

LUIZ RÔMULO ALBERTON

PRODUÇÃO DE XILANASE EM RESÍDUOS  
AGROINDUSTRIAIS POR *Streptomyces viridosporus*  
T7A E APLICAÇÃO DO EXTRATO BRUTO EM  
VETERINÁRIA

Tese apresentada como requisito parcial à  
obtenção do grau de Doutor em Processos  
Biotecnológicos, Área de Concentração em  
Saúde Animal, Setor de Tecnologia da  
Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dra. Luciana Porto S.  
Vandenberghe

Co-orientador: Prof. Dr. Carlos Ricardo  
Soccol

CURITIBA

2004

LUIZ RÔMULO ALBERTON

PRODUÇÃO DE XILANASE EM RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS POR  
*Streptomyces viridosporus* T7A E APLICAÇÃO DO EXTRATO BRUTO  
EM VETERINÁRIA

Orientador: Profa. Dra. Luciana Porto S. Vandenberghe

Depto. Engenharia Química - Setor de Tecnologia, UFPR

Co-Orientador: Prof. Dr. Carlos Ricardo Soccol

Depto. Engenharia Química - Setor de Tecnologia, UFPR

Examinadores:

Profa. Dra. Adenise Lorenci Woiciechowski (UFPR)

Profa. Dra. Arislete Dantas de Aquino (UFPR)

Prof. Dr. Carlos Ricardo Soccol (UFPR)

Prof. Dr. Flávio Faria de Moraes (UEM)

Prof. Dr. José Rodríguez-León (ICIDCA - CUBA)

Profa. Dra. Luciana Porto S. Vandenberghe (UFPR)

Aos meus pais “Remo (*in memoriam*) e Mirtes”

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Carlos Ricardo Soccol pela oportunidade, confiança, pelos conhecimentos, incentivo e principalmente por ter acreditado em meu trabalho.

À Profa. Dra. Luciana Vandenberghe pela paciência, dedicação e competência com a qual me orientou neste estudo.

À Profa. Dra. Adenise pela amizade e pela maneira com a qual compartilhou seus conhecimentos.

Aos meus estagiários Ricardo Assman, Daniele, Leandro München e Ricardo Cancio, pela ajuda imprescindível e dedicação durante os experimentos.

Ao meu irmão Geraldo, pelo enorme apoio e incentivo.

Ao Prof. Pedro Ribas Werner pela amizade, e aos preciosos ensinamentos que acrescentaram muito à minha carreira acadêmica e científica.

À colega Mara Elisa Joineau pela amizade e o grande apoio na execução deste trabalho.

Ao colega Valdenir Mangrich pela ajuda nos ensaios de digestibilidade.

Ao colega Aristeu Vieira, pela ajuda nas análises estatísticas.

Aos colegas do laboratório: Débora, Cristiane, Giovana, Herta, Crisitina, Jaime, Bruno, Mytio, Flávera, Radijs, Rosália, Júlio, Letícia e Marcos Traad, pelo companheirismo, amizade e ajuda durante os experimentos.

Aos amigos Pachaly, Elza e Anderson pela grande amizade e incentivo.

À minha colega e amiga Lisiane Martins, pelas importantes colaborações para este estudo.

Agradeço à todos que colaboraram de forma direta ou indireta para a concretização deste estudo.

Agradeço à Deus pela saúde e por mais esta conquista em minha vida...

## SUMÁRIO

LISTA DE TABELA.....	V
LISTA DE FIGURAS.....	Vii
LISTA DE ABREVIATURA.....	IX
RESUMO.....	X
ABSTRACT.....	Xi
1. INTRODUÇÃO.....	17
2. OBJETIVOS.....	20
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	21
3.1 Técnicas de produção de enzimas.....	21
3.1.1 Fermentação Submersa.....	21
3.1.2 Metodos de Concentração de enzima.....	32
3.2 Streptomyces viridosporus T7A.....	33
3.3 Enzimas.....	35
3.3.1 Xilanase.....	35
3.3.2 Lignina Peroxidase.....	42
3.3.4 Endoclucanase.....	43
3.4 Uso de Enzimas em Dieta Animal.....	43
3.5 Substratos Empregados na Produção de Xilanase por Fes.....	46
3.6 Avaliação da Digestibilidade “In Vitro” de Forrageiras pelo Procedimento em duas Etapas.....	48
3.7 Propriedades do Polifenóis.....	49
3.8 Cultivo de Células Animais para Testes de Toxicidade.....	51
4. MATERIAL E MÉTODOS .....	53
4.1 Microrganismo.....	53
4.2 Determinação da Atividade Enzimática.....	54
4.3 Produção de Xilanase por Fermentação Submersa.....	54
4.3.1 Manutenção da cepa e produção do inóculo.....	54
4.3.2 Escolha do substrato.....	55
4.3.3 Determinação da temperatura, concentração do substrato e pH.....	55
4.3.4 Fontes de nitrogênio.....	57
4.3.5 Influência da suplementação com vitamina do complexo B.....	57
4.3.6 Suplementação com sais.....	57
4.3.7 Influência da Suplementação com hidroxietilcelulose (HEC).....	58

4.3.8 Suplementação com farelo de soja, vitaminas do complexo B e hidroxietilcelulose.....	58
4.3.9 Efeito da taxa de inoculação.....	59
4.3.10 Produção de xilanase em bioreator tipo bancada.....	59
4.3.11 Concentração enzimática.....	60
4.4 Produção de Xilanase por Fermentação no Estado Sólido.....	60
4.4.1 Definição da composição do substrato.....	60
4.4.2 Definição dos níveis de farelo de soja na composição do substrato.....	61
4.4.3 Influência do tratamento térmico sobre a produção de xilanase.....	61
4.4.4 Método de inoculação e tempo de fermentação.....	61
4.4.5 Otimização da umidade em aeração.....	62
4.4.6 Variação da escala.....	64
4.5 Delineamento Experimental em Análise Estatística.....	67
4.6 Atividade Antimicrobiana.....	67
4.7 Testes de Inocuidade.....	68
4.8 Inclusão em Dieta Animal.....	69
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	72
5.1 Produção de Xilanase por Fermentação Submersa.....	72
5.1.1 Escolha do substrato.....	72
5.1.2 Determinação da concentração da temperatura, concentração do substrato e do pH.....	74
5.1.3 Otimização de fatores nutricionais.....	78
5.2 Produção de Xilanase por Fermentação no Estado Sólido (FES).....	89
5.2.1 Estudo do Efeito da composição do substrato sobre produção De xilanase.....	89
5.2.2 Estudo da forma de inoculação.....	90
5.2.3 Efeito do tratamento térmico do substrato.....	92
5.2.4 Estudo da influência da umidade e da taxa de inoculação.....	93
5.2.5 Efeito da umidade e aeração.....	95
5.2.6 Estudo do escalonamento do processo de produção.....	98
5.2.7 Evolução da produção de xilanase e biomassa.....	101
5.3 Atividade Antimicrobiana do Extrato Bruto Enzimático.....	103

5.4 Testes de Inocuidade do Extrato Bruto Enzimático.....	105
6. CONCLUSÃO.....	114
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	118
ANEXOS.....	132

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Grupos taxonômicos e o número de substâncias antimicrobianas produzidas.....	34
Tabela 2	Microrganismo produtores de xilanase.....	38
Tabela 3	Composição físico-química do capim Napier.....	46
Tabela 4	Composição físico-química do bagaço de cana.....	47
Tabela 5	Composição físico-química do farelo de soja.....	48
Tabela 6	Principais polifenóis encontrados nas plantas com efeito antioxidantes.....	49
Tabela 7	Estudo da influência da temperatura, concentração do substrato e do pH sobre a fermentação do <i>S. viridosporus</i> T7A, para produção de xilanase.....	56
Tabela 8	Planejamento fatorial $3^{3-1}$ para estudar o efeito da temperatura, concentração do substrato e pH sobre a fermentação do <i>S. viridosporus</i> T7A, para produção de xilanase usando capim Napier como substrato.....	56
Tabela 9	Estudo do efeito da presença e ausência de sais sobre a produção de xilanase, em Planejamento fatorial $10^{16-5}$ .....	58
Tabela 10	Planejamento fatorial $3^{3-1}$ para estudar o efeito de diferentes níveis de suplementação com farelo de soja, de vitamina do complexo B e hidroxietilcelulose, sobre a atividade xilanolítica da fermentação por <i>S. viridosporus</i> T7A em capim Napier como substrato.....	59
Tabela 11	Otimização das proporções de bagaço de cana e Napier para a produção de xilanase de <i>S. viridosporus</i> T7A, no estado sólido.....	61
Tabela 12	Planejamento fatorial $2^2$ com ponto central e uma repetição para estudar os efeitos da umidade e aeração sobre a produção de xilanase em fermentação no estado sólido pelo <i>S. viridosporus</i> T7A.....	62
Tabela 13	Atividade xilanolítica obtida em diferentes substratos naturais em fermentação submersa de <i>S. viridosporus</i> T7A, conduzida em frascos e Erlenmeyer.....	73
Tabela 14	Planejamento fatorial $3^{3-1}$ para estudo dos efeitos temperatura, concentração de substrato e pH, analisados sobre a produção de xilanase fermentação submersa pelo <i>S. viridosporus</i> T7A.....	74
Tabela 15	Planejamento fatorial $3^{3-1}$ para estudo dos efeitos temperatura, concentração de substrato e pH, analisados sobre a produção de xilanase fermentação submersa pelo <i>S. viridosporus</i> T7A.....	76
Tabela 16	Influência de diferentes fontes de nitrogênio para produção de xilanase de <i>S. viridosporus</i> T7A em fermentação submersa.....	78
Tabela 17	Diferentes taxas de inoculação (%) para produção de xilanase em fermentação submersa de <i>S. viridosporus</i> T7A.....	79



