KLINKE H.B.; THOMSEN A.B. Wet oxidation as a pretreatment method for enhancing the enzymatic convertibility of sugarcane bagasse. **Enzyme and Microbial Technology**, v.40, n.3, p.426-432, 2006.

MENEZES, J.P.; JUNGES, E.; BLUME, E.; PEREIRA, M.E. Toxicologia do biopreparado a base de *Trichoderma* sp. (isolado UFSM T17) administrado em mamífero. **Revista da FZVA**, v.17, n.1, p.38-50, 2010.

MOSIER, N., WYMAN, C., DALE, B., ELANDER, R, LEE, Y. Y., HOLTZAPPLE, M., LADISCH, M. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass, **Bioresource Technology**, v. 96, 673-686, 2005.

PANDEY, A. Solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**. v. 13, p. 81-84, 2003.

PANDEY, A.; SOCCOL, C.R.; MITCHELL, D. New developments in solid state fermentation. I. Bioprocesses and products. **Process Biochemistry**, v.35, n.10, p.1153-1169, 2000.

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

PATEL, S.J.; ONKARAPPA, R.; KS, S. Funkal pretreatment studies on rice husk and bagasse for ethanol production. **Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry**, v. 6, p. 1921- 1926, 2007.

PRASAD, S.; SINGH, A.; JOSHI, H. C. Ethanol as an alternative fuel from agricultural, industrial and urban residues. **Resources Conservation & Recycling**, v. 50, p. 1-39, 2006.

RABELO, S.C. **Avaliação e otimização de pré-tratamentos e hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol de segunda**. 2010. 414 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2010.

RAMOS, L. P. The chemistry involved in the steam treatment of lignocellulosic materials. **Química Nova**. Curitiba, v.26, p.863-871, 2003.

RITTER, S.K. Lignocellulose: A complex biomaterial. *Chemical and Engineering News*, Washington, v. 86, n.49, p. 10-15, 2008.

SAMUEL, N.; HADAVI, N. *Trichoderma*: review of biology and systematics of the genus. **Journal of General Microbiology**, v. 100, p. 923-935, 1996.

SÁNCHEZ, C. Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. **Biotechnology Advances**, v. 27, p. 185-194, 2009.

SANDGREN, M.; STAHLBERG, J.; MITCHINSON, C. Structural and biochemical studies of GH family 12 cellulases: improved thermal stability, and ligand complexes. **Progress in Biophysics and Molecular Biology** v. 89, p. 246- 291, 2005.

SILVA, V.L.M.M.; GOMES, W.C.; ALSINA, O.L.S. Utilização do bagaço de cana-de-açúcar como biomassa adsorvente na adsorção de poluentes orgânicos. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v. 2, p. 27-32, 2007.

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.

SINGHANIA, R. R.; SUKUMARANA, R. K.; PATEL, A. K.; LARROCHEB, C.; PANDEY, A. Advancement and comparative profiles in the production Technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 46, p. 541-549, 2010.

SUN, Y.; CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic material for ethanol production: A review. **Bioresource Technology**, v. 83, p. 1-11, 2002.

WANG, L.; YANG, S-T. Chapter 18. Solid state fermentation and its applications. **Bioprocessing for Value-Added Products from Renewable Resources**, v p. 465-471, 2007.

YEOMAN, C. J.; HAN, Y.; DODD, D.; SCHROEDER, C. M.; RODERICK I. MACKIE, R. I.; CANN, I. K. O. Chapter 1. Thermostable Enzymes as Biocatalysts in the Biofuel. **Advances in Applied Microbiology**, v. 70, p. 1-55. 2010.

4- ARTIGO

Potencial celulolítico de *Trichoderma longibrachiatum* proveniente do rúmen bovino

Artigo elaborado conforme normas da revista
Journal of Animal Science and Biotechnology.

Resumo

Contextualização: Algumas espécies de fungos podem hidrolisar materiais lignocelulósicos promovendo a produção de açúcares fermentescíveis. Nesta pesquisa, avaliou-se a produção de celulases por *Trichoderma longibrachiatum* proveniente do fluido ruminal de bovinos em fermentação submersa de *Brachiaria decumbens* ou bagaço de cana. Avaliou-se o crescimento desse fungo com suplementação de ureia ou sulfato de amônio e com dois sistemas de tampão para a produção de celulases por *T. longibrachiatum* utilizando bagaço de cana-de-açúcar ou *Brachiaria decumbens*.

Métodos: As fermentações ocorreram em tubos de ensaio de 150 mL, em meio contendo caldo Sabouraud, as fontes de nitrogênio não proteicos e a fonte de carbono acondicionada em saquinhos de TNT. As fermentações foram realizadas em *Shaker* de bancada a 120 rpm e 39 °C durante dez dias. O delineamento foi inteiramente casualizado e após as fermentações foram avaliados os parâmetros pH final, biomassa fúngica, degradação da matéria seca do substrato, proteínas totais e quantificação de enzimas celulolíticas.

Resultados: Verificou-se que o fungo desenvolveu-se melhor em meio suplementado com sulfato de amônio. O isolado avaliado promoveu melhor síntese protéica em meio com pH inicial 4,5. Os meios fermentativos contendo *B. decumbens* produziram maiores concentrações de celulases. Os extratos enzimáticos obtidos com 24 horas de fermentação promoveram maior liberação de açúcares redutores totais, para ambos os substratos.

Conclusão: A produção de celulases pelo isolado de *T. longibrachiatum* proveniente do rúmen bovino e suas aplicações na hidrólise de materiais lignocelulósicos para suplementação de ração animal para ruminantes ou mesmo a utilização destas enzimas para fins biotecnológicos são promissoras.

Palavras chave: Celulose. Alimentação animal. Coquetel celulolítico. Ruminantes.

ABSTRACT

Background: Some species of fungi can hydrolyze lignocellulosic materials promoting the production of fermentable sugars. In this research, the production of cellulases by *Trichoderma longibrachiatum* from the ruminal fluid of cattle in submerged fermentation of *Brachiaria decumbens* or sugarcane bagasse was evaluated. The growth of this fungus with supplementation of urea or ammonium sulfate and with two buffer systems for the production of

cellulases by *T. longibrachiatum* using sugarcane bagasse or *Brachiaria decumbens* was evaluated.

Methods: The fermentations occurred in 150 mL test tubes, in medium containing Sabouraud broth, the non-protein nitrogen sources and the carbon source packed in TNT sachets. The fermentations were realized in Shaker of bench to 120 rpm and 39 °C during ten days. The design was completely randomized and after the fermentations the final pH, fungal biomass, substrate dry matter degradation, total proteins and cellulolytic enzyme quantification were evaluated.

Results: It was verified that the fungus was better developed in medium supplemented with ammonium sulfate. The evaluated isolate promoted better protein synthesis in medium with initial pH 4,5. The fermentative media containing *B. decumbens* produced higher concentrations of cellulases. The enzymatic extracts obtained with 24 hours of fermentation promoted greater release of total reducing sugars for both substrates.

Conclusion: The production of cellulases by the *T. longibrachiatum* isolate from the bovine rumen and its applications in the hydrolysis of lignocellulosic materials for animal feed supplementation for ruminants or even the use of these enzymes for biotechnological purposes are promising.

Keywords: Cellulose. Animal feeding. Cellulolytic cocktail. Ruminants.

INTRODUÇÃO

A vegetação fibrosa é a base da dieta dos ruminantes e a degradação das fibras vegetais por meio da degradação dos carboidratos das paredes celulares é fundamental para o sistema digestivo dos ruminantes [1]. A interação simbiótica entre microrganismos ruminais e ruminantes atende parte das necessidades protéicas, energéticas e vitamínicas, contribuindo para o crescimento e a produção animal [2].

Atualmente, pesquisas têm analisado biomassas lignocelulósicas que se adequem ao processo de hidrólise enzimática para fins biotecnológicos. A matéria-prima ideal deve ser de fácil acesso, estar disponível em grande quantidade, ser barata e fácil de ser processada [3].

Bagaço de cana de açúcar vem sendo amplamente avaliado na literatura como co-produto agroindustrial com potencial para produção de complexos enzimáticos. Na safra 2016/2017, o Brasil apresentou área cultivada, destinada à moagem, de 9 milhões de hectares, com produtividade média de 72 t/ha [4]. Estima-se que, a cada três toneladas de cana é gerada uma tonelada de bagaço, quantidade suficiente para que o bagaço possa ser utilizado como matéria-prima em diversos processos [5]. *Brachiaria decumbens* possui características desejáveis, porém poucos estudos relacionam sua utilização à produção de complexos enzimáticos. Atualmente, 70 milhões de hectares das pastagens brasileiras são formadas por espécies do gênero *Brachiaria* [6].

Fungos da microbiota ruminal apresentam potencial biotecnológico, pois possuem habilidades mecânicas e enzimáticas que auxiliam e promovem a hidrólise da fibra vegetal [7]. Os fungos têm aplicação para a produção de enzimas que facilitam a degradação de

polissacarídeos em ruminantes. As culturas microbianas de *Aspergillus oryzae*, *Saccharomyces cerevisiae* e os extratos desses fungos têm sido utilizados como suplementos em dietas de ruminantes, aumentando a produtividade em 7-8% [8].

Os fungos anaeróbios do rúmen podem assumir grande importância para a digestão das forragens tropicais, produzindo enzimas ativas na degradação da celulose e da hemicelulose lignificada [7-9].

A adição de aditivos microbianos contendo fungos exógenos e suas enzimas a dietas de ruminantes tem sido relatada para aumentar a produção de leite por meio da otimização da digestão [10-11]. A adição de *Trichoderma longibrachiatum* autóctone ou suas enzimas hidrolíticas à forragem tropical em períodos secos poderia facilitar a degradação da parede celular das plantas, reduzindo os custos de produção [12].

As biomassas lignocelulósicas podem constituir substratos para crescimento fúngico e produção de complexos enzimáticos [13-14]. O alto custo de produção dessas enzimas limita o processo em escala comercial [15]. A diminuição dos gastos é possível com melhoramento do meio de cultivo, adicionando-se co-produtos agrícolas ou materiais renováveis de baixo custo como matéria prima e com suplementação de nitrogênio assimilável para o fungo [16-17-18]. A utilização de tecnologias alternativas no processo, como a fermentação submersa (Fsm), é amplamente discutida para maior produtividade enzimática e equalização dos custos de produção [15-19].

Neste estudo, avaliou-se a produção de celulasas por *Trichoderma longibrachiatum*, proveniente do fluido ruminal de bovinos alimentados em pastagem de *Brachiaria* (*Syn. Urochloa*) [12], em fermentação submersa de *Brachiaria decumbens* ou bagaço de cana-de-açúcar. Objetivou-se otimizar o meio de cultura para a fermentação e o crescimento desse fungo com suplementação de fontes de nitrogênio. Analisou-se também o efeito do pH sobre a produção enzimática de *T. longibrachiatum* e comparou-se o potencial do bagaço de cana-de-açúcar e da *Brachiaria decumbens* para a produção de celulasas por *T. longibrachiatum*.

MATERIAL E MÉTODOS

Microrganismo utilizado

O isolado de *Trichoderma longibrachiatum* avaliado foi proveniente do rúmen de novilhos de corte criados em sistema extensivo em pastagem *Brachiaria decumbens*, suplementado com uma mistura mineral para bovinos de corte contendo ureia [12].

Este fungo filamentoso foi cultivado durante sete dias em ágar Sabouraud, e a extração de DNA foi conduzida de acordo com Rosa et al. [20]. O material extraído foi submetido à reação em cadeia da polimerase (PCR). Os iniciadores utilizados para a amplificação da região ITS de rDNA foram ITS1 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG) e ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC), [21]. O produto foi quantificado em NanoDrop 1000ND (NanoDrop Technologies) e ajustado para 100 ng.µl⁻¹ para ser utilizado em reações de sequenciação.

As reações de sequenciação foram realizadas em DYEnamic™ (Amersham Biosciences, EUA) utilizando o sistema de sequenciação automatizado MegaBAC™ 1000 no Genome Analysis Center e Gene Expression of UFMG. As sequências de DNA obtidas foram analisadas utilizando BLASTn v. 2.215 de BLAST 2.0 [22]. Considerou-se como essa espécie o isolado com similaridade de 99% ou mais, e sequências foram depositadas no GenBank [KF781535].

O isolado foi preservado em água destilada esterilizada, conforme método Castellani [23], sendo realizados repiques periódicos a cada três meses em meio Batata, Dextrose, Agar (BDA, Acumedia, São Paulo - Brasil).

Materiais lignocelulósicos utilizados

O feno de *Brachiaria decumbens* foi produzido em uma fazenda localizada no Norte de Minas Gerais. O bagaço da cana-de-açúcar foi cedido pela Usina de Álcool e Açúcar São Judas Tadeu - SADAbio, localizada em Jaíba, Norte de Minas Gerais.

Ambos os materiais lignocelulósicos foram secos ao sol e para a padronização da granulometria os materiais passaram por processo de moagem em moinho de facas tipo Willey com granulometria de 1-3 mm. Os materiais foram acondicionados em saquinhos de tecido não tecido (TNT) com dimensões de 2 x 4 cm e gramatura de 100 µm, previamente secos em estufa a 105° C e devidamente pesados (0,5 gramas de substrato por saquinho), identificados e selados.

Subamostras de *B. decumbens* e bagaço de cana foram coletados para análise da composição bromatológica [24]. As composições desses substratos encontram-se descritas na Tabela 1.

Tabela 1: Composição bromatológica da *Brachiaria decumbens* proveniente da zona rural do município de Montes Claros/MG e do bagaço de cana proveniente da Usina São Judas Tadeu (SADA) localizada em Jaíba/MG

Parâmetros	<i>Brachiaria decumbens</i>	Bagaço de cana-de-açúcar
MS (% na MN)	95,38	91,15
FDN (% na MS)	82,26	59,89
FDA (% na MS)	53,04	37,89
Lignina (% na MS)	7,50	7,15
PB (% na MS)	3,06	2,25
CNF (% na MS)	7,77	36,42
Celulose (% na MS)	45,54	30,74
Hemicelulose (% na MS)	29,22	22,00
EE (% na MS)	1,02	0,08
Minerais (% na MS)	5,89	1,36

Notas: MS: matéria seca; MN: matéria natural; FDN: fibra em detergente neutro; FDA: fibra em detergente ácido; PB: proteína bruta; EE: extrato etéreo; CNF: Carboidratos não fibrosos.

Experimentação

O primeiro experimento teve como objetivo selecionar a fonte de nitrogênio adequada para promover o crescimento fúngico. No experimento 2 objetivou-se avaliar o efeito do pH inicial sobre o crescimento fúngico e a produção de enzimas do complexo celulolítico, utilizando dois tampões. Ambos foram conduzidos sob temperatura de 39 °C, simulando a temperatura no ambiente ruminal de bovinos.

EXPERIMENTO 1 - Efeitos da suplementação com nitrogênio não protéico em fermentações de *Brachiaria decumbens* e bagaço de cana por *Trichoderma longibrachiatum*

Comparou-se a suplementação do meio de cultivo com ureia ou sulfato de amônio a 0,5%. As fermentações ocorreram em tubos de ensaio de 150 mL, em meio contendo 0,5 g da fonte de carbono (*Brachiaria decumbens* ou bagaço de cana) acondicionados em saquinhos de TNT de 2 x 4 cm e gramatura de 100 µm, vedados em máquina seladora. O material lignocelulósico foi adicionado a 45 mL de caldo Sabouraud e 0,25 mg da fonte de nitrogênio

(sulfato de amônio ou ureia). Esses materiais foram inseridos nos tubos de ensaio e autoclavados a 120 °C e 1 atm por 20 min.

Após o resfriamento 5 mL de uma suspensão do fungo *T. longibrachiatum* padronizado a 10^7 UFC/mL foi inserida segundo a metodologia descrita por Rizzatti et al. [25]. Os tubos de ensaio foram incubados a 39°C em incubadora *Shaker* de bancada (NT712, Novatecnica, São Paulo - Brasil) com agitação orbital a 120 rpm por dez dias. Para cada tratamento, utilizou-se um grupo controle onde os meios foram padronizados conforme descrito acima, porém, sem a adição da suspensão de fungo. Os tubos controles tiveram seus volumes completados com 5 mL de meio de cultura.

O experimento foi conduzido com delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial (2x2x5), sendo dois substratos, duas fontes de nitrogênio e cinco períodos de fermentação. Utilizaram-se três repetições, considerando os períodos dois, quatro, seis, oito e dez dias de incubação. As variáveis observadas foram o potencial hidrogeniônico final (pH final) e crescimento de massa fúngica (biomassa).

EXPERIMENTO 2 – Dinâmica de produção de celulases por *Trichoderma longibrachiatum* em fermentação submersa de bagaço de cana e *Brachiaria decumbens*

Foram preparados dois meios de fermentação, o primeiro com tampão acetato de sódio (pH 4,5) e o segundo com tampão fosfato de potássio (pH 6,8). As condições de fermentação foram semelhantes aquelas descritas anteriormente, sendo utilizado o sulfato de amônio como fonte de nitrogênio, de acordo com os dados obtidos no experimento 1.

O experimento foi conduzido com delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial (2x2x6), sendo dois substratos, dois meios com pHs diferentes e seis períodos. Foram realizadas três repetições para cada tratamento e seus respectivos controles, considerando os períodos um, dois, quatro, seis, oito e dez dias de fermentação. As variáveis observadas foram pH final, biomassa, degradação da matéria seca do substrato, proteínas totais (PT) e quantificação de enzimas celulolíticas.

Obtenção dos extratos enzimáticos

Após o término das fermentações, as amostras de cada período de incubação e seus respectivos controles foram centrifugadas a 4.000 g durante 10 minutos a 4°C (Centrifuge 5804 R, Eppendorf) para realização das dosagens enzimáticas e proteínas totais. Os extratos foram acondicionados em frascos de 40 mL e conservados em ultra-freezer vertical a -80 °C (AmericanLab, São Paulo - Brasil).

Determinação da massa fúngica, degradação do substrato e pH

As massas fúngicas e os saquinhos com substratos foram colocados em placas de Petri e desidratados em estufa de secagem a 40°C (TE – 394/3, TECNAL, São Paulo - Brasil) até

obter peso constante para quantificações da massa fúngica e dos substratos degradados, em base seca.

A massa fúngica foi mensurada de maneira direta em balança analítica pela diferença entre os pesos das placas de Petri com as biomassas fúngicas e os pesos das placas vazias.

A degradação foi calculada com auxílio da fórmula abaixo:

$$\text{Degradação (\%)} = \left[1 - \left[\frac{\text{Peso final sub}}{\text{Peso inicial sub}} \right] \right] - \left[1 - \left[\frac{\text{Peso final cont}}{\text{Peso inicial cont}} \right] \right] \times 100$$

Onde:

Peso final sub: peso final do substrato em base seca (mg)

Peso inicial sub: peso inicial do substrato em base seca (mg)

Peso final cont: peso final do controle em base seca (mg)

Peso inicial cont: peso inicial do controle em base seca (mg)

O pH das amostras foi mensurado antes e após das fermentações utilizado o potenciômetro digital (PG1800, Gehaka, São Paulo - Brasil).

Determinação de proteínas totais

A concentração de proteínas totais foi determinada empregando-se o método de Bradford [26], onde foram adicionados 1 mL do reagente de Bradford (Amresco[®], Ohio - EUA) e 100 µL de extrato enzimático em tubos de ensaio, a reação foi processada por dois minutos em temperatura de 25°C, uma curva padrão de albumina sérica foi construída no programa M.Wave Basic (ChromTech) para determinar a concentração da amostra. Após a reação, as leituras foram realizadas em espectrofotômetro (AJX1000, Ajmicronal) em comprimento de onda de 595 nm e as quantificações foram expressas em µg/mL.

Dosagens enzimáticas

Dosagem de celulase total

A quantificação da atividade de celulase foi realizada em papel de filtro de acordo com a metodologia adaptada de Ghose [27]. O substrato utilizado foi o papel de filtro Whatman N^o. 1 cortado em tiras de 1,0 x 6,0 cm (aproximadamente 50 mg). O substrato foi enrolado e colocado em tubos de ensaio juntamente com 1,0 mL de tampão fosfato de potássio (0,1 M; pH 6,8) e 0,5 mL do extrato enzimático. A reação foi incubada a 39 °C durante 60 minutos e a quantificação de açúcares redutores totais (ART) foi estimada conforme a metodologia adaptada de Miller [28].

Dosagem de carboximetilcelulase (CMCase)

A carboximetilcelulase foi determinada pelo método de carboximetilcelulose (CMC) de acordo com a metodologia adaptada de Ghose [27]. Uma solução de carboximetilcelulose 1% (m/v) foi utilizada como substrato na dosagem de CMCase. Foram adicionados em tubos de

ensaio 0,5 mL de solução de substrato de carboximetilcelulose 1% (m/v), 0,5 mL de extrato enzimático e 1,0 mL de tampão fosfato de sódio (0,1 M; pH 6,8). A reação foi incubada a 39 °C durante 60 minutos e a quantificação de açúcares redutores foi estimada conforme a metodologia adaptada de Miller [28].

Dosagem de avicelase (Avicel)

Para a determinação avicelase, foi utilizada a solução de Avicel (celulose microcristalina) 1% (m/v) como substrato [29]. Constituiu na adição de 0,5 mL de extrato enzimático em tubos de ensaio juntamente com 0,5 mL de solução de Avicel 1% (m/v) e 1,0 mL de tampão fosfato de potássio (0,1 M; pH 6,8) incubados a 39 °C por 60 minutos.

Periodicamente o sistema substrato-enzima era agitado com o intuito de manter a celulose microcristalina em suspensão. Antes de realizar a retirada do volume necessário para quantificação de ART, os tubos de ensaio foram mantidos em repouso por 20 minutos para que pudesse ocorrer a precipitação da celulose microcristalina, impedido que a turbidez da mesma interferisse nas leituras.

Determinação de açúcares redutores totais por DNS

Após as incubações, 1 mL das misturas foram retirados para determinação dos ART e colocados em tubos de ensaios juntamente com 1 mL de DNS. Os tubos foram agitados e aquecidos em banho Maria (Modelo SP06/100ED, SPLabor) a 96 °C por cinco minutos. Posteriormente, os tubos foram resfriados em banho de gelo por cinco minutos, adicionando em seguida 16 mL de tartarato duplo de potássio e sódio. O branco da leitura consistiu em substituir o volume do extrato por água destilada. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro (AJX1000, Ajmicronal, São Paulo - Brasil) a 540 nm, após o aparelho ter sido zerado com água destilada, as concentrações de glicose foram expressas em g/L. Os controles foram dosados juntamente com os extratos e os valores obtidos foram descontados das leituras obtidas nos respectivos períodos de incubação. Os dados foram lidos e armazenados pelo programa M.Wave Basic (ChromTech).

A concentração de glicose foi transformada para $\mu\text{mol/L}$, mediante a interpolação da curva padrão de glicose e os resultados das dosagens foram expressos nessa unidade.