Tabela 18	Efeito da suplementação de Vitaminas do Complexo B, e da Hidroxietilcelulose (HEC), sobre a produção de xilanase de <i>S. viridosporus</i> T7A, em fermentação submersa.....	80
Tabela 19	Estudo do efeito da suplementação com sais sobre a produção de xilanase em fermentação submersa por <i>S. viridosporus</i> T7A.....	81
Tabela 20	Planejamento experimental para otimização dos níveis de farelo de soja, vitamina do complexo B e hidroxietilcelulose para a produção de xilanase em fermentação submersa pelo <i>S. viridosporus</i> T7A.....	83
Tabela 21	Atividade enzimática obtida ante e após a ultrafiltração em membrana de 30kDa....	87
Tabela 22	Atividade da xilanase de <i>S. viridosporus</i> T7A, produzida em fermentação submersa, após ultrafiltração seguida de liofilização.....	88
Tabela 23	Estudo do efeito de diferentes proporções bagaço de cana e capim Napier para a produção de xilanase de <i>S. viridosporus</i> T7A por FES.....	89
Tabela 24	Atividade da xilanase de <i>S. viridosporus</i> T7A, em função do modo de inoculação e do tempo, em fermentação no estado sólido.....	91
Tabela 25	Efeito do tratamento térmico sobre a atividade da xilanase de <i>S. viridosporus</i> T7A em meio sólido.....	92
Tabela 26	Efeito da umidade e taxa de inoculação sobre a produção de xilanase de <i>S. viridosporus</i> T7A, em fermentação no estado sólido.....	93
Tabela 27	Efeito da umidade e aeração em fermentação no estado sólido, para produção de xilanase de <i>S. viridosporus</i> T7A.....	96
Tabela 28	Atividade xilanolítica, por fermentação no estado sólido, por <i>S. viridosporus</i> T7A, em bioreator tipo bandeja.....	98
Tabela 29	Atividade xilanolítica, por fermentação no estado sólido, por <i>S. viridosporus</i> T7A, em bioreator horizontal com tombamento. ....	100
Tabela 30	Resultados da inibição do crescimento pelo extrato bruto de <i>S. viridosporus</i> T7A sobre o crescimento de <i>S. aureus</i> em agar manitol.....	104
Tabela 31	Estudo da influência do extrato bruto de <i>S. viridosporus</i> T7A, obtido por fermentação sólida, em cultivo celular.....	106
Tabela 32	Resultado da análise de inocuidade do extrato bruto, em camundongos, obtido por fermentação de <i>S. viridosporus</i> T7A, no estado sólido.....	110
Tabela 33	Peso e conversão alimentar de lotes de frango de corte com dietas contendo extrato bruto de <i>S. viridosporus</i> T7A.....	110
Tabela 34	Efeitos do extrato bruto de <i>S. viridosporus</i> T7A em prova de digestibilidade <i>in vitro</i> da matéria seca em ruminantes.....	112

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estrutura química do xilano.....	36
Figura 2	Mecanismo de reação das xilanases.....	41
Figura 3	Fotografia ilustrativa do biorreator tipo Bandeja utilizado no estudo de escalonamento para produção de xilanase de <i>S. virisporus</i> T7A, por fermentação no estado sólido.....	65
Figura 4	Biorreator tipo tambor horizontal e equipamentos auxiliares.....	66
Figura 5	Fotografia ilustrativa do biorreator tipo tambor horizontal utilizado no estudo de escalonamento para produção de xilanase de <i>S. viriosporus</i> T7A, por fermentação no estado sólido.....	66
Figura 6	Fotografia ilustrativa do cultivo de <i>S. viridosporus</i> T7A em meio sólido composto por material lignocelulósico (milho – planta).....	72
Figura 7	Efeito do pH, temperatura e concentração do substrato sobre a produção de xilanase por <i>S. viridosporus</i> T7A em fermentação submersa.....	75
Figura 8	Gráfico de Pareto mostrando os efeitos da temperatura, pH e concentração de substrato na produção de xilanase de <i>S. viridosporus</i> T7A em fermentação submersa.....	77
Figura 9	Efeitos da suplementação com sais sobre a produção de xilanase de <i>S. viridosporus</i> T7A, em fermentação submersa.....	82
Figura 10	Influência da suplementação com HEC, vitaminas do complexo B e F. de soja sobre a produção de xilanase de <i>S. viridosporus</i> T7A, em fermentação submersa.....	84
Figura 11	Influência da suplementação com HEC, vitaminas do complexo B e F. de soja sobre a produção de xilanase de <i>S. viridosporus</i> T7A, em fermentação submersa.....	85
Figura 12	Influência da suplementação com HEC, vitaminas do complexo B e F. de soja sobre a produção de xilanase de <i>S. viridosporus</i> T7A, em fermentação submersa.....	86
Figura 13	Produção de xilanase, por fermentação no estado sólido, de <i>S. viridosporus</i> T7A, em função do modo de inoculação .....	92
Figura 14	Efeito da umidade (%) e taxa de inoculação sobre a produção de xilanase por <i>S. viridosporus</i> T7A em FES.....	94
Figura 15	Gráfico de superfície mostrando o efeito da umidade e da taxa de inoculação para produção de xilanase de <i>S. viridosporus</i> T7A em FES.....	95
Figura 16	Efeito da umidade e aeração sobre a produção de xilanase obtida por FES em biorreator tipo coluna de Raimbault.....	96
Figura 17	Efeito da umidade e aeração sobre a produção de xilanase de <i>S. viridosporus</i> T7A	97

	biorreator tipo coluna em meio sólido.....	
Figura 18	Produção de xilanase de <i>Streptomyces viridosporus</i> T7 em biorreator tipo tambor horizontal com agitação por FES.....	100
Figura 19	(A) Evolução do CO <sub>2</sub> durante a produção de xilanase (B) por FES por <i>S. viridosporus</i> T7A.....	102
Figura 20	Halo de inibição do crescimento de cultura de <i>Staphylococcus aureus</i> pelo extrato bruto enzimático obtido pela fermentação de com <i>S. viridosporus</i> T7A.....	104
Figura 21	Diferentes diluições do extrato bruto enzimático de <i>S. viridosporus</i> T7A, em cultivo de células MDBK, PK-15 e VERO, feita em microplaca de poliestireno.....	105
Figura 22	Foto ilustrativa da imagem microscópica ao M.O. (200x) do cultivo celular, com células PK-15, com 4 dias de incubação.....	106
Figura 23	Foto ilustrativa da imagem microscópica ao M.O (200x) do cultivo celular, com células PK-15, descolamento da monocamada do cultivo celular.....	108
Figura 24	Foto ilustrativa do experimento realizado com a inclusão do extrato bruto enzimático de <i>S. viridosporus</i> T7A na água de bebida de camundongos, em diluições de 1/100 e 1/1000, comparando-se com controle, sem adição.....	109
Figura 25	Foto ilustrativa do experimento realizado com frangos para corte, para avaliar os efeitos do extrato bruto enzimático <i>S. viridosporus</i> T7A na dieta, obtido por fermentação no estado sólido.....	112

**LISTA DE ABREVIATURAS**

APPL – *Acid precipitable polymeric lignin*  
ATCC – American Type Culture Collection  
CA – Conversão alimentar  
Da – Dalton  
DNS – dinitrosalicílico  
FES- Fermentação no estado sólido  
FSm – Fermentação submersa  
HEC - Hidroxietilcelulose  
KDa- KiloDaltons  
MDBK – *Madin; Darby Bovine kidney*  
MO – Microscópio ótico  
MS – Matéria Seca  
PK – *Porcine kidney*  
PV- Peso vivo  
rpm- Rotações por minuto  
U – unidade  
VERO – *Monkey African Green*  
Y/M – *yeast extract malt agar*