Estatística

Após teste de normalidade e homogeneidade, os dados foram avaliados e submetidos à análise de variância e as médias comparadas a 5% de significância. Utilizou-se o pacote estatístico SAEG (Sistema para Análises Estatísticas, Versão 9.1: Fundação Arthur Bernardes - UFV - Viçosa, 2007) [30] para analisar os dados.

RESULTADOS

Efeitos da fonte de nitrogênio em fermentações de *Brachiaria decumbens* e bagaço de cana por *Trichoderma longibrachiatum*

O fungo *T. longibrachiatum* promoveu maior degradação na *Brachiaria decumbens* em relação ao bagaço de cana (Tabela 2). A *B. decumbens* apresentou média de degradabilidade pelo fungo de 48,7%, não verificou-se diferença significativa ($P > 0,05$) entre as fontes de nitrogênio. No bagaço de cana o fungo degradou em média 42,5% e não houve diferença significativa ($P > 0,05$) entre as fontes de nitrogênio utilizadas (Tabela 2).

Tabela 2: Valores médios de pH, massa de fungo e degradabilidade do substrato, coletadas após 240 horas de fermentação submersa de bagaço de cana (BC) ou *Brachiaria decumbens* (BD) sob agitação a 120 rpm a 39°C.

Substrato + fonte de nitrogênio	pH	Massa de fungo (mg)	Degradabilidade do substrato (%)
BC + Sulfato de Amônio	4,77 ^C	55,6 ^{AB}	41,75 ^B
BC + Ureia	7,44 ^A	44,00 ^{BC}	43,36 ^B
BD + Sulfato de Amônio	4,95 ^C	59,80 ^A	48,21 ^A
BD + Ureia	6,57 ^B	37,00 ^C	49,47 ^A
Coeficiente de variação (%)	21,75	17,08	8,15

Notas: Médias seguidas de letras diferentes nas colunas diferem entre si pelo Teste de Duncan ($P < 0,05$)

Sulfato de amônio promoveu maior acidificação do meio em relação à ureia em ambos os substratos e a fermentação com bagaço de cana apresentou menor valor de pH (Tabela 2), porém não se verificou diferença significativa ($P > 0,05$) nos valores de pH entre os substratos quando suplementados com sulfato de amônio.

Trichoderma longibrachiatum apresentou melhor crescimento quando suplementado com sulfato de amônio, sem diferença significativa entre os substratos. Na *B. decumbens*, quando suplementada com sulfato de amônio, o fungo apresentou crescimento 38% maior em comparação com a suplementação com ureia.

Observou-se a queda do pH nas primeiras 48 horas do processo fermentativo. No início, BC apresentou pH 5,61 quando suplementado com sulfato de amônio e pH 6,69 com a ureia. A BD na presença de sulfato de amônio apresentou pH inicial de 5,80 e pH 6,49 com a ureia. A

partir de 96 horas de fermentações, os meios contendo ureia tiveram um aumento considerável no pH (Figura 1.1).

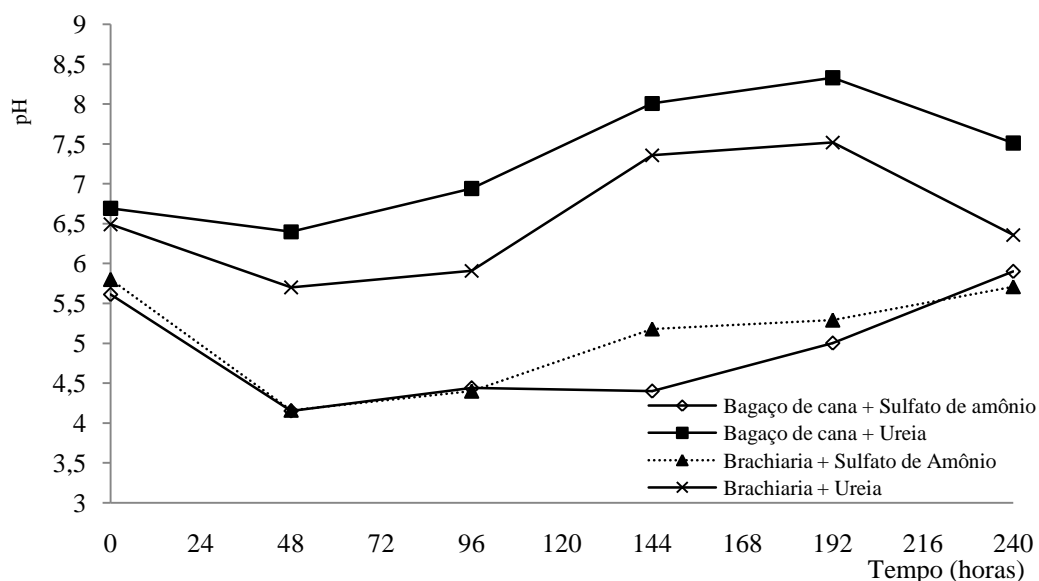


Figura 1.1: Valores de pH no decorrer do processo fermentativo por *Trichoderma longibrachiatum* com bagaço de cana e *Brachiaria decumbens* suplementados com sulfato de amônio ou ureia. Média dos valores observados nas fermentações, ensaios realizados em triplicata.

A biomassa fúngica foi maior no meio suplementado com sulfato de amônio, em ambos os substratos, não sendo possível diferenciá-los (Figura 1.2, $p > 0,05$).

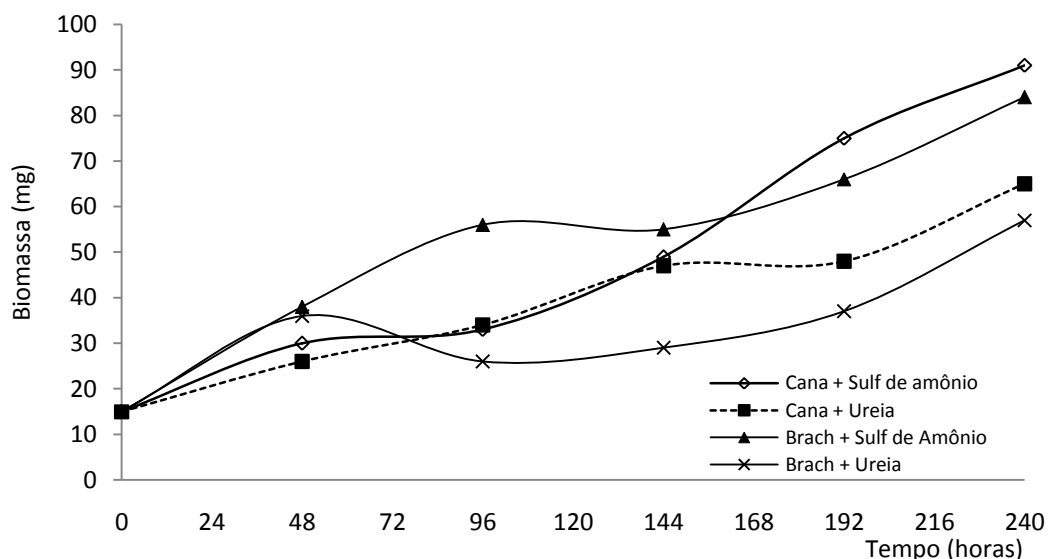


Figura 1.2: Crescimento de massa fúngica no decorrer do processo fermentativo por *Trichoderma longibrachiatum* com bagaço de cana e *Brachiaria decumbens* suplementados

com sulfato de amônio ou ureia. Média dos valores observados nas fermentações, ensaios realizados em triplicata.

Trichoderma longibrachiatum desenvolveu-se melhor no bagaço de cana suplementado com sulfato de amônio, entretanto não foi possível diferenciá-lo estatisticamente (Figura 1.2).

Dinâmica de produção de celulases por *Trichoderma longibrachiatum* em fermentação submersa de bagaço de cana e *Brachiaria decumbens* em dois sistemas de tampões

Verificou-se efeitos do tipo de substrato e dos tempos de fermentação para o pH final, produção de massa fúngica, taxa de degradação de substrato, produção de proteínas e enzimas do complexo celulolítico. O tipo de tampão utilizado e o pH inicial influenciaram no pH final e na taxa de degradação dos substratos.

pH FINAL

Após vinte e quatro horas de fermentação, o pH do meio diminuiu em relação ao pH inicial com exceção para as fermentações do bagaço de cana tamponado com fosfato de sódio (pH 6,8) (TABELA 3, $p < 0,05$).

Tabela 3: Valores médios de pH ao término do período de fermentação do bagaço de cana (BC) ou *Brachiaria decumbens* (BD) em meios tamponados com acetato de sódio (pH 4,5) ou fosfato de sódio (pH 6,8), incubados a 39°C

Substrato + pH	Períodos (dias)					
	1	2	4	6	8	10
BC pH 4,5	4,22 ^{Bb}	4,09 ^{Bb}	4,97 ^{Bb}	4,83 ^{Bb}	4,82 ^{Bb}	6,56 ^{Aa}
BC pH 6,8	5,60 ^{Ba}	6,71 ^{ABa}	5,63 ^{Bb}	7,02 ^{Aa}	6,44 ^{ABa}	6,60 ^{ABa}
BD pH 4,5	5,31 ^{ABa}	4,37 ^{Bb}	6,00 ^{Aab}	6,16 ^{Aa}	6,37 ^{Aa}	4,60 ^{Bb}
BD pH 6,8	6,18 ^{Aa}	6,61 ^{Aa}	6,96 ^{Aa}	6,94 ^{Aa}	6,61 ^{Aa}	6,57 ^{Aa}

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas, na coluna, e maiúsculas, nas linhas, não diferem entre si pelo teste de Tukey, considerando o valor nominal de 5% de significância.

Os meios tamponados com fosfato de sódio com pH inicial (6,8), para ambos os substratos, mantiveram médias de pH semelhantes ao longo dos períodos (Tabela 3, $p > 0,05$).

Nas fermentações em acetato de sódio (pH inicial 4,5) o pH final teve comportamento diferente para BD (Tabela 3, $p = 0,0012$) Com dez dias de fermentação de BD (pH 4,5) observou-se pH final menor que fermentações de BC (pH 4,5), sendo o pH final do meio com BC 45,77 % maior em relação ao inicial.

A interação entre os substratos e os tampões não foi significativa ($p=0,2994$), verificou-se aumento linear do pH para a fermentação do BC utilizando o tampão acetato de sódio com pH inicial 4,5 (Figura 1.3, $p<0,01$).

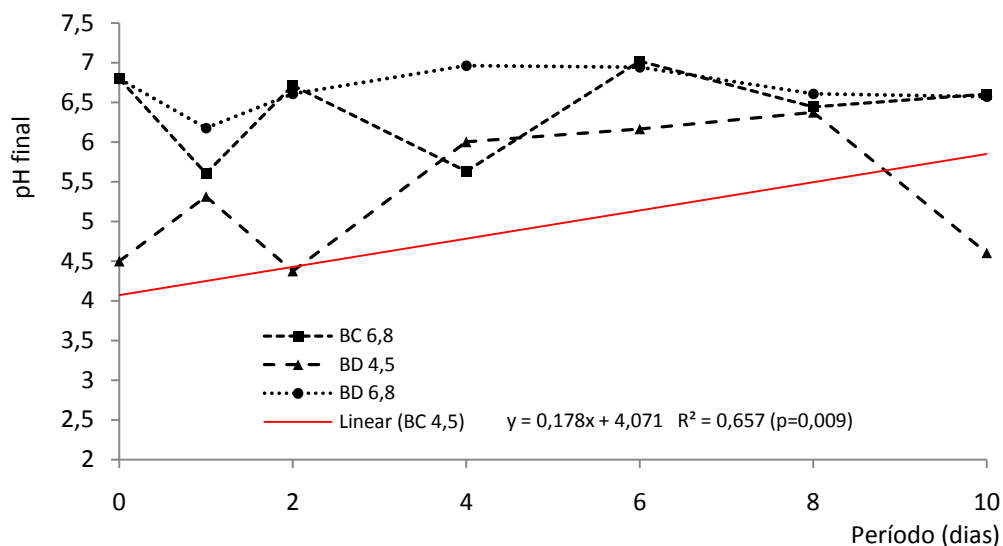


Figura 1.3: Comportamento do pH das fermentações de bagaço de cana (BC) ou *Brachiaria decumbens* (BD) por *Trichoderma longibrachiatum* em meios tamponados com acetato de sódio (pH 4,5) ou fosfato de sódio (pH 6,8) ao longo dos períodos de incubações.

MASSA FÚNGICA

Trichoderma longibrachiatum desenvolveu-se melhor tendo *B. decumbens* como substrato ($p<0,001$) em ambos tampões avaliados. Os tampões não influenciaram o crescimento do fungo. As biomassas fúngicas obtidas nos dois tampões foram iguais ($p=0,9698$).

Ao longo do tempo, os dois substratos promoveram biomassas semelhantes em ambos os tampões, não sendo possível diferenciá-los estatisticamente a 5 % de significância ($p=0,2567$). No décimo dia de incubação, *B. decumbens* promoveu o crescimento de 80,03 mg de massa fúngica em meio tamponado com fosfato de sódio, valor 48,36% superior a massa gerada nas primeiras vinte e quatro horas. Bagaço de cana com quatro dias de fermentação apresentou maiores valores de biomassa fúngica, porém, não foi possível diferenciá-los estatisticamente (Tabela 4).

Tabela 4: Valores médios de massa fúngica (mg) ao término das fermentações do bagaço de cana (BC) e *Brachiaria decumbens* (BD) em meios tamponados com acetato de sódio (pH 4,5) e fosfato de sódio (pH 6,8), incubados a 39°C

Substrato + pH	Períodos (dias)					
	1	2	4	6	8	10
BC pH 4,5	41,06	46,26	68,90	54,40	31,93	32,00
BC pH 6,8	39,87	31,67	52,27	44,27	41,13	36,00
BD pH 4,5	42,03	72,37	46,83	56,93	43,50	68,23
BD pH 6,8	41,33	48,13	51,83	73,70	63,17	80,03

Observou-se aumento linear para a massa fúngica utilizando BD tamponado com fosfato de sódio (pH 6,8) e efeito quadrático para o crescimento com BC em tampão com acetato de sódio (pH 4,5) (Figura 1.4, $p < 0,01$).

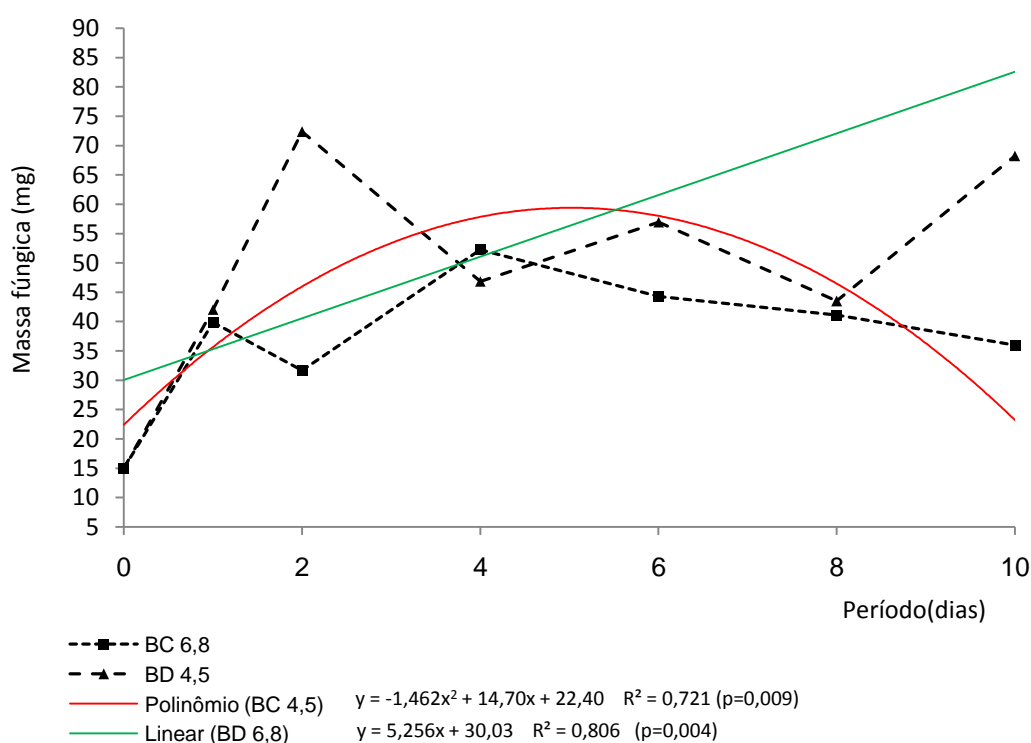


Figura 1.4: Massa de *Trichoderma longibrachiatum* (mg) em fermentações com bagaço de cana ou *Brachiaria decumbens* em meios tamponados com acetato de sódio (pH 4,5) ou fosfato de sódio (pH 6,8) ao longo de dez dias.

A equação linear $y = 2,757X + 12,65$ foi a que mais se ajustou para expressar os dados da *B. decumbens* no tampão acetato de sódio (pH 4,5), sendo o modelo estatisticamente significativo ($p=0,0230$). Para a *B. decumbens* em tampão fosfato, a regressão não foi

significativa ($p= 0,057$). Para o bagaço de cana, em ambos os tampões, o modelo linear foi o que melhor se ajustou para expressar os dados os valores de degradação em função do tempo (Figura 1.5).

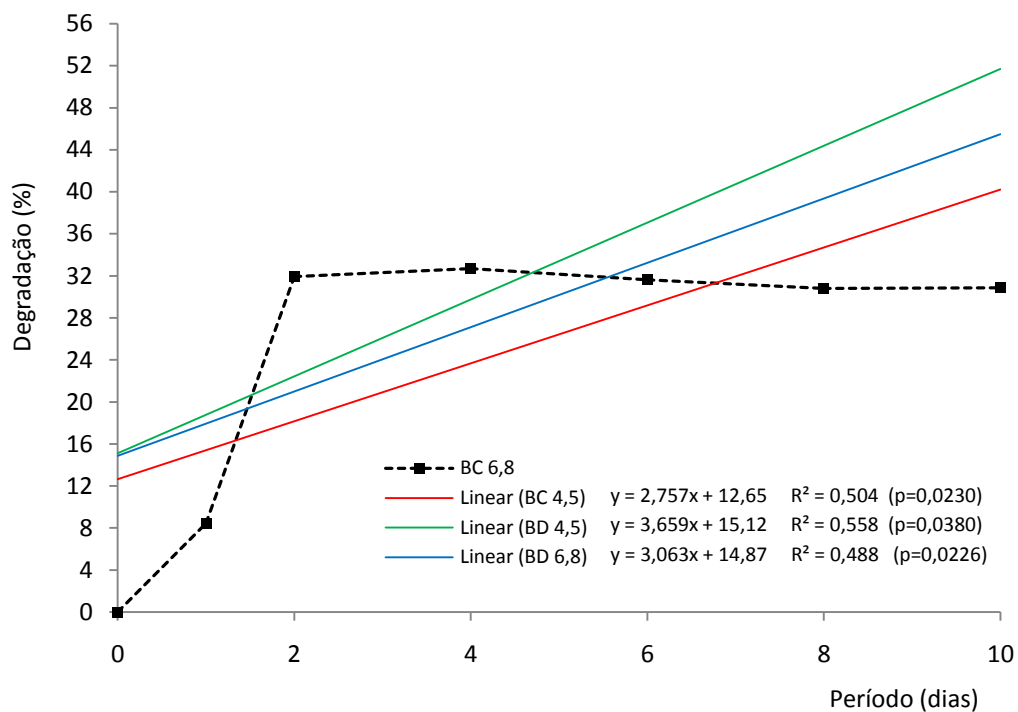


Figura 1.5: Valores médios das degradações dos substratos bagaço de cana (BC) e *Brachiaria decumbens* (BD) fermentados em meios tamponados com acetato de sódio ou fosfato de sódio por *T. longibrachiatum* ao longo de dez dias de fermentação.

PROTEÍNA TOTAL

Os teores de proteínas nos meios contendo *B. decumbens* foram 17,44% maiores em relação ao bagaço de cana (Tabela 5, $p < 0,05$). Entretanto, não foram influenciados pelos tampões e pH iniciais.

Tabela 5: Teores de proteína total ($\mu\text{g/mL}$) ao término do período de fermentação do bagaço de cana (BC) e *Brachiaria decumbens* (BD) em meios tamponados com acetato de sódio (pH 4,5) e fosfato de sódio (pH 6,8), incubados a 39°C.

Substrato + pH	Períodos (dias)					
	1	2	4	6	8	10
BC pH 4,5	10,52 Ab	10,73 Aa	10,81 Aab	15,32 Ab	25,77 Aa	27,82 Aa
BC pH 6,8	8,18 Bb	22,73 ABa	25,26 ABa	35,84 Aa	34,14 Aa	19,49 ABa
BD pH 4,5	44,50 Aa	12,39 Ca	23,61 BCa	22,60 BCab	30,78 ABa	20,59 BCa
BD pH 6,8	23,89 ABb	25,61 Aa	7,39 Bb	24,69 ABab	31,93 Aa	30,70 Aa

Médias seguidas pela mesma letra minúscula, na coluna, e médias seguidas pela mesma letra maiúscula, na linha, não diferem entre si pelo teste de Duncan, considerando 5% de significância (CV 31,98%).

A fermentação com *B. decumbens* em tampão acetato apresentou maior teor de proteína no primeiro período ($p=0,0027$). Para os demais tratamentos os maiores teores de proteína foram observados com seis dias de fermentação ($p=0,0027$). As fermentações com bagaço de cana em tampão acetato apresentou teores de proteínas semelhantes ao longo dos períodos (Figura 1.6).