## RESUMO

As bactérias do gênero *Streptomyces* têm sido muito estudadas pelo seu grande interesse industrial desde a sua descoberta como produtoras de antibióticos. A maioria das cepas de *Streptomyces* sintetiza substâncias antibacterianas, antifúngicas, antitumorais, antiparasitárias, herbicidas e enzimas usadas na medicina, agricultura e vários outros processos biotecnológicos. Neste trabalho procurou-se estudar o processo fermentativo da bactéria *Streptomyces viridosporus* T7A em resíduos agroindustriais, com o objetivo de aplicar o extrato bruto enzimático da fermentação na dieta de animais. Para tanto, o principal parâmetro analisado foi a produção de xilanase já que, no processo de degradação da fibra, outras enzimas, como a peroxidase, esterase e endoglucanase, podem estar sendo produzidas paralelamente. A primeira parte deste estudo envolveu a produção de xilanase em fermentação submersa, onde foram estudados diferentes substratos naturais, fatores físicos (pH, temperatura e taxa de inoculação) e fatores nutricionais (concentração do substrato; fonte de nitrogênio, hidroxietilcelulose, vitaminas do complexo B e os sais Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub>, NaCl, ZnSO<sub>4</sub>, FeSO<sub>4</sub>, CuSO<sub>4</sub>, MoSO<sub>4</sub>, MnSO<sub>4</sub>). Verificou-se que, utilizando o capim Napier a 1% (p/v), pH 8,6, temperatura de 37<sup>o</sup>C, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0,0053 g/ml), taxa de inoculação de 12%, vitaminas do complexo B a 0,25% e hidroxietilcelulose 0,17%, obteve-se a melhor produção de xilanase (25 U/ml). O extrato bruto enzimático foi concentrado por ultrafiltração seguida de liofilização chegando-se a 2.272 U/g. Um segundo estudo foi realizado em fermentação no estado sólido (FES). Foram verificados os efeitos da composição do substrato (bagaço de cana, capim Napier e farelo de soja), da forma e taxa de inoculação, do tratamento térmico do substrato, da umidade e aeração sobre a produção de xilanase. Na FES, maiores níveis de atividade de xilanase, cerca de 450 U/g, foram obtidos com o substrato composto por 70% de bagaço de cana, 20% de capim Napier e 10% de farelo de soja e nas condições de 37<sup>o</sup>C, pH 8,6, umidade acima de 90%, inoculado com suspensão de esporos a 10<sup>7</sup>/g substrato. O escalonamento do processo de produção de xilanase foi realizado em biorreatores do tipo bandeja perfurada e tambor horizontal com agitação e aeração forçada. A atividade enzimática em biorreator do tipo bandeja e em tambor horizontal foi de 90 U/g e 80,5 U/g, respectivamente, o que mostra que este estudo deve ser continuado. O extrato bruto enzimático obtido por FES foi submetido a testes de atividade antimicrobiana, de inocuidade em cultivo celular e em camundongos, aplicado em dietas de frango para corte e em prova de digestibilidade *in vitro* para ruminantes. O extrato bruto enzimático apresentou efeito inibidor sobre cepas patogênicas Gram positivas (*Staphylococcus aureus* e *Streptococcus* sp.), porém não apresentou efeito sobre bactérias Gram negativas (*Salmonella* sp, e *E. coli*). O mesmo extrato mostrou ausência de toxicidade e efeito citoprotetor em cultivo celular e em camundongos, foi inócua e teve influência no peso final nos grupos tratados. Já em frangos para corte a inclusão do extrato bruto não influenciou o ganho de peso, mas houve melhora na conversão alimentar (4,76%) em relação ao controle. Não houve diferença estatística entre o controle na digestibilidade *in vitro* da matéria seca, quando o extrato bruto foi adicionado nos níveis de 0,2;0,5; 2 e 5%.

Palavras-chave: *Streptomyces*; xilanase, bagaço de cana, capim Napier, enzima

## ABSTRACT

Since it was discovered for its antibiotic producing capacity, *Streptomyces* bacteria have been studied due to the great industrial interest on them. The majority of *Streptomyces* strains produces antibactericids, antifungic, antitumoral, antiparasital, herbicides substances and enzymes which are used in medicine, agriculture and other biotechnological processes. The aim of this work was to study the fermentative process of the *Streptomyces viridosporus* T7A using agroindustrys wastes and include the crude fermentation enzymatic extract in animal diet. The main parameter analysed was the xylanase production, however, other enzymes such as ligninperoxidase, esterase endoglucanase, are also produced. The first part of this study was conduced in submerged fermentation where the composition of natural substrates, fisical factors (pH, temperature and inoculation rate) and nutritional elements (substrate concentration; nitrogen, hidroxyetilcelulose, complex B vitamins, and minerals salts Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub>, NaCl, ZnSO<sub>4</sub>, FeSO<sub>4</sub>, CuSO<sub>4</sub>, MoSO<sub>4</sub>, MnSO<sub>4</sub>) were studied. It was verified that Napier grass 1% (w/v), soybean waste 1%, pH 8,6; temperature 37<sup>0</sup>C; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0,0053 g/ml); 12% of inoculation rate, 0,25% of complex B vitamins and 0,17% of hidroxyetilcelulose were the best conditions for xylanase production which achieved 25 U/ml. The enzymatic extract was concentrated by ultrafiltration followed by liofilization reaching 2.272 U/g. The second part of the study was carried out using the solid state fermentation (SSF) technique, The effetc of the followin parameters were studied: substrate composition (sugar cane bagasse, Napier grass and soybean waste), form of inoculations and levels, thermic substrate pretreatment, moisture and aeration rate. In SSF the highest xylanase activity was reached with: 70 % sugar cane bagasse, 25% Napier grass and 10% soybean waste, 37<sup>0</sup>C, pH 8,6, 90% of moisture and 10<sup>7</sup>/g substrate. With these conditions the xylanase production achieve around 450 U/g. The scale-up of the xylanase production process was conducted in plates and horizontal drum bioreactors, reaching 90 U/g and 80,5 U/g, respectively. This fact shows the need for further studies of xylanase production in order to stablish better conditions for this process. The antimicrobial properties of the enzymatic extract was tested for toxicity on animals cell cultures, in mice, broiler chickens diet and digestibility proof *in vitro* for ruminants. The enzymatic extract obtained by SSF showed inibitory effects on Gram-positive pathogenic bacteria strains (*Staphylococcus aureus* e *Streptococcus* sp.) but not on Gram negative bacteria strains (*Salmonella* sp, *Pasteurella* sp e *E. coli*), toxicity absence on cell cultures and mice, however a protector effect was verified and the final wheight was bigger on mice. In broiler chicken the crude extract inclusion did not influence the wheight gain, but had a good influence on feed conversion (4,76%), when comparated to control. No statistic difference in dry matter digestibility *in vitro* among control were verified, when the crude extract was added at 0,2;0,5; 2 and 5% levels.

Key words: *Streptomyces*; xylanase, sugar cane bagasse, Napier grass, enzyme

## 1.INTRODUÇÃO

As bactérias do gênero *Streptomyces* pertencem ao grupo dos Actinomicetos, são Gram-positivas, embora não estritamente, são aeróbicas, crescem bem em ágar Sabouraud, são catalase positivas, e não se conhece nenhuma cepa patogênica para os animais (QUINN *et al.*, 1994).

As bactérias do gênero *Streptomyces* se tornaram um microrganismo de grande interesse industrial, desde a sua descoberta como produtoras de antibióticos. A maioria das cepas de *Streptomyces* sintetiza substâncias antibacterianas, antifúngicas, antitumorais, antiparasitárias, herbicidas e enzimas usadas na medicina, agricultura e vários outros processos biotecnológicos (MUTH *et al.*, 1999).

CRAWFORD (1978) conseguiu pela primeira vez provar a atividade lignolítica de cepas de *Streptomyces*. Mais tarde PASTI *et al.* (1990) compararam a atividade lignolítica de várias cepas de *Streptomyces*; estes autores verificaram que o *S. chromofuscus* A2 e o *S. viridosporus* T7A, possuem alta e média atividade lignolítica respectivamente (49,64% e 36,04% de degradação da lignina total). Portanto, a cepa *Streptomyces viridosporus* T7A é capaz de produzir, em substrato lignocelulósico enzimas de interesse agroindustrial como a lignina peroxidase, xilanase, esterase e celulase, além de compostos fenólicos derivados da lignina, tais como ácido cumárico e ferúlico (RAMACHANDRA *et al.*, 1997). Estes compostos fenólicos têm grande importância biotecnológica para produção de antioxidantes industriais (CRAWFORD *et al.*, 1984), e também para uso na medicina para combater radicais livres, desta forma, protegendo as células da lipoperoxidação, o envelhecimento e doenças degenerativas (FERGUSON, 2001).

Dos materiais existentes na natureza, os lignocelulósicos são os mais abundantes. São substâncias ricas em carbono, e uma importante fonte de energia para os herbívoros. Embora estes animais tenham grande capacidade de transformar alimentos grosseiros em energia, a lignina, que faz parte da sua estrutura, dificulta a digestão do resto dos componentes dos vegetais. No Brasil, o setor agroindustrial se posiciona entre os mais importantes do mundo onde toneladas de materiais lignocelulósicos são produzidas anualmente. Uma pequena parte é aproveitada para a produção animal, mas a maior parte é incorporada ao solo ou torna-se um poluente.

A pecuária é um setor que cresce a cada ano, e grandes áreas de florestas são desmatadas para o plantio de pasto para bovinos, pois é preciso atender as necessidades de consumo interno e de exportação da carne bovina.

A lignina junto com a celulose dá estrutura e rigidez às plantas, e possui grande resistência ao ataque de microrganismos comuns (CRAMPTON & HARRIS, 1974).

As forragens de um modo geral possuem boa digestibilidade para os animais, mas os resíduos das agroindústrias, tais como palhas e bagaços, têm aproveitamento limitado devido ao alto teor em lignina, pois os herbívoros, bem como os simbioses destes animais são incapazes de digerir-la e, também de solubilizar o complexo formado entre a lignina e a celulose.

A indústria de rações para animal é um importante setor do agronegócio, com produção anual de 600 milhões de toneladas, cerca de 50 bilhões de dólares. Do total produzido, a maior parte é de aves, suínos e ruminantes (90%), e 10% são animais de companhia e peixes. Celulase e hemicelulases representam grande potencial de aplicação na composição da dieta animal (BHAT, 2000).

A adição de enzimas em dietas de animais ruminantes e monogástricos para melhorar a eficiência da produção vem sendo estudada. As principais enzimas de interesse na atualidade são: celulasas, hemicelulasas,  $\beta$ -glucanase, xilanase e pectinase. Estas enzimas degradam alguns componentes dos cereais e fibras, melhorando o valor nutricional dos alimentos (GALANTE *et al.*, 1998). Este crescente interesse da pecuária nas enzimas, probióticos e prebióticos também se deve ao fato de que a União Européia em 1997, proibiu o uso de avoparcina e, em 1998, de bacitracina de zinco, espiramicina, virginamicina e tilosina. Os produtores europeus atualmente podem recorrer a apenas quatro promotores de crescimento: monensina, salinomicina, avilamicina e flavomicina; os dois primeiros são ionóforos bastante utilizados como agentes anticoccidianos para aves, restando apenas os dois últimos como promotores de crescimento para frangos de corte e outras aves.