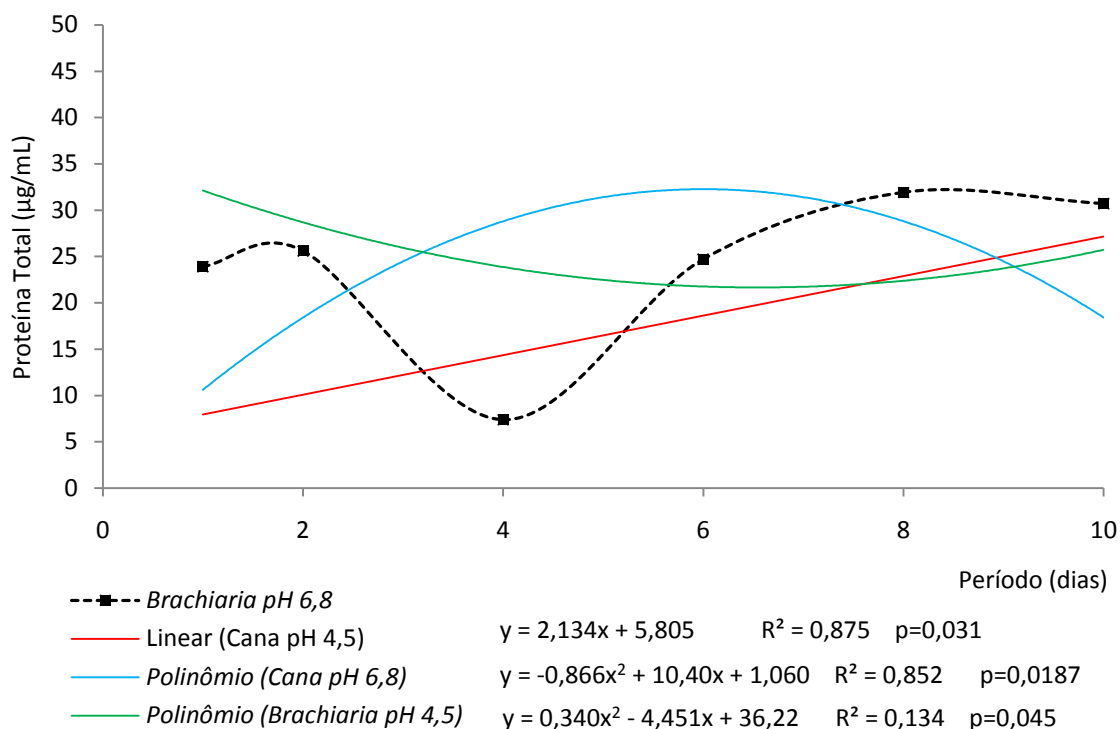


Figura 1.6: Valores médios dos teores de proteínas nos extratos de bagaço de cana (BC) e *Brachiaria decumbens* (BD) fermentados em meios tamponados com acetato de sódio ou fosfato de sódio por *T. longibrachiatum* ao longo de dez dias de fermentação.

QUANTIFICAÇÃO DE ENZIMAS CELULOLÍTICAS

CELULASE TOTAL

O melhor substrato para produção de celulases totais por fermentação submersa do fungo *T. longibrachiatum* foi a *B. decumbens* (Tabela 6, $p < 0,0044$). Entretanto, pH inicial e o tipo de tampão do meio fermentativo não influenciaram na liberação de ART pelas celulases totais ($p > 0,05$).

Tabela 6: Média de açúcares redutores ($\mu\text{mol/L}$) liberados pela ação das celulases totais produzidas por *T. longibrachiatum* após dez dias de fermentação do bagaço de cana (BC) ou *Brachiaria decumbens* (BD) em meios tamponados com acetato de sódio (pH 4,5) ou fosfato de sódio (pH 6,8), incubados a 39°C.

Substrato	Tampões		Média
	pH 4,5	pH 6,8	
BC	1.113,85	998,52	1.051,85 ^B
BD	1.355,62	1.248,92	1.302,27 ^A

Letras diferentes na coluna indicam diferença significativa entre os substratos avaliados (Teste de Tukey, $p < 0,01$).

Ao longo dos períodos de fermentação as celulases totais liberaram maiores teores de ART com a *B. decumbens*, apenas no quarto dia de fermentação que as celulases totais liberam maiores teores de ART utilizando o bagaço de cana (Figura 1.7).

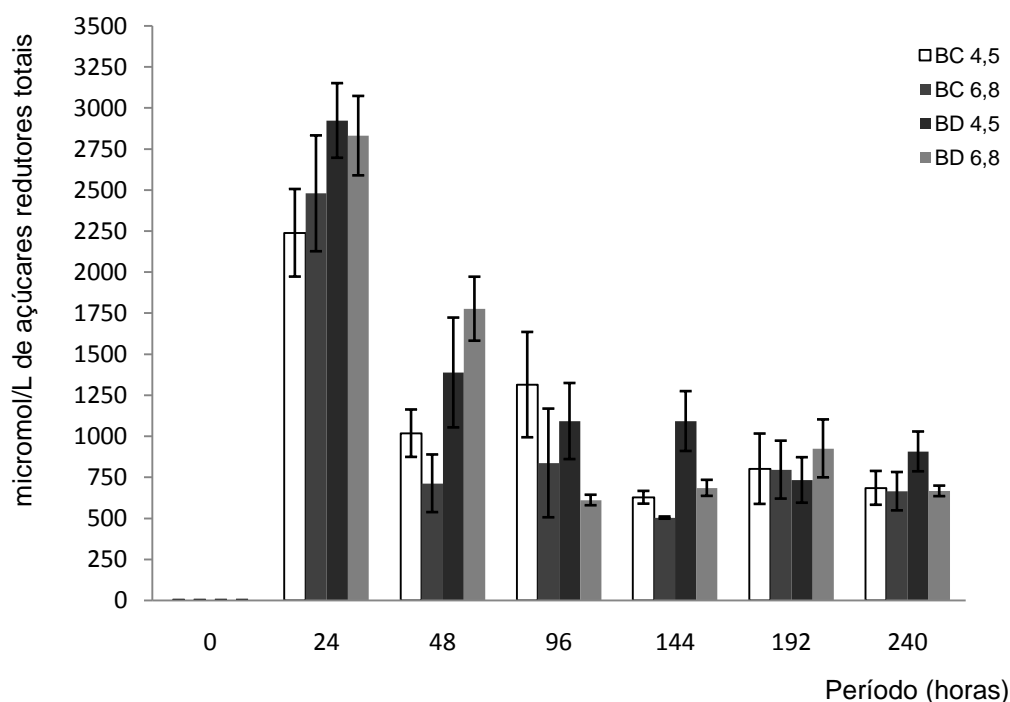


Figura 1.7: Açúcares redutores totais liberados pela ação das celulases totais produzidas durante as fermentações de bagaço de cana (BC) ou *Brachiaria decumbens* (BD) por *T. longibrachiatum* em meios com pHs iniciais diferentes.

CARBOXIMETILCELULASE

O melhor substrato para produção de carboximetilcelulases pela fermentação submersa do fungo *T. longibrachiatum* foi *B. decumbens*. (Figura 1.8, $p < 0,0001$). O pH do meio fermentativo não influenciou ($p = 0,5128$) na liberação de ART pelas carboximetilcelulases.

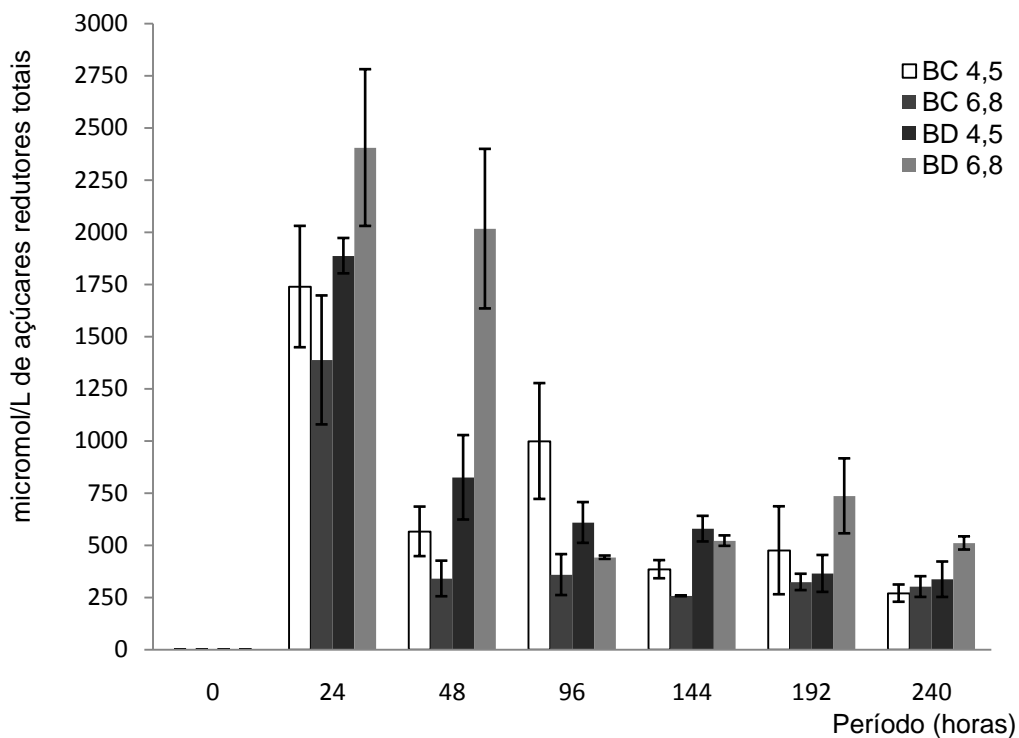


Figura 1.8: Açúcares redutores totais liberados pela ação das carboximetilcelulases produzidas durante as fermentações de bagaço de cana (BC) ou *Brachiaria decumbens* (BD) por *T. longibrachiatum* em meios com pHs iniciais diferentes.

Os ART liberados pelas carboximetilcelulases variaram ao longo dos períodos de fermentação ($p < 0,0001$), sendo o primeiro dia o período de maior atividade, liberando cerca de 50% a mais ART em relação ao segundo dia de fermentação. A produção dessa enzima foi diminuindo ao longo dos períodos de fermentação, no primeiro dia liberou em média 1.854,87 $\mu\text{mol/L}$ de ART ao final do décimo dia a quantidade foi 80% menor.

A interação entre o substrato, tampão e o período não foi significativa ($p = 0,0905$) para os ART liberados pelas carboximetilcelulases. Em todos os tratamentos avaliados, o extrato enzimático obtido com um dia de fermentação promoveu maior liberação de ART, não sendo possível diferenciar, estatisticamente, qual substrato e pH inicial foi o melhor (Tabela 7). Os demais períodos diminuíram gradativamente a quantidade de ART liberado, não sendo possível identificar em qual substrato e pH inicial o extrato enzimático fora o mais eficiente dentro de cada período (Tabela 7).

Tabela 7: Média de açúcares redutores totais ($\mu\text{mol/L}$) liberados pela ação das carboximetilcelulases produzidas por *T. longibrachiatum* após dez dias de fermentação do bagaço de cana (BC) e *Brachiaria decumbens* (BD) em meios tamponados com acetato de sódio (pH 4,5) e fosfato de sódio (pH 6,8), incubados a 39°C

Substrato + pH	Períodos (dias)					
	1	2	4	6	8	10
BC pH 4,5	1.739,23	566,18	999,13	384,85	475,51	270,13
BC pH 6,8	1.387,69	340,45	358,95	257,18	323,79	301,59
BD pH 4,5	1.887,25	825,21	608,73	579,13	364,50	336,74
BD pH 6,8	2.405,32	2.016,77	442,21	521,77	736,40	510,67

AVICELASE

O melhor substrato para produção de avicelases pela fermentação submersa do fungo *T. longibrachiatum* foi a *B. decumbens*. As avicelases presentes nos extratos enzimáticos das fermentações com *B. decumbens* foram 37,80% mais eficientes ($p < 0,0001$) em liberar ART comparando-se com as fermentações do bagaço de cana. Assim como na atividade das outras enzimas avaliadas, o pH do meio fermentativo não influenciou ($p = 0,0508$) na liberação de ART pelas avicelases.

A interação entre o substrato, tampão e o período não foi significativa ($p = 0,5039$) para os ART liberados pelas avicelases. Em todos os meios fermentativos avaliados, o extrato enzimático obtido com um dia de fermentação promoveu maior liberação de ART, não sendo possível diferenciar, estatisticamente a 5% de probabilidade, qual tratamento foi o melhor (Tabela 8).

Tabela 8: Média de açúcares redutores totais ($\mu\text{mol/L}$) liberados pela ação das avicelases produzidas por *T. longibrachiatum* após dez dias de fermentação do bagaço de cana (BC) e *Brachiaria decumbens* (BD) em meios tamponados com acetato de sódio (pH 4,5) e fosfato de sódio (pH 6,8), incubados a 39°C.

Substrato + pH	Períodos (dias)					
	1	2	4	6	8	10
BC pH 4,5	1.461,70	333,04	684,59	148,02	314,54	185,02
BC pH 6,8	1.924,26	370,05	481,06	92,51	351,55	166,52
BD pH 4,5	2.090,78	740,10	647,59	444,06	259,03	296,04
BD pH 6,8	2.553,34	1.350,68	370,05	351,55	999,13	370,05

O melhor substrato para produção de avicelases pela fermentação submersa do fungo *T. longibrachiatum* foi *B. decumbens*. (Figura 1.9, $p < 0,0001$).

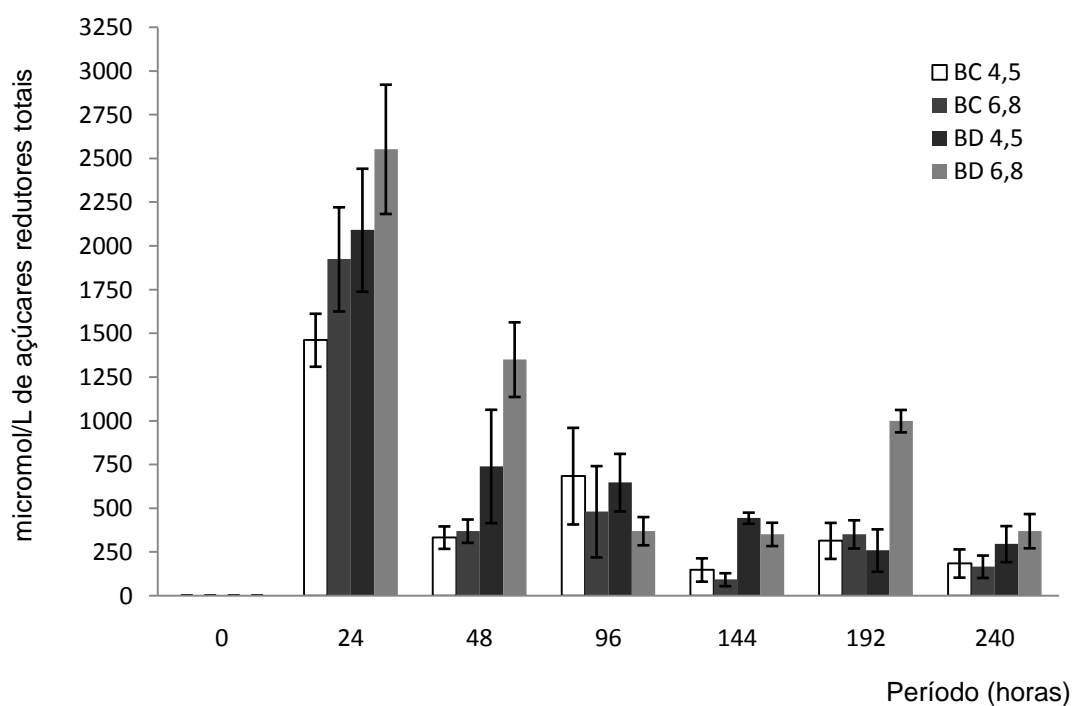


Figura 1.9: Açúcares redutores totais liberados pela ação das avicelases produzidas durante as fermentações de bagaço de cana (BC) ou *Brachiaria decumbens* (BD) por *T. longibrachiatum* em meios com pHs iniciais diferentes.

DISCUSSÃO

Efeitos da fonte de nitrogênio em fermentações de *Brachiaria decumbens* e bagaço de cana por *Trichoderma longibrachiatum*

No primeiro experimento utilizou-se pH inicial entre 5,5 e 6,5, sem adição de tampões para observar a variação natural no pH durante os períodos de fermentação. Observou-se diminuição dos valores de pH em todos os meios nas primeiras 48 horas de fermentação, indicando atividade fermentativa do isolado de *T. longibrachiatum*. Chahal et al. [31] atribuíram a essa diminuição de pH à produção de moléculas ácidas pelo fungo.

Ao longo dos períodos de fermentação, os valores de pH estiveram entre 4 e 6,7 e de acordo com Kubicek e Harman [32] o crescimento ótimo de fungos lignocelulósicos encontra-se no intervalo de pH entre 4 e 6,5. Para o gênero *Trichoderma* essa faixa ocorre entre pH 4 e 5, sendo que apenas algumas espécies suportam valores de pH abaixo de 3 [31].

O sulfato de amônio promoveu melhor crescimento de *T. longibrachiatum* ($p < 0,05$), justificando o uso desse nutriente no experimento 2. Possivelmente o fornecimento de enxofre por esse substrato poderia contribuir para melhor biossíntese de aminoácidos e proteína do fungo, favorecendo o desenvolvimento e produção de micélios. O sulfato de amônio pode provocar também diminuições nos valores de pH, favorecendo o crescimento [33].

O isolado selecionado de *T. longibrachiatum* foi mais eficiente em hidrolisar *B. decumbens*, visto que esse substrato apresentou maiores valores de proteína bruta, extrato etéreo e minerais quando comparado ao bagaço de cana.

Dinâmica de produção de celulasas por *Trichoderma longibrachiatum* em fermentação submersa de bagaço de cana e *Brachiaria decumbens* em dois sistemas de tampões

Crescimento fúngico e degradação dos substratos

Nesse segundo experimento, o fungo foi 19% mais eficiente em degradar *B. decumbens*. A cepa utilizada neste experimento foi extraída do rúmen de bovinos alimentados com este substrato, sugerindo melhor adaptação pelo fungo para degradar esse substrato lignocelulósico. Em meio tamponado com acetato de sódio (pH 4,5), o fungo foi eficiente em degradar ambos os substratos, embora essas condições não sejam vivenciadas em animais ruminantes, cujo pH ideal no ambiente ruminal varia entre 5,5 e 7 [34]. Para manter esses valores de pH, os ruminantes dependem de agentes tamponantes, como os sais a base de carbonatos e os consegue pela saliva, que é rica em bicarbonato de sódio (pH 8,1) [35].

Com dois dias de fermentação o fungo foi capaz de degradar 36,35% dos substratos, não sendo observadas diferenças significativas nos demais períodos, para ambos os substratos. Essas taxas poderão ser justificadas pelas composições dos substratos e suas naturezas cristalinas que dificultam o acesso do fungo para uma melhor degradação. O isolado foi adicionado na fermentação já em crescimento logarítmico, com grande expressão de enzimas, dessa forma o máximo degrado pelo isolado ocorreu com 48 hs de fermentação.

As maiores taxas de crescimento fúngico foram observadas com dois a seis dias de incubação, variando de 49,60 a 57,32 mg. Em termos práticos, o período de fermentação poderia ser reduzido para 48 hs, uma vez que o maior tempo de incubação não promoveu maior produção de massa fúngica ou maiores taxas de degradação dos substratos.

Produção de proteínas

Trichoderma longibrachiatum quando inoculado em fermentação submersa de bagaço de cana, em meio tamponado com acetato de sódio (pH 4,5) promovem maior concentração de proteína que foi 30,78 % maior em relação meio com fosfato de potássio (pH 6,8). As pesquisas indicam que fungos lignocelulósicos desenvolvem melhor em meio ácidos [31], justificando a melhor produção proteica. Entretanto, os tampões não influenciaram os teores de proteínas nas fermentações com *B. decumbens*.

Produção de celulasas

Diversos pesquisadores têm investigado a utilização de materiais lignocelulósicos como substrato em processos fermentativos para produção de enzimas. Alguns substratos lignocelulósicos tem sido frequentemente utilizados, como por exemplo, farelo de trigo [36-37], farelo de arroz [38], bagaço de cana [39-40], palha de arroz [41], palha de cana, sabugo de milho e folhas secas [42] e a casca do coco verde [43]. Essas pesquisas mostram o potencial de materiais lignocelulósicos, considerados como resíduos, têm em se transformarem em bioprodutos, principalmente enzimas, e serem destinados as mais diversas áreas industriais.

A utilização de enzimas como suplementação animal vem sendo amplamente discutida na literatura, tornando-se alternativa importante no agronegócio. As enzimas incorporadas à ração são responsáveis por iniciar a degradação dos carboidratos estruturais dos volumosos e complementar as atividades enzimáticas associadas aos microrganismos ruminais [44]. Pesquisas têm constatado que enzimas exógenas podem tornar a fibra vegetal mais solúvel ou mais disponível ao ataque microbiano no rúmen, favorecendo a degradação [45-46-47]. Outro setor que tem utilizado a adição de celulasas é o de biocombustíveis para a sacarificação de resíduos lignocelulósicos, com a posterior produção de etanol

Neste experimento as dosagens enzimáticas demonstraram que os coquetéis celulolíticos exerceram atividades hidrolíticas sobre o substrato, com pico máximo de liberação de ART nas primeiras 24 horas de fermentação. Após esse período, observou-se decréscimo nas curvas de ART para todas as enzimas dosadas. Provavelmente o microrganismo tenha consumido o ART durante a fase inicial de crescimento, estabilizando no decorrer das fermentações. Song e Wei [48] observaram o mesmo comportamento de uma linhagem fúngica não reportada, em relação liberação de ART por ação de celulasas, em fase inicial de crescimento.

Em fermentação submersa de diversos materiais lignocelulósicos constatou-se também que a maioria dos compostos enzimáticos promoveu liberação de AR no primeiro contato com

o substrato. O complexo enzimático testado e o substrato utilizado foram variáveis dependentes para a liberação de ART [49].

Pesquisas relacionadas à degradação ruminal de forragens, constataram que o período mais ativo para os efeitos das celulases são de 6-12 horas do início do processo digestivo, não sendo observados valores significativos após períodos de incubação ruminal prolongados [46-50]. Dessa forma, o isolado avaliado neste estudo apresentou comportamento satisfatório para a velocidade fisiológica de degradação de fibras que ocorre com o máximo de três a seis dias [51-52].

Neste presente estudo, após 24 horas de fermentação houve queda da produtividade das enzimas avaliadas e isso poderia ser atribuída à escassez de nutrientes dos meios fermentativos utilizados. Em outra pesquisa, a queda de produtividade das enzimas foi atribuída ao acúmulo de metabólitos secundários produzidos por *T. longibrachiatum*, ou ainda a escassez de nutrientes para o crescimento ou inibição pelo acúmulo de glicose no meio [53].

O formato de crescimento dos fungos em meios fermentativos interfere diretamente na síntese das enzimas [54]. Em fermentação submersa, fungos filamentosos crescem sob a forma de *pellets* ou dispersos no meio [55-56]. Esses autores apontam que a morfologia influencia diretamente a produtividade de enzimas. Neste experimento, observou-se a formação de *pellets* (aglomerado de células) que poderia limitar o crescimento. Segundo alguns autores, dentro dos *pellets* a transferência de oxigênio é limitada, diminuindo a produtividade de enzimas celulolíticas [55-56].

Celulases totais

Observou-se em 24 horas a produção máxima de celulases e que o isolado avaliado de *T. longibrachiatum* com as condições de fermentações descritas neste trabalho, possui grande potencial para a rápida produção de enzimas celulolíticas. Para diferentes linhagens de *Aspergillus niger*, a produção de celulases foram maiores com 72 horas de fermentação [57].