No Brasil, em 1992, a Portaria nº 159, do Ministério da Agricultura veda o uso de antimicrobianos para ração como aditivos sistêmicos, promotores de crescimento ou conservantes como tetracilinas, penicilinas, cloranfenicol e sulfonamidas. O Ofício circular 19/98 de 16/11/98 do Ministério da Agricultura, suspende o uso de



Avoparcina e a Portaria 448 de 10/09/98 proíbe a fabricação, importação e uso de Cloranfenicol, Furazolidona e Nitrofurazona. Atualmente, os aditivos autorizados como promotores de crescimento de frangos de corte são: ácido 3-nitro, ácido arsanílico, avilamicina, nitrovim, olaquinox, tilosina, virginiamicina, bacitracina de zinco, espiramicina e enramicina, de acordo com o Ministério da Agricultura.

Pesquisadores sensibilizados com o problema procuraram alternativas ao uso de antibióticos, promotores de crescimento, na ração animal, tais como as enzimas, os probióticos e prebióticos, pois a simples retirada desse produto provocaria grandes danos econômicos. Apesar de existirem um grande número de trabalhos relacionados à biodegradação da lignina, e produção de outras enzimas fibrolíticas, tais como xilanase, celulase e pectinase, não foi possível encontrar referências na literatura quanto ao emprego de cepas de *S. viridosporus* nos alimentos e no processo de digestão dos animais, principalmente naqueles de interesse econômico.

O estudo destes microorganismos, na produção de enzimas voltadas ao emprego na alimentação animal, pode melhorar a eficiência da produção de carne e leite, bem como, diminuir o impacto ambiental das explorações pecuária e agroindustrial, pois é possível aproveitar resíduos agroindustriais de baixo custo para produção de proteína animal. Além disto, as enzimas podem melhorar a digestibilidade dos alimentos, substituindo o efeito dos aditivos (antimicrobianos) na dieta animal.

## 2.OBJETIVOS

### *Gerais*

Com base no que foi exposto, visou-se estudar algumas propriedades e aplicações biotecnológicas do extrato bruto enzimático enzimático, com enfoque em medicina veterinária, produzido em fermentação submersa e no estado sólido por *Streptomyces viridosporus* T7A.

### *Específicos*

- Produzir xilanase e determinar a atividade de lignina peroxidase;
- Estudar os parâmetros físico-químicos (umidade, pH, temperatura, e aeração) envolvidos na produção de xilanase em fermentação no estado sólido e submersa;
- Avaliar os efeitos dos fatores nutricionais (tipos de substratos, sais minerais, nitrogênio, fontes de carbono, vitaminas) em fermentação no estado sólido e submersa;
- Determinar a evolução dos parâmetros cinéticos (atividade enzimática, consumo de O<sub>2</sub>, produção de CO<sub>2</sub>) da fermentação no estado sólido;
- Comprovar a inocuidade do extrato bruto enzimático, aplicando em cultivo celular (linhagens VERO; MDBK e PK15) e em camundongos;
- Avaliar possíveis efeitos antimicrobianos do extrato bruto enzimático da fermentação frente a cepas patogênicas de interesse veterinário;
- Verificar o efeito da inclusão do extrato bruto enzimático no desempenho de frangos para corte e no processo de digestibilidade de ruminantes usando a prova *in vitro* como simulação.

### 3.REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 Técnicas de Produção de Enzimas

Enzimas são proteínas que apresentam atividade catalítica. A complexa estrutura molecular enzimática é majoritariamente constituída por uma parte protéica, porém a ela podem estar ligadas outras moléculas, como carboidratos e lipídeos. A produção de enzimas em escala industrial se faz, na maioria das vezes, por fermentação submersa, embora nos países orientais haja uma tradição estabelecida de utilização da fermentação no estado sólido (SANT'ANNA JR, 2001).

A maioria das enzimas utilizadas na indústria são enzimas extracelulares de origem microbiana. As proteases constituem 50% do mercado das enzimas microbianas. Entre as enzimas comercialmente importantes utilizadas em uma ou mais aplicações destacam-se as alfa-amilases do *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens* e *Aspergillus oryzae* e a amiloglicosidase de *Aspergillus niger*. As celulases comerciais produzidas por cepas de *Trichoderma reesei*, *Penicillium funiculosum* e *Aspergillus niger*, tem potencial na conversão de materiais lignocelulósicos em glicose (WARD,1989). Alguns estudos têm demonstrado a produção de xilanases em fermentação no estado sólido, com cepas de *Trichoderma* sp.; *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp., usando o bagaço de cana como substrato-suporte (PANDEY *et al.* ,2001).

##### 3.1.1 Fermentação no estado sólido

Esse processo, comumente empregado em países do Oriente e do continente Africano visando a elaboração de alimentos, vem ganhando adeptos em sua utilização, ano após ano, entre pesquisadores da Europa e do continente americano.

Devido aos baixos níveis de água no sistema, os fungos filamentosos têm recebido a maioria das atenções nas pesquisas, pois apresentam melhor capacidade de crescimento nestas condições. Assim, um vasto campo de estudos tem se vislumbrado utilizando estes microrganismos. Como exemplos, temos as culturas de *Rhizopus* sp, *Trichoderma* sp, *Penicillium* sp e *Aspergillus* sp para a

obtenção de concentração protéica e produção de enzimas, *Mucor* sp ou *Rhizopus* sp na produção de renina microbiana, *Penicillium* sp para a produção de penicilina e *Fusarium* sp ou *Giberella* sp para a obtenção de ácido giberélico. Porém, outros microrganismos têm obtido espaço neste tipo de sistema, como a produção de esporos de *Bacillus thuringiensis* para a produção de bioinseticidas, de  $\alpha$ -amilase por linhagens de *Bacillus* sp, e de álcool por *Zymomonas mobilis* ou por leveduras tradicionais. Neste sentido, a fermentação no estado sólido tem se mostrado apta a realizar vários tipos de transformações, seja ela por fungos, leveduras ou bactérias. O que irá determinar a escolha da linhagem mais apropriada, durante a fase de seleção do microrganismo, é o estudo detalhado do processo, visando obter o melhor meio de cultura e as melhores condições ambientais da fermentação, principalmente no que se refere à temperatura e ao teor de umidade do sistema.

(DEL BIANCHI *et al.*,2001)

O termo fermentação no estado sólido (FES), tradução do inglês “solid state fermentation”, é objeto de numerosas definições. RAIMBAULT & ALAZARD (1980), MAHEVA *et al.* (1984) e LONSANE *et al.* (1985), descrevem como a fermentação na qual o crescimento do microrganismo em substratos sólidos ocorre na ausência de líquido na forma livre. A água livre indispensável ao crescimento dos microrganismos é adsorvida num suporte sólido ou complexada no interior de uma matriz sólida. A FES é considerada mais natural que outros tipos de fermentação, como, por exemplo, a fermentação submersa (FSm), porque seus processos assemelham-se às condições sob as quais a maioria dos microrganismos cresce na natureza (HESSELTINE,1987).

Os materiais sólidos utilizados na FES, devem possuir partículas de porosidade e tamanho adequado com grande área superficial por unidade de volume, para facilitar a acessibilidade e a penetração do organismo no substrato, proporcionando um crescimento microbial na interface sólido/gás e levando as altas taxas de processos bioquímicos. Além disto, a matriz sólida não deve ser contaminada por inibidores da atividade microbiana e deve conter ou ser capaz de absorver as fontes nutricionais dos microrganismos como carboidratos (celulose, amido, açúcares), nitrogênio (amônia, uréia, peptídeos) e sais minerais (PANDEY, 1991; RAIMBAULT, 1997).

A utilização da FES não é recente. Numerosas fermentações para a obtenção de produtos alimentares e agrícolas com base neste princípio têm sido praticadas há séculos em todo mundo. Essa fermentação, ainda pouco estudada no Brasil, é muito desenvolvida nos países orientais, particularmente Japão, China e Coréia (SOCCOL, 1994).

Pode-se destacar algumas aplicações da FES em diferentes setores econômicos:

- Indústria Agro-alimentar: fermentações tradicionais de alimentos, produção de cogumelos, bioconversão de resíduos e aditivos alimentares;  
Ex: queijos fermentados *Agaricus*, *Pleurotus*, bagaço de cana, casca de café.
- Agricultura: biocontrole, bioinseticidas, crescimento de plants, hormônios e micorrização; Ex: *Trichoderma* sp., giberilinas, inóculo de plantas.
- Fermentação industrial: produção de enzimas, antibióticos, ácidos orgânicos, etanol e metabólitos fúngicos. Ex: amilases, celulasas, proteases, pectinases, xilanases, penicilina, probióticos, ácidos cítrico, fumárico, gálico, láctico (RAIMBAULT, 1997).

Nas últimas décadas, pesquisadores ocidentais começaram a se interessar pela FES, dando origem a novos processos, bem como a muitas publicações científicas demonstrando as vantagens deste método de fermentação (SOCCOL, 1994).

### *Microorganismos*

Os microrganismos utilizados na FES podem ser qualificados, segundo PANDEY (1992), em dois grandes grupos: os que fermentam naturalmente ou selvagens, e os de cultura pura (individuais ou consorciados). A compostagem e a ensilagem são processos que utilizam a microflora natural. As culturas puras,

conhecidas desde a Antigüidade, são utilizadas nos processos industriais para propiciar o controle da utilização do substrato e a formação do produto final.

Bactérias, fungos e leveduras podem crescer em substratos sólidos e são aplicados em processos de FES. Os fungos filamentosos são os mais utilizados na maioria dos casos, devido às suas características fisiológicas, enzimológicas e bioquímicas (SOCCOL, 1994).

### *Substratos*

Tanto substâncias sintéticas como naturais podem ser utilizadas nos processos de FES. Na natureza a maioria dos materiais orgânicos disponíveis são de estrutura polimérica, tais como polissacarídeos, proteínas e ligninas, conferindo determinadas propriedades de sólido ao substrato. Em geral, todos podem ser utilizados pelos microrganismos como fonte de nutrientes, bem como serem utilizados como suporte inerte no qual o carbono e fontes de energia (açúcares, lipídeos, ácidos orgânicos) são adsorvidos. (HESSELTINE, 1972). Diversos resíduos agrícolas ou agro-industriais, celulósicos ou amiláceos têm sido utilizados em fermentação no estado sólido, tais como bagaço de cana-de-açúcar, de mandioca e de maçã, bem como batata refugo, palha de arroz (SOCCOL, 1994).

### *Parâmetros da FES*

Fatores ambientais como temperatura, pH, atividade de água, níveis de oxigênio e concentrações de nutrientes e produtos afetam significativamente o crescimento microbiano e a formação de produtos. Em culturas submersas, o controle ambiental é relativamente simples devido à homogeneidade da suspensão microbiana de células, da solução nutritiva e dos produtos presentes na fase líquida. O baixo teor de umidade na FES proporciona menor volume de reator por massa de substrato que em FSm, e, também, simplifica a recuperação do produto. Grandes problemas, entretanto, são encontrados no que diz respeito de grau de mistura, transferência de calor e oxigênio, teor de umidade e a localização dos gradientes de pH e concentração de nutrientes e produtos, decorrentes da heterogeneidade do meio. Assim, os microrganismos selecionados para FES devem ser mais tolerantes à variadas condições de cultivo (RAIMBAULT, 1997).

### *Umidade*

A quantidade de água que varia durante a FES, devido à alteração estrutural do sistema, à liberação dos produtos em reações enzimáticas e a produção de água em função metabolismo respiratório celular, afetando os resultados da fermentação (GERVAIS *et al.*, 1988).

Os valores ótimos de teor de umidade para o crescimento e a utilização do substrato variam entre 40 e 70% dependendo do organismo e do substrato utilizado no processo. Por exemplo, no crescimento de *Aspergillus niger* em substratos amiláceos como mandioca (RAIMBAULT e ALAZARD, 1980) e farelo de trigo (NISHIO *et al.*, 1979) foram utilizados teores de umidade consideravelmente inferiores aos utilizados para polpa de café (PENAZOLA, *et al.*, 1985) e bagaço de cana de açúcar (ROUSSOS *et al.*, 1989), provavelmente devido a maior capacidade de retenção de água destes últimos substratos.

Na fermentação líquida o substrato está dissolvido ou em suspensão dentro de uma fonte aquosa onde a água não é um fator limitante. Porém, na FES a quantidade máxima de água presente no meio é função da capacidade de retenção do substrato. Um aumento na quantidade no seio da matriz está diretamente relacionado com aumento do risco de contaminação bacteriana, menor porosidade, diminuição da difusão de oxigênio, redução do volume de gás e, conseqüentemente, menor troca gasosa que, porém, deverá estar presente em quantidade suficiente para não limitar o crescimento dos microrganismos (CANNEL & MOO-YOUNG, 1980; LONSANE *et al.*, 1985).

### *Controle do pH*

Diferentes grupos de microrganismos reagem de maneira diversa à variação de pH do meio. Assim, pode-se dizer que geralmente bactérias, especialmente as patogênicas, preferem valores de pH próximos à neutralidade, enquanto fungos e leveduras crescem melhor em pH ácido. Para a maioria dos microrganismos, o pH menor que 2,0 inibe o seu crescimento, mas não, os mata. Este efeito é provavelmente explicado pela alta concentração de íons hidrogênio inibindo a

atividade das proteínas expostas na parte externa da membrana celular, afetando as propriedades dos lipídeos na membrana citoplasmática (DOELLE, 1985).

O pH inicial de um meio de cultura sólido é ajustado com a adição de uma solução mineral que irá se impregnar no substrato-suporte. Neste caso é possível controlar o pH evitando assim variações que podem ser desfavoráveis ao crescimento do microrganismo. RAIMBAULT e ALAZARD (1980) preconizam a utilização de sais minerais que dão ao meio de cultura um poder tamponante. Uma mistura de sulfato de amônio e de uréia em proporções adequadas permite a estabilização do pH dentro de valores favoráveis ao crescimento do *Aspergillus niger*.

O pH da fermentação pode afetar tanto o crescimento dos microrganismos como a produção e estabilidade dos metabólitos obtidos. O controle do pH na FES é dificultado pela geração de gradientes de concentração característicos em determinados pontos do biorreator. Na FES, é possível fixar um valor de pH inicial para obter um rendimento ótimo, mas além desta condição inicial, o pH do meio sofrerá uma evolução durante a fermentação em razão da atividade metabólica do microrganismo, da fonte de nitrogênio utilizada e do grau de crescimento alcançado pelo cultivo, que é de difícil controle. O controle desta variável na FES mediante soluções de álcalis ou ácidos tem-se mostrado pouco eficiente e em alguns casos controle do pH na FES pode ser obtido através da aspersão de soluções de amônia e uréia (RAIMBAULT e ALAZARD, 1980).

Apesar do pH ser um dos fatores críticos, o acompanhamento e o controle do mesmo durante a fermentação não é usualmente feito em FES. Isto se dá, especialmente, porque a forma da água nos substratos sólidos sempre constitui um obstáculo para a medida satisfatória do mesmo. Na maioria dos casos mede-se o pH a partir de uma suspensão formada por amostra sólida e de 3 a 4 partes de água. Este método permite medir o pH global, todavia não é representativo do micro-pH localizado no filme aquoso onde se passam, na realidade, as reações bioquímicas. Elevada capacidade de tamponamento de alguns substratos assim como o uso de solução salina inicial elimina a necessidade de controle do pH durante o processo fermentativo, uma vez que permitem que durante o crescimento o pH não sofrerá



variações bruscas, não atingindo as zonas críticas para o metabolismo (SOCCOL, 1994; LONSANE *et al.*, 1985; RAIMBAULT & ALAZARD, 1980).

### *Controle da temperatura*

O principal problema operacional da FES está ligado à transferência de calor produzido pela atividade microbiana durante a fermentação. A ausência de agitação nos fermentadores estáticos, e baixa condutividade térmica dos materiais biológicos são os principais responsáveis pela elevação da temperatura e, conseqüentemente, pela redução da atividade microbiana (HESSELTINE, 1987).

Durante as fermentações líquidas em reatores de mistura, o calor produzido pelos microrganismos durante a respiração é instantaneamente dissipado. Enquanto que na FES, a forte densidade do micélio, o baixo teor de água e a ausência de mistura podem conduzir ao acúmulo de calor (cerca de 3760 Kcal/Kg de sólido seco são produzidas como calor de metabolismo). Tal acúmulo está diretamente relacionado ao tipo de microrganismo e à profundidade do substrato sendo prejudicial ao desenvolvimento do mesmo. Dessa forma, diferentes métodos de controle da temperatura, tais como circulação forçada de ar, manutenção do reator em ambiente com temperatura controlada, utilização de jaquetas com circulação de água ou imersão em banho termostático são utilizados para manter a temperatura entre 25-32 °C, que são os valores usuais para FES. De qualquer forma, até o presente momento, o acúmulo de calor constitui um inconveniente sério no caso de reatores sólidos em larga escala fazendo-se necessário um grande número de estudos de engenharia para a resolução deste problema (SOCCOL, 1994; LONSANE *et al.* 1985).

### *Aeração e Trocas Gasosas*

A aeração é responsável a quatro funções principais em processos de FES citados a seguir:

- Manter condições de aerobiose;
- Facilitar a dessorção de CO<sub>2</sub>;
- Controlar a temperatura e o teor de umidade do substrato.

O ambiente gasoso pode afetar significativamente os níveis de biomassa e metabólitos produzidos. Em culturas aeróbicas submersas o fornecimento de oxigênio é muitas vezes o fator limitante do crescimento, devido à sua baixa solubilidade em água. Por outro lado, um processo no estado sólido proporciona acesso livre do oxigênio atmosférico ao substrato. Assim, a aeração é mais simples que no processo submerso pela alta taxa de difusão no filme aquoso sobre a partícula sólida, além da grande superfície de contato entre a fase gasosa, sólida e micelial (MACHADO, 2000).

A aeração na FES se faz por injeção de ar comprimido estéril através do leito de fermentação. As trocas gasosas são realizadas entre o ar e a matriz sólida. Em geral, o fluxo de ar empregado, é função do microrganismo estudado, da quantidade de O<sub>2</sub> consumido ou de CO<sub>2</sub> produzido, da espessura do leito de fermentação utilizado, da quantidade de calor gerado pelo metabolismo e dos metabólitos que devem ser produzidos (LONSANE *et al.*, 1985).

Na FES, o controle dos gases envolvidos é um fator importante no desenvolvimento dos microrganismos (MOO-YOUNG *et al.*, 1983).

#### *Medida Metabólica da biomassa*

A determinação da biomassa é um dos pontos mais críticos da FES. As técnicas facilmente utilizadas para a fermentação em meio líquido são impraticáveis na FES. As dosagens são difíceis, em razão da interferência de métodos químicos e da heterogeneidade do meio. Normalmente os métodos de dosagem utilizados são os mesmos utilizados para proteínas, glicosamina, aminoácidos, ácidos nucleicos e pela precipitação de proteínas pelo ácido tricloroacético.

Na FES, a biomassa está associada ao substrato-suporte de tal forma que a separação física para sua quantificação não é facilitada. Recorre-se então ao emprego de técnicas indiretas de determinação, que se baseiam na correlação entre o enriquecimento do meio de cultivo com metabólitos provenientes da biomassa (glicosamina, proteínas, ergosterol, DNA, ATP, etc.). Então, é de se entender que o problema a resolver para se obter um melhor entendimento destes sistemas, passa pela caracterização da cinética de produção de biomassa assim como no desenvolvimento de modelos matemáticos os quais são necessários para otimizar

estes tipos de processos (RAIMBAULT e ALAZARD, 1980; RODRIGUEZ *et al.*, 1997).