Nesta pesquisa, as dosagens de celulases foram realizadas em pH 6,8 a 39°C, visto que as enzimas para serem utilizadas na dieta de ruminantes devem ser estáveis a variações de temperatura entre 39 e 42°C, uma vez que esta é a faixa de temperatura do rúmen, principal órgão de digestão dos ruminantes [51]. Nessas condições, os coquetéis exerceram atividades hidrolíticas para ambos os substratos e as celulases produzidas na fermentação de *B. decumbens* foram 19,23% mais eficientes em liberar ART que aquelas produzidas em fermentações de bagaço de cana. Indicando o potencial de utilização desse volumoso para produção de coquetéis enzimáticos como suplementação alimentar para ruminantes.

Carboximetilcelulases

As carboximetilcelulases apresentaram baixas atividades, sendo que a maior concentração foi observada na fermentação com *B. decumbens* 0,143 U.mL⁻¹ em 24 horas de fermentação. As enzimas carboximetilcelulase e avicelase atuam sinergicamente na degradação da celulose [58]. Celulose é composta por estruturas cristalinas e amorfas, sendo

as estruturas cristalinas mais resistentes à degradação microbiana [59]. Estudos realizados por Silva [60] demonstraram que bagaço de cana não foi uma boa fonte de carbono para a produção de enzimas celulolíticas pelas linhagens do gênero *Pleurotus*.

A comparação destes resultados com a literatura é prejudicada devido às diferenças no tipo de substrato, de microrganismo e das condições de cultivo utilizadas. Silva et al. [61] isolaram de canaviais uma linhagem de *Trichoderma* sp. que apresentou atividade de carboximetilcelulase de $0,0046 \text{ U.mL}^{-1}$, nesta presente pesquisa, constatou-se maior produção, ($0,148 \text{ U.mL}^{-1}$), utilizando o bagaço de cana em fermentação submersa nas primeiras 24 horas de fermentação.

Uma pesquisa utilizando a linhagem T676 de *Trichoderma reesei* registraram atividade celulolítica total de $0,042 \text{ U.mL}^{-1}$, empregando bagaço de cana-de-açúcar como substrato [62], valores inferiores aos apresentados neste trabalho.

Avicelases

As dosagens de avicelases foram determinadas utilizando a celulose microcristalina como substrato a ser degradado pelos coquetéis enzimáticos, esse substrato tem como característica ser insolúvel, possuir alta organização estrutural, baixo grau de polimerização e grande disponibilidade de terminais redutores e não redutores. Tais características tornam a celulose microcristalina um substrato difícil de ser hidrolisado em fermentações submersas.

Em outro estudo, a avicelase do fungo *Thermoascus aurantiacus* em fermentação sólida sobre o bagaço de cana, apresentou concentração de $0,6 \text{ U.mL}^{-1}$ [63]. Neste experimento, o isolado de *T. longibrachiatum*, em fermentação submersa desse substrato, apresentou valor máximo de produção de $0,11 \text{ U.mL}^{-1}$. Entretanto, sabe-se que a fermentação sólida apresenta extratos enzimáticos com rendimentos melhores em relação à fermentação submersa [64].

CONCLUSÃO

O isolado de *Trichoderma longibrachiatum* proveniente do rúmen bovino desenvolve-se melhor em meio fermentativo com sulfato de amônio em comparação à ureia e apresenta melhor degradação de *Brachiaria decumbens* em comparação a hidrólise do bagaço de cana.

Na fermentação do bagaço de cana o isolado avaliado promove melhor síntese proteica em meio com pH inicial 4,5, tamponado com acetato de sódio. Entretanto, os meios contendo *B. decumbens* produzem maiores concentrações de celulasas que aqueles com bagaço de cana e as maiores liberações de açúcares redutores por celulasas totais, carboximetilcelulasas ou avicelases são observadas com 24 hs de fermentação.

5- CONSIDERAÇÕES FINAIS

A produção de celulases pelo isolado de *T. longibrachiatum* e suas aplicações na hidrólise de materiais lignocelulósicos são promissoras. Futuros estudos, considerando um enriquecimento do meio de cultivo, poderão maximizar essa produção, favorecendo a produção desses complexos enzimáticos em escala industrial.

6 - REFERÊNCIAS

1. Stewart CS. Plant-animal and microbial interactions in ruminant fiber degradation In, Prins RA, Stewart CS (Eds) Microorganisms in ruminant nutrition Dalfsen, Nottingham University Press. 1994;cap 2, p.13-28.
2. Oliveira JS, Zanine AM and Santos EM. Diversidade microbiana no ecossistema ruminal. Rev Eletr Vet. 2007;8:1-12.
3. Juhász, T.; Szengyel, Z.; Réczey, K.; Siika-Aho, M.; Viikari, L. Characterization of cellulases and hemicellulases produced by *Trichoderma reesei* on various carbon sources. Process Biochemistry, v. 40, p. 3519–3525, 2005.
4. CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Acompanhamento da safra Brasileira. Cana-de-açúcar. Primeiro levantamento. Brasília: Conab, V2, safra 2016/17, n 1, 2016. p 1-66.
5. Cruz, S., H. Bagaço e palha da cana são fontes de celulose para gerar álcool. São Paulo: Visão agrícola nº 8, 2008. p13.
6. Alvim, M. J.; Botrel, M. A.; Xavier, D. F. As principais espécies de *Brachiaria* utilizadas no país. Juiz de Fora: Embrapa Gado de leite, 2002. 4p. (Embrapa Gado de leite. Comunicado Técnico, 22).
7. Cerdà, A. R. Fermentación Ruminal, Degradación Protéica y Sincronización Energía-Proteína en Terneras en Cebo Intenso. Tese (Doutorado em Produção Animal) – Universitat Autònoma de Barcelona, Espanha, 196 f., 2003.
8. Wallace RJ. Ruminant microbiology biotechnology and ruminant nutrition, progress and problems. J Anim Sci. 1994;72:2992-3003.
9. Paul SS, Kamra DN, Sastry VRB, Sahu NP and Agarwal N. Effect of anaerobic fungi on *in vitro* feed digestion by mixed rumen microflora of buffalo. Reprod Nutr Develop. 2004;44:313-319.
10. Kung L, Treacher R, Nauman G, Smagala A, Endres K and Cohen M. The effect of treating forages with fibrolytic enzymes on its nutritive value and lactation performance of dairy cows. J Dairy Sci. 2000;83:115-122.
11. Yang WZ, Beauchemin KA and Rode LM. A comparison of methods of adding fibrolytic enzymes to lactating cow diets. J Dairy Sci. 2000;83:2512-2520.
12. Abrão FO, Duarte ER., Freitas CES, Vieira EA, Geraseev LC, Silva-Hughes AF, Rosa CA and Rodrigues NM. Characterization of fungi from ruminal fluid of beef cattle with different ages and raised in tropical lignified pastures. Curr Microbiol. 2014;69:649-659.
13. Castro, A.M. de; Pereira Júnior, N. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. Química Nova, v.33, p.181-188, 2010.
14. Sharma N, Kaushal R, Gupta R, Kumar S. A biodegradation study of forest biomass by *Aspergillus niger* F7, correlation between enzymatic activity hydrolytic percentage and biodegradation index. Braz J Microbiol. 2012;1:467-475.

15. Siqueira, F.G. de; Siqueira, L.G. de; Jaramillo, P.M.D.; Silveira, M.H.L.; Andreus, J.; Couto, F.A.; Batista, L.R.; Ferreira FILHO, E.X. The potential of agro-industrial residues for production of holocellulase from filamentous fungi. *International Biodeterioration and Biodegradation*, v.64, p.20-26, 2010.
16. Singh, R.; Varma, A.J.; Laxman, R.S.; Rao, M. Hydrolysis of cellulose derived from steam exploded bagasse by *Penicillium* cellulases: comparison with commercial cellulose. *Bioresource Technology*, v.100, p.6679-6681, 2009.
17. Castro, A.M. de; Carvalho, M.L. de A. de; Leite, S.G.F.; Pereira Júnior, N. Cellulases from *Penicillium funiculosum*: production, properties and application to cellulose hydrolysis. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v.37, p.151-158, 2010.
18. Maeda, R.N.; Serpa, V.I.; Rocha, V.A.L.; Mesquita, R.A.A.; Santa Anna, L.M.M.; Castro, A.M. de; Driemeier, C.E.; Pereira Junior, N.; Polikarpov, I. Enzymatic hydrolysis of pretreated sugar cane bagasse using *Penicillium funiculosum* and *Trichoderma harzianum* cellulases. *Process Biochemistry*, v.46, p.1196-1201, 2011.
19. Singhania, R. R.; Sukumarana, R. K.; Patelb, A. K.; Larrocheb, C.; Pandey, A. Advancement and comparative profiles in the production Technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 46, p. 541-549, 2010.
20. Rosa LH, Vaz ABM, Caligiorne RB, Campolina S and Rosa CA. Endophytic fungi associated with the Antarctic grass *Deschampsia antarctica* Desv (*Poaceae*). *Polar Biol.* 2009;32:161-167.
21. White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis M. A., Gelfand D. H., Sninsky J. J., White T. J. (eds) *PCR protocols, a guide to methods and applications*. Academic Press San Diego. 1990;pp 315-322.
22. Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zheng Zhang JZ, Miller W. and Lipman DJ. Gapped BLAST nad PSI-BLAST, a new generation of protein database search programs. *Nucl Aci Res.* 1997;25:3389-3402.
23. Castellani A. Viability of some pathogenic fungi in distilled water. *J Trop Med Hyg.* 1939;42:225-226.
24. AOAC. *Official methods of analysis of the Association Analytical Chemists*. 18.ed. Gaithersburg, Maryland, 2005.
25. Rizzatti ACS, Jorge JA, Terenzi HF, Rechia CGV, Polizeli MLTM (2001) Purification and properties of a thermostable extracellular β -D-xylosidase produced by a thermotolerant *Aspergillus phoenicis*. *J Ind Microbiol Biotechnol*, v.26, p.156–160
26. Bradford MM. A dye binding assay for protein. *Anal Bioch.* 1976;72:248-254.
27. Ghose, T. K. *Measurement of cellulase activities*. New Delhi: Indian Institute of Technology, 1987.
28. Miller, G.L. Use of de dinitrosalicylic acid reagent of determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, v.31, p.426-428, 1959.