### *Metabolismo de respiração*

O consumo de O<sub>2</sub> e produção de CO<sub>2</sub> é o resultado da respiração, o processo metabólico pelo qual os microrganismos aeróbicos retiram a maior parte de sua energia de crescimento. Essas atividades metabólicas são associadas ao crescimento, eles são convertidos em biomassa e dióxido de carbono. A produção de CO<sub>2</sub> causa a diminuição do peso do substrato fermentado ao longo do crescimento, e a quantidade de perda de peso pode ser correlacionada com o crescimento que ocorreu. A estimativa do crescimento com base na produção de CO<sub>2</sub> ou consumo de O<sub>2</sub> assume que o metabolismo destes dois componentes está completamente associado ao crescimento, o que significa que a quantidade de biomassa produzida por unidade de gás metabolizado é constante. Isto, no entanto, não é completamente verdadeiro, uma vez que existem modificações em diferentes etapas do crescimento, como germinação, crescimento vegetativo, metabolismo secundário, esporulação e degeneração do micélio (RAIMBAULT, 1997).

A medida do metabolismo dos gases é mais eficiente se for considerado um modelo de correlação. A aplicação destes modelos envolvendo a predição do crescimento a partir de medidas das taxas de O<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub> requerendo o uso de métodos numéricos para a resolução de equações diferenciais. Dessa forma, o uso de computador e *software* adequado, é essencial. Se há disponibilidade de equipamento para coleta de dados faz com que estes modelos de correlação sejam uma ferramenta poderosa na estimativa de biomassa uma vez que medidas contínuas on-line podem ser feitas. Outra vantagem das medidas de diferenças de concentrações de gás efluente com analisadores paramagnéticos e infravermelhos inclui a habilidade de monitorar o quociente respiratório para assegurar a ótima oxidação do substrato, a habilidade de incorporar controle de retroalimentação automatizada sobre a taxa de aeração e a natureza não destrutiva do procedimento de medida (RAIMBAULT, 1997).

### *Reatores da FES*

Num processo fermentativo o biorreator fornece o meio adequado para o crescimento e a atividade dos microrganismos que produzem as reações biológicas. Durante o período da fermentação, ele deve ser capaz de impedir a saída do meio/biomassa interno assim como prevenir a entrada de substâncias estranhas no meio reacional. Um fermentador ideal deve possuir algumas características de projeto, tais como; ser construído de material não tóxico, possui resistência mecânica e química, possui um sistema de aeração/agitação, com amostragem, bem como pontos de carga e descarga. Um sistema de resfriamento pode ser necessário para o controle da transferência de calor do metabolismo. Finalmente, o biorreator deve ser capaz de operar sob condições assépticas (PANDEY, 1991).

Em escala de laboratório, os reatores mais utilizados são em colunas de vidro imersas em banhos com temperatura controlada. O substrato sólido é incorporado nas colunas onde se faz passar por uma corrente de ar umidificado, que permite a entrada contínua de  $O_2$  e favorece a transferência de calor e a remoção do  $CO_2$  produzido pela fermentação. A aeração é um dos fatores críticos que interferem na produtividade (BAGNON, 1999).

### *Vantagens da FES*

- As vantagens da FES são: simplicidade no preparo do meio de cultura, freqüentemente só se adiciona água e nutrientes essenciais;
- Diminuição de contaminações devido ao baixo teor de umidade (60 a 80%) do meio de cultura, reduzindo a necessidade de esterilização;
- Diminuição na quantidade de efluentes líquidos à tratar, devido a baixa produção de água residual;
- Os resíduos sólidos são mais estáveis após a fermentação e podem ser secos com facilidade;
- Condições da cultura em FES próximas as que se desenvolvem em meios naturais;
- Facilidade de aeração devido à porosidade do suporte sólido;
- Utilização direta de substratos sólidos fermentáveis;

- Volume do fermentador é muito menor do que para a cultura líquida, para uma mesma quantidade de substrato;
- Apresenta maior produtividade que a fermentação submersa;
- Produção concentrada de metabólitos;
- Menor quantidade de solventes é requerida para extração dos produtos;
- Não são necessárias as pré-culturas com idade pré-determinada como é feito para as fermentações submersas

#### *Desvantagens da FES*

- A dificuldade na transferência de calor;
- É difícil medir parâmetros como os valores do pH, quantidade de água, e de oxigênio dissolvido, quantidade de biomassa e de concentração do substrato no estado sólido;
- Necessidade de pré-tratamento do suporte;
- Diminuição do teor de umidade para as FES de longa duração;
- Determinação da quantidade ideal do teor de umidade e da atividade água para o microorganismo que será utilizado;
- A transferência de massa intrapartícula é um fator limitante;
- Dependendo das características do meio e do tipo de reator empregado, pode haver dificuldade em dissipar tanto o calor produzido como os gases gerados durante o processo, o que irá conduzir, para o primeiro caso, a elevação da temperatura em pontos localizados e, no cômputo geral, resultará em quedas sensíveis no rendimento.
- Devido à heterogeneidade do substrato, a transferência de calor e remoção de gases gerados, manipulação do meio e do produto final e controle do processo, poderá haver dificuldades intrínsecas quando se desejar realizar a ampliação de escala do sistema;
- Se for necessário o emprego da agitação do meio em fermentação, a energia despendida deverá ser bem maior que em processo submerso;
- Ainda há uma dificuldade no acompanhamento e controle do pH, temperatura, umidade, aeração e crescimento de microrganismos;

- Para evitar a esterilização do meio e visando obter o máximo rendimento, há necessidade de incorporar grande quantidade de inóculo ao substrato e posterior homogeneização do sistema;
- Há dificuldade de coleta de amostras representativas durante o processo, devido à não homogeneidade da massa em fermentação;

(DEL BIANCHI *et al.*, 2001).

### 3.1.2 Métodos de concentração de enzimas

Segundo ABRAHÃO NETO (2001), a concentração pode ser obtida por remoção de água da seguinte maneira:

- por adição de um polímero do tipo peneira molecular *Sephadex G-25*, cujos poros são muito pequenos para permitir a entrada de moléculas grandes;
- por remoção do solvente através de uma membrana semi-permeável que não permite a passagem da enzima de interesse (ultrafiltração);
- por remoção de água sob vácuo (liofilização).

No caso de enzimas extracelulares, ao término do processo fermentativo, o caldo é resfriado a 5°C, para assegurar condições de estabilidade do produto e evitar o crescimento de microrganismo contaminantes. O pH é geralmente ajustado para o valor ótimo de atuação da enzima produzida. A separação das células pode ser feita por centrifugação ou filtração. A solução clarificada contendo a enzima de interesse deve ser concentrada. A ultrafiltração tem se difundido e superado a utilização do processo de concentração por evaporação a vácuo. A disponibilidade de grande variedade de membranas com cortes de 2.000 a 300.000 Da e de módulos planos (planos, tubulares e fibras ocas) têm permitido a crescente difusão das técnicas de separação por membranas no ambiente industrial (SANT'ANNA JR., 2001).

A liofilização é um método de dessecação suave, utilizada para produção de preparações enzimáticas, vacinas, frações de plasma e hormônios. A água é sublimada a partir de uma massa de água congelada. Para a sublimação do vapor de água, é necessário que seja transferida por condução das placas aquecidas aproximadamente 680 Kcal/Kg de água na superfície de sublimação. Para facilitar a

sublimação rápida, se mantém uma pressão muito baixa e o vapor deve ser eliminado por condensação à baixa temperatura. A temperatura do sólido é regulada mediante controle da pressão na câmara de dessecação utilizando um controle muito sensível à presença de qualquer água líquida existente na massa (KASTNER SHIMIDT & GÖLKER, 1991).

### 3.2 *Streptomyces viridosporus* T7A

O solo é um importante habitat dos Streptomycetos, pois a maioria deles contém  $10^4$  a  $10^7$  unidades formadoras de colônia destes microrganismos por grama, representando de 1 a 20% ou mais do total de células viáveis. Vegetação de gramas ou solos ricos em matéria orgânica contém maiores números de streptomycetos. A maioria das espécies de *Streptomyces* crescem em pH neutro ou medianamente alcalino. No entanto, muitos relatos provam que algumas cepas crescem em pH ácido (3,5) ou alcalino (pH 8 a 11,5). Os *Streptomyces* são encontrados em altas concentrações no intestino de minhocas e artrópodes. Algumas cepas altamente celulolíticas podem ser caracterizadas do intestino do cupim (SCHREMPF, 1999).

Quanto à morfologia, as cepas de *Streptomyces* sp formam hifas aéreas e no substrato, cadeias compridas de artrosporas sobre as hifas aéreas e às vezes sobre o micélio do substrato. As cadeias de esporos exógenos se formam por fragmentação das hifas (THEILLEUX, 2000).

As bactérias do gênero *Streptomyces* têm se tornado um microrganismo de grande interesse industrial, desde a sua descoberta como produtores de antibióticos. A maioria das cepas de *Streptomyces* sintetiza substâncias antibacterianas, antifúngicas, antitumorais, antiparasitárias, herbicidas e enzimas usadas na medicina, agricultura e vários processos de interesse biotecnológico (MUTH *et al.*, 1999).

Os antibióticos são produzidos por bactérias, actinomicetos e fungos, a distribuição dentro dos grupos taxonômicos encontra-se na Tabela 1.

Tabela 1 - Grupos taxonômicos e o número de substâncias antimicrobianas produzidas

Grupo	Número de Antimicrobianos
Bactérias diferentes dos actinomicetos	950
Actinomicetos	4600
Fungos	1600

Fonte: SATO, 2001.

Somente 10 antibióticos fúngicos conhecidos são produzidos comercialmente e somente as penicilinas, cefalosporina C, griseofulvina e ácido fusídico têm importância clínica. Maior variedade em estrutura e número de antibióticos é encontrado nos actinomicetos especialmente no gênero *Streptomyces*. Outro importante grupo de substâncias é os antibióticos peptídicos, produzidos por bactérias do gênero *Bacillus*. Os *Streptomyces* sp. sintetizam várias substâncias usadas em medicina humana e veterinária, tais como: tetraciclina, estreptomicina, avermectinas, e os ionóforos (monensina, salinomicina), com efeitos sobre bactérias, endo e ectoparasitos (SATO, 2001).

CRAWFORD (1978) conseguiu comprovar pela primeira vez a decomposição da lignina feita por cepas de *Streptomyces*. A degradação da lignina por estas bactérias inclui a oxidação dos anéis aromáticos e da cadeia lateral de propano a gás carbônico (CRAWFORD *et al.*, 1983).

A lignina é um polímero complexo que consiste de unidades de fenilpropano interconectadas por uma variedade de ligações carbono-carbono e ligações éter. Na natureza, a lignina está fisicamente incrustada à celulose e é resistente à degradação por muitos microrganismos. *Streptomyces viridosporus* T7A (ATCC 39115) despolimeriza a lignina enquanto degrada a celulose e produz *acid-precipitable polymeric lignin* (APPL), solúvel em água, como o principal produto da degradação da lignina (RAMACHANDRA *et al.*, 1987). APPLs são polifenólicos e podem ser obtidos em alta concentração a partir resíduos lignocelulósicos, eles tem considerável potencial para um grande número de indústrias. Algumas aplicações industriais em potencial inclui o uso de APPLs como surfactantes, na produção de poliuretano ou precursor adesivo (CRAWFORD *et al.*, 1983) Os dados mostram que o material lignocelulósico (gramíneas) produziu mais APPLs que em outras fontes. A



produção de APPL parece estar correlacionada com a biodegradabilidade da lignocelulose utilizada (CRAWFORD *et al.*,1983).

ANTAI & CRAWFORD (1981) estudaram os efeitos da fermentação pelo *S. viridosporus* T7A em substrato lignocelulósico de gramíneas, os resultados apontaram que, após três meses de fermentação, houve degradação de 68% e 44% do carboidrato e lignina respectivamente. Mais tarde, resultados semelhantes foram obtidos por CRAWFORD *et al.* (1983) estudando o *S. viridosporus* T7A, em fermentação no estado sólido, usando material lignocelulósico de milho, após oito semanas de incubação, houve degradação de 36,2% do material. Deste, o conteúdo em carboidrato e lignina foram reduzidos em 44,4 e 19,7% respectivamente.

POMETO III & CRAWFORD (1986) verificaram que a cepa de *S. viridosporus* T7A decompõe melhor o material em meio alcalino, atingindo a máxima degradação da lignina na faixa de pH entre 8,4 a 8,8.

ADHI *et al.*(1989) estudando a produção de enzimas por *S. viridosporus* e *S. badius*, em cultivo submerso, verificou que há uma interação entre as enzimas chave, que atuam sinergicamente na degradação do substrato lignocelulósico, pois a lignina-peroxidase (0,11 U/ml), endoglucanase (0,1 U/ml) e xilanase (0,3 U/ml) alcançaram a máxima atividade simultaneamente após quatro dias de fermentação.

### 3.3 Enzimas

#### 3.3.1 Xilanase

##### *Características e aplicações*

Durante a última década, o potencial das aplicações biotecnológicas do xilano e xilanases têm sido de interesse dos pesquisadores. Os principais produtos do xilano, dos quais são de considerável importância são o furfural e o xilitol. A produção de furfural é derivada principalmente de resíduos agroindustriais, enquanto que o xilitol é obtido de resíduos da madeira. A hidrólise do xilano (xilose e oligossacarídeos) tem possíveis aplicações na indústria de alimentos, como substitutos da gordura, como um aditivo anticongelante, e também na indústria farmacêutica. Com a hidrólise, o xilano também pode ser conseqüentemente

convertido em combustível líquido, proteínas isoladas de células, solventes e adoçantes artificiais de baixa caloria (KULKARNI *et al.*, 1999).

Hemiceluloses são polissacarídeos de baixo peso molecular não celulósicos e não amiláceos, associados com a celulose e a lignina nas células das plantas. Os xilanos são os maiores componentes hemicelulósicos da madeira e das gramíneas, das quais constituem cerca de 25% da biomassa total (GEORIS *et al.*, 2000).

Na Figura 1 está esquematizada a estrutura química do xilano.

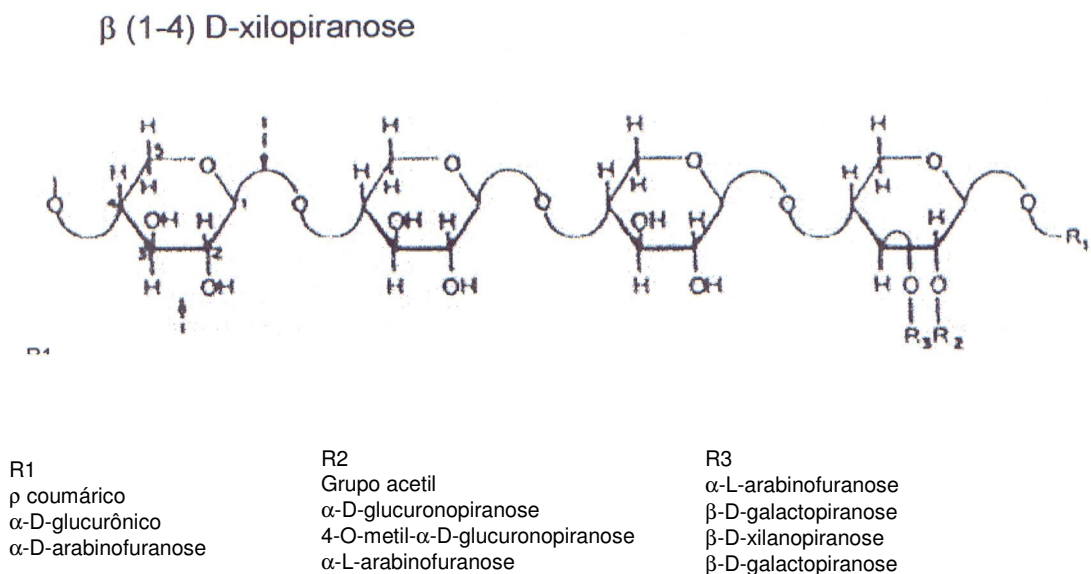


Figura 1- Estrutura química do xilano. (KULKARNI *et al.*, 1999).

As regulamentações ambientais têm colocado restrições ao uso de cloro para o processo de branqueamento do papel na indústria. O pré-tratamento com xilanase tem sido indicado para diminuir o consumo de alvejantes químicos e resultar em melhor alvura final. O branqueamento enzimático resulta da clivagem das ligações entre a lignina e o carboidrato e abre a estrutura da polpa (KULKARNI *et al.*, 1999).

A hidrólise completa do xilano requer a ação de muitas enzimas entre as quais, endo-1 $\beta$ -xilanases que são cruciais para a despolimerização (GEORIS *et al.*, 2000).

As xilanases têm um potencial de aplicação aumentando a digestibilidade do material lignocelulósico para os animais, e no branqueamento da polpa de papel

(GEORIS *et al.*, 2000). A indústria de ração para animais é um importante setor do agronegócio com produção anual de 600 milhões de toneladas de ração, mais de 50 bilhões de dólares. Do total de alimento produzido, a maior parte é para aves, suínos e ruminantes (mais de 90%), enquanto que os alimentos para animais de companhia e peixes, 10%. As celulases e hemicelulases têm grande potencial de aplicação na indústria de ração e suplementos para animais (BHAT, 2000).

$\beta$ -Glucanases e xilanases têm sido usadas com sucesso em dietas de monogástricos para hidrólises de polissacarídeos não-amiláceos (PNA) tais como  $\beta$ -glucanos e arabinosilanos. A presença de altos níveis de PNA em dietas baseadas em cereais resulta em baixa conversão alimentar e lento ganho de peso (BHAT, 2000).

Atualmente, há um grande interesse em usar preparações enzimáticas contendo altos níveis de celulases e hemicelulases para melhorar a conversão alimentar, produção de leite e ganho de peso em ruminantes (BHAT, 2000).

#### *Microrganismos produtores*

Em presença de xilano o *Streptomyces* sp. Cepa S38 secreta três xilanases (Xy11; Xy12 e Xy13) (GEORIS *et al.*, 1999).

NASCIMENTO *et al.* (2002) obtiveram produção máxima de 70,0, e 28,4 U/ml em xilano purificado de madeira e farelo de trigo como substrato, respectivamente, em fermentação submersa, pela cepa *Streptomyces* sp. AMT-3. KULKARNI *et al.*, 1999 destacam as cepas de *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Thermonospora curvata*, *Bacillus* sp.; *Streptomyces* sp. como as principais produtoras de xilanase. Também estes mesmos autores, apontam que a máxima atividade de xilanase obtida em fermentação no meio sólido foi obtida por *Schizophyllum commune* (22.700 U/g), e em *Trichoderma hamatum* foram obtidas 7.000 U/g em farelo de trigo.

Na Tabela 2 estão citados alguns microrganismos produtores de xilanase, bem como a atividade obtida em processo fermentativo.

Tabela 2 - Microrganismos produtores de xilanase

Microrganismo	Substrato	Condições Crescimento	(U/ml)	Referência
<i>Streptomyces albus</i>	1% oat spelt xylan	30°C, pH 7,6, 6 dias	12	ANTONOPOULOS, 2001.
<i>Streptomyces sp.</i> Ab106	1% bagaço de cana	55, pH 7, 5 dias	15	TECHAPUN, 2001
<i>Streptomyces chattanoogensis</i>	1% oat spelt xylan	FES	730 U/g	LOPEZ-FERNANDEZ, 1998.
<i>Streptomyces lividans</i>	1% oat spelt xylan	34°C, pH 7, 2 dias	1,05	MOROSOLI, 1986.
<i>Streptomyces raseisclereoticum</i>	1% xylan	37 °C, pH 7,5, 5 dias	16	GRABSKI, 1991.
<i>Streptomyces cuspidosporus</i>	1% oat spelt xylan	37 °C, pH7,0 , 5 dias (FES)	22	MAHESAWARI, 2000.
<i>Streptomyces sp.</i> QG -11-3	25% wheat bran	37°C, pH 7,5	2360/g	BEG,2000.
<i>Streptomyces viridosporus</i> T7A	1% oat spelt xylan	37°C, pH 8,5 - FES	8	MAGNUSON, 1997.
<i>Bacillus sp.</i> AR009	1% wheat bran	37, pH 8, 3 dias FES	621 U/g	GESSESSE, 1999.
<i>Bacillus pumilus</i>	1% xylan	45°C, pH10, 2 dias	328	DUARTE, 2000; SANTOS, 2002.
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	1% xylan	45°C, 4 dias	10,5	BRECCIA, 1995.
<i>Dictyoglamus sp.</i> B1	0,15%	70 <sup>0</sup> C, pH 8,0, 5 dias	2,3	ADAMSEN, 1995.
<i>Rhodotermus marinus</i> IT376	0,3% birch wood xylano	61°C, pH 7,5 , 4 dias	7,5	GOMES, 2000
<i>Aspergillus niger</i> KKS	1% rice straw	30°C, pH 7, 6 dias	138	KANG, 1995
<i>Aspergillus nidulans</i>	1% oat spelt xylan	37°C, pH 6,0 , 2 dias	9,75	FERNANDEZ- ESPINAR, 1992

Fonte: TECHAPUN, 2003.

### *Regulação da Produção de Xilanase*

Em geral a regulação da produção de xilanase é um fenômeno complexo e o nível de resposta para um indutor varia com o microrganismo. Os derivados dos substratos e o produto final das enzimas podem freqüentemente atuar positivamente como peça chave na indução de xilanase, eles podem também atuar como inibidor, possivelmente em altas concentrações (KULKARNI *et al.*, 1999).

O xilano, por ser um polímero de alto peso molecular, não pode penetrar a parede celular. Os fragmentos de baixo peso molecular derivados do xilano podem atuar como substâncias reguladoras da biossíntese de xilanase. Estes incluem xilose, xilobiose, xiloligossacarídeos, heterodissacarídeos de xilose e glucose e dos isômeros. Estas moléculas são liberadas do xilano por ação de pequenas quantidades de enzima produzida. A celulose tem também mostrado ação como indutor de xilanase em alguns casos. Em *Streptomyces* sp. a atividade da xilanase aumenta com a cristalinidade do substrato celulósico. O bagaço de cana é o melhor indutor de xilanase e  $\beta$ -xilosidase em *Cellulomonas flavigena*. Um efeito sinérgico na síntese de ambas as enzimas foi observado quando a celulose e hemicelulose foram usadas juntas como fonte de carbono, bem como D-xilano e metil- $\beta$ -d-xilanopirosídeo, induziu a xilanase em *Streptomyces* sp (KULKARNI *et al.*, 1999). Além disto, outros elementos, tais como vitaminas do complexo B desempenham papel importante no metabolismo da célula e conseqüentemente pode influenciar a produção (BORDIN, 1985).

A repressão catabólica pela glicose é um fenômeno comumente observado na biossíntese da xilanase. A síntese enzimática foi reprimida quando fontes de carbono facilmente metabolizáveis estavam presentes no meio de crescimento, sugerindo que a síntese da enzima é controlada por transitório estado regulador e repressão catabólica (KULKARNI, 1999).

### *Propriedades bioquímicas*

As xilanases microbianas são proteínas com massa molecular na faixa de 8 a 145 kDa. D-xilanases são usualmente estáveis numa faixa de pH entre 3 a 10 e o pH ótimo de 4 a 7 (KULKARNI, 1999).

NASCIMENTO *et al.* (2002) estudando a produção de xilanase pela cepa de *Streptomyces* sp. AMT-3, encontrou, após análise de zimograma, que a família da isoenzima apresentava peso molecular entre 170 a 700 kDa; e que a temperatura e o pH para a máxima atividade enzimática era de 6,0 e 65<sup>0</sup>C, respectivamente. Além disso, a enzima mantinha 50% da atividade durante 20 horas a 55<sup>0</sup>C. MAGNUSON & CRAWFORD (1997) purificaram uma xilanase alcalina de *S. viridosporus* T7A com peso molecular de 59 kDa.

Geralmente, as bactérias são conhecidas por produzir duas xilanases de alto peso molecular. A composição em aminoácidos de xilanases indica predominantemente ácido aspártico, ácido glutâmico, glicina, serina e treonina. A família das xilanases parece ter divergido de um ancestral comum. Tais enzimas são aptas a reter similar estrutura secundária e terciária e o mesmo resíduo de aminoácido de 20 a 50% da correspondente posição das suas seqüências primárias. O dobramento da cadeia polipeptídica é essencialmente o mesmo na família 11, com variações substanciais ocorrendo somente em cadeias externas. O grande tamanho destas proteínas pode ser explicado pela duplicação do gene ancestral original, uma ocorrência comum no gênero *Streptomyces* (KULKARNI *et al.*, 1999).

As xilanases de *Streptomyces* sp AMT-3 foram fortemente inibidas pela adição de íons cobre, manganês e ferro (NASCIMENTO, 2002).

#### *Modo de ação*

A reação de hidrólise catalizada pelas xilanases, bem como as celulasas, é precedida de um mecanismo ácido-básico envolvendo dois resíduos. O primeiro atua como um catalisador geral e protonando o oxigênio da ligação osídica. O segundo resíduo atua como um nucleofílico o qual interage com o oxocarbono intermediário ou promove a formação de um radical hidroxila da molécula de água. A reação com retenção da configuração envolve duas etapas na qual a transferência de próton acontece de um átomo de oxigênio numa posição equatorial para o centro anomérico. A reação conduzida para a inversão da configuração ocorre através de uma substituição. Provavelmente um resíduo de aminoácido (ácido/base catalítico) seja responsável em ambas as etapas de transferência de próton. As xilanases sobretudo exibem um mecanismo duplo de deslocamento, envolvendo uma enzima

glicosil intermediária a qual é formada e hidrolisada via íon oxocarbono como estado de transição (KULKARNI , 1999).

Na Figura 2 está ilustrado o mecanismo de ação das xilanases.

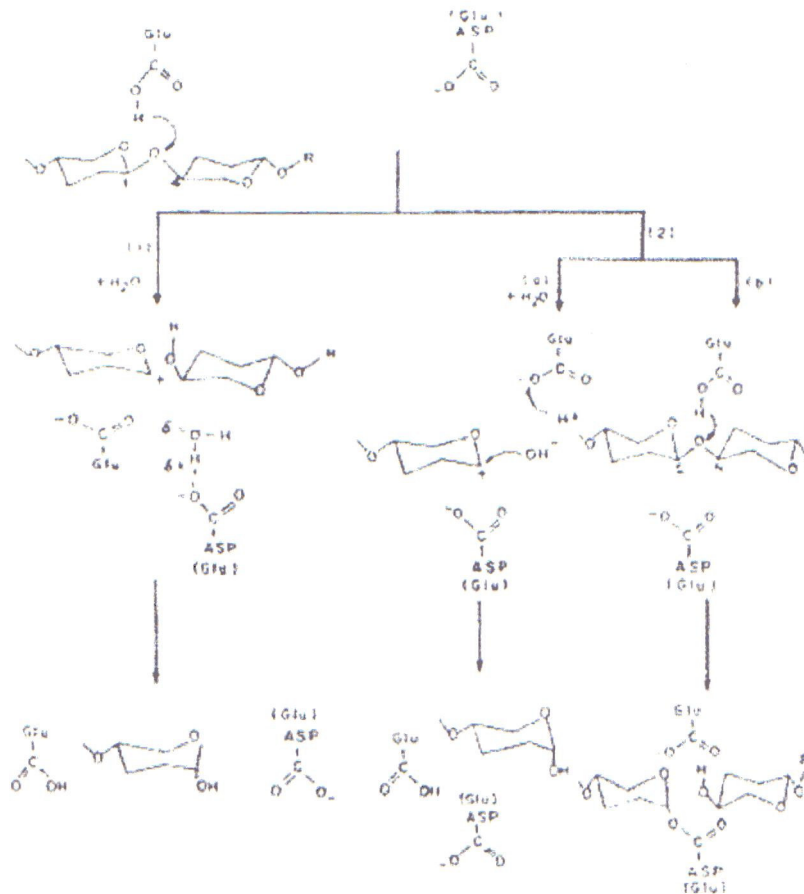


Figura 2 - Mecanismo de reação das xilanases. (1) Reação de deslocamento, envolvimento de um ácido (Glu), uma base (Asp ou Glu) e ataque por uma molécula de água nucleofílica. (2) Estabilização de um íon oxocarbonio por interação eletrostática com o carboxilato de um Asp