29. Wood, T.M.; Bath, M.K. In: W.A. Wood and S.T. Kellogg. *Methods in Enzymology*, v. 160, p. 87-112, 1988.
30. SAEG - Sistema para Análises Estatísticas, Versão 9.1: Fundação Arthur Bernardes - UFV - Viçosa, 2007.
31. Chahal, P.D.; Chahal, D.S.; Andre, G. (1992). Cellulase production profile of *Trichoderma reesei* on different cellulosic substrates at various pH levels. *J. Ferment. Bioeng.* 74: 126-128.
32. Kubicek, C. P.; Harman, G. E. *Trichoderma and Gliocladium: Basic biology, taxonomy and genetics* - Volume 1. 1 Ed., Londres, 1998.
33. Schmidell, W.; Facciotti, M.C.R. (2001). Biorreatores e processos fermentativos. In: Schmidell, W.; Lima, U.A.; Aquarone, E.; Borzani, W. (Coord.). *Biotecnologia industrial*. Vol. 2. São Paulo: Edgard Blücher. pp 179-192.
34. Furlan, R. L.; Macari, M.; Faria Filho, D. E. Anatomia e fisiologia do trato gastrointestinal. IN: *Nutrição de Ruminantes*. Jaboticabal: Funep, 583p.2006.
35. Berchielli, T. T.; PIRES, A. V.; OLIVEIRA, S. G. *Nutrição de Ruminantes*. Jaboticabal: Funep, 2006
36. Roopesh, K.; Ramachandran, S.; Nampoothiri, K. M.; Szakacs, G.; Pandey, A. Comparison of phytase production on wheat bran and oilcakes in solid-state fermentation by *Mucor racemosus*. *Bioresource Technology*, v. 97, n. 3, p. 506-511, 2006.
37. Gomathi, D.; Muthulakshmi, C.; Kumar, D. G.; Ravikumar, G.; Kalaiselvi, M.; Uma, C. Submerged fermentation of wheat bran by *Aspergillus flavus* for production and characterization of carboxy methyl cellulose. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, v. 2, n. 1, p. S67-S73. 2012.
38. Ng, I. S.; Li, C. W.; Chan, S. P.; Chir, J. L.; Chen, P. T.; Tong, C. G.; Yu, S. M.; Ho, T. H. D. High-level production of a thermoacidophilic β -glucosidase from *Penicillium citrinum* YS40-5 by solid-state fermentation with rice bran. *Bioresource Technology*, v. 101, n. 4, p. 1310-1317, 2010.
39. Cunha, F. M.; Esperança, M. N.; Zangirolami, T. C.; Badino, A. C.; Farinas, C. S. Sequential solid-state and submerged cultivation of *Aspergillus niger* on sugarcane bagasse for the production of cellulose. *Bioresource Technology*, v. 112, p. 270-274, 2012.
40. Karp, S. G.; Faraco, V.; Amore, A.; Birolo, L.; Giangrande, C.; Soccol, V. T.; Pandey, A.; Soccol, C. R. Characterization of laccase isoforms produced by *Pleurotus ostreatus* in solid state fermentation of sugarcane bagasse. *Bioresource Technology*, v. 114, p. 735-739, 2012.
41. Sharma, R. K.; Arora, D. S. Solid state degradation of paddy straw by *Phlebia floridensis* in the presence of different supplements for improving its nutritive status. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 65, p. 990-996, 2011.
42. Kumar, N. S. M.; Ramasamy, R.; Manonmani, H. K. Production and optimization of l-asparaginase from *Cladosporium* sp. using agricultural residues in solid state fermentation. *Industrial Crops and Products*, v. 43, p. 150-158, 2013.

43. Oliveira, S. L. R. Aproveitamento da casca do coco verde (*Cocos nucifera* L.) para produção de celulases. 2010. 81f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2010.
44. Polizeli, M.L., Rizzatti, A.C., Monti, R., Terenzi, H.F., Jorge J.A., Amorim, D.S. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 67: 577-591, 2005.
45. Dawson, K.A.; Tricarico, J.M. The use of exogenous fibrolytic enzymes to enhance microbial activities in the rumen and the performance of ruminant animals. Disponível em: <http://en.engormix.com/Articles/View.aspx?id=695>.
46. Hristov, A.N.; McAllister, T.A.; Cheng, K.-J. Intraruminal supplementation with increasing levels of exogenous polysaccharide-degrading enzymes: effects on nutrient digestion in cattle fed barley grain diets. *Journal of Animal Science*, v.78, p.477-487, 2000.
47. Morgavi, D.P.; Beauchemin, K.A.; Nsereko, V.L. et al. Synergy between ruminal fibrolytic enzymes and enzymes from *Trichoderma longibrachiatum*. *Journal of Dairy Science*, v.83, p.1310-1321, 2000.
48. Song, J.; Wei, D. Production and characterization of cellulases and xylanases of *Cellulosimicrobium cellulans* grown in pretreated and extracted bagasse and minimal nutrient medium M9. *Biomass and bioenergy*, v. 34, p. 1930-1934, 2010.
49. McAllister, T.A.; Hristov, A.N.; Beauchemin, K.A. et al. Enzymes in ruminant diets. In: Bedford, M.R.; Partridge, G.G. (Eds.) *Enzymes in farm animal nutrition*. Oxon: Cab International, 2001. p.273-297.
50. Beauchemin, K.A.; Yang, W.Z.; RODE, L.M. Effects of grain source and enzyme additive on site and extent of nutrient digestion in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v.82, p.378-390, 1999.
51. DIRKSEN, G. Sistema digestivo. In: DIRKSEN, G.; GRÜNDER, H. D.; STÖBER, M. (Eds). *Rosenberger: Exame clínico dos bovinos*. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 1993. p.167-169.
52. Lazzarini, I.; Detmann, E.; Sampaio, C.B. et al. Dinâmicas de trânsito e degradação da fibra em detergente neutro em bovinos alimentados com forragem tropical de baixa qualidade e compostos nitrogenados. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária*, v.61, p.635-647, 2009.
53. Lima, M. S. Produção do complexo celulolítico a partir do engaço da bananeira (*Musa spp.*). Tese. Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde, Recife, 2010.
54. Faheina Júnior, G. S. Produção de celulases por fermentação submersa utilizando micro-organismos prospectados em coleções de culturas nacionais. 2012. Dissertação de Mestrado, Centro de Tecnologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2012.
55. Domingues, F. C.; Queiroz, J. A.; Carbal, J. M. S.; Fonseca, L. P. Production of cellulases in batch culture using a mutant strain of *Trichoderma reesei* growing on soluble carbon source. *Biotechnology Letters*, v. 23, n. 10, p. 771-775, 2001.
56. Papagianni, M. Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes. *Biotechnology Advances*, v. 22, p. 189-259, 2004.

57. Rocha, C. P. Otimização da produção de enzimas por *Aspergillus niger* em fermentação em estado sólido. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2010.
58. Bayer, E.A. & Lamed, R. 1992. The cellulose paradox: pollutant par excellence and/or a reclaimable natural resource? *Biodegradation* 3:171-188.
59. Karunanandaa, K., Varga, G.A., AKIN, D.E. et al. 1995. Botanical fractions of rice straw colonized by white-rot fungi: changes in chemical composition and structure. *Anim. Feed Sci. and Tech.*, 55:179-199.
60. Silva, E.R. Biodegradação fúngica de resíduos agroindustriais para a produção de biomassa microbiana, enzimas ligninocelulolíticas e redução de fitatos. UNICAMP. Campinas, SP:[s.n], 2001.
61. Silva, E.S.; Baldini, M.L.P.; Leite, S.H.; Salomoni, R.; Maiorano, A.E.; Rodrigues, M.F.A. Obtenção de novos microrganismos para produção de enzimas celulolíticas. In: Seminário brasileiro de tecnologia enzimática, 8., 2008, Rio de Janeiro. Anais. Rio de Janeiro: Universidade Estadual do Rio de Janeiro, 2008. p. 115.
62. Lopes, D.O.; Celligoi, M.A.P.C.; Vargas, L.H.M.; Buzzato, J.B. Produção de celulase por *Trichoderma* da Amazônia T676 em fermentação em estado sólido de bagaço de cana. In: Seminário brasileiro de tecnologia enzimática, 8., 2008, Rio de Janeiro. Anais. Rio de Janeiro: Universidade Estadual do Rio de Janeiro, 2008. p. 168-169.
63. Silva, R.D.; Lago, E.S.; Merheb, C.W.; Macchione, M.M.; Park, Y.K.; Gomes, E. Production of xylanase and CMCCase on solid state fermentation in different residues by *Thermoascus aurantiacus miehe*. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 36, p. 235 -241, 2005.
64. Kang, S. W., Park, Y. S., Lee, J. S., Hong, S. I., Kim, S. W. Production of cellulases and hemicellulases by *Aspergillus niger* KK2 from lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, v.91, p.153-156, 2004.

ANEXOS

Curva padrão de glicose

A curva padrão de glicose para os ensaios de Celulase total, endoglicanase e exoglicanase foi construída conforme as diluições contidas na tabela 1. A glicose utilizada para elaboração da curva padrão foi mensurada em balança analítica e solubilizada em água destilada. Preparou-se 100 mL de solução de glicose com a concentração de 1 g/L.

Tabela 1: Diluições da solução padrão de glicose a 1 g/L.

Concentração de glicose (g/L)	Volume de solução padrão de glicose (mL)	Volume de água destilada (mL)
0,10	1,0	9,0
0,20	2,0	8,0
0,30	3,0	7,0
0,40	4,0	6,0
0,50	5,0	5,0
0,60	6,0	4,0
0,70	7,0	3,0
0,80	8,0	2,0
0,90	9,0	1,0
1,00	10,0	0,0

As diluições foram preparadas em tubos de ensaio de 25 mL. As quantificações dos ART foram feitas a partir das diluições e seguindo o item 6.5.6. O programa M.Wave Basic (ChromTech) gerou um gráfico onde o eixo X representa os valores de absorbância e o eixo Y as concentrações de glicose, uma equação de reta foi gerada para determinar as concentrações de glicose das amostras desconhecidas.

Curva Padrão de Albumina

A curva de proteína de albumina de soro bovino foi utilizada como padrão para quantificar os teores de proteínas totais nas amostras de extratos enzimáticos. A curva foi construída seguindo as diluições contidas na tabela 2. Utilizou-se o kit de preparo *Bradford Method Protein Assay Kit* (Amresco[®], Ohio - EUA) para construção da curva padrão.

Tabela 2: Diluições de solução estoque de albumina sérica bovina 0,5 mg/mL.

Diluição padrão	Volume 0,5 mg / mL de BSA (μ L)	Volume de 0,15 M de NaCl (mL) (μ L)	Concentração final BSA (μ g / ml)
em branco (vazio)	0	100	0
S1	5	95	25
S2	10	90	50
S3	15	85	75
S4	20	80	100

As diluições foram preparadas em tubos de ensaio de 10 mL e as quantificações dos teores de proteínas totais foram feitas adicionado-se aos tubos com as diluições 1 mL do reagente Bradford (Amresco[®], Ohio - EUA). Cubetas redutoras foram utilizadas para realização das leituras em espectrofotômetro (AJX1000, Ajmicronal) a 595 nm. O programa M.Wave Basic (ChromTech) gerou um gráfico onde o eixo X representa os valores de absorbância e o eixo Y as concentrações de BSA, uma equação de reta foi gerada para determinar os teores de proteínas totais, expressos em μ g/mL.

Solução de DNS

Para o preparo do reagente DNS, inicialmente pesou-se 10,6 g de ácido 3,5 dinitrossalicílico e 19,8 g de NaOH, dissolveu-se os reagentes em 1416 mL de água destilada. Em seguida adicionou-se 7,6 mL de fenol (fundido à 50 °C) e 8,3 g de metabissulfito de sódio. O reagente foi transferido para frasco âmbar, identificado, datado e armazenado sob refrigeração (EMBRAPA, 2013)

Solução de tartarato duplo de sódio e potássio

Pesou-se 15,1 g de tartarato duplo de sódio e potássio tetra hidratado ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$) o qual foi solubilizado em um litro de água destilada. A mistura foi homogeneizada e transferida para um frasco âmbar, identificado, datado e armazenado ao abrigo da luz (EMBRAPA, 2013)

Solução tampão fosfato de potássio (0,1 M; pH 6,8)

Inicialmente preparou-se 25 mL de solução aquosa de fosfato dibásico de potássio (K_2HPO_4) a 1 M e 25 mL de solução aquosa de fosfato monobásico de KH_2PO_4 a 1 M. Posteriormente misturou-se em um balão de 500 mL, 24,85 mL da solução aquosa de K_2HPO_4 1 M e 25 mL da solução aquosa de KH_2PO_4 1 M, o volume do balão foi totalizado com água destilada. A mistura foi homogeneizada e foi feita a verificação do pH com auxílio do pHmetro PG1800, (Gehaka, São Paulo - Brasil) devidamente calibrado. A solução foi identificada e mantida sob refrigeração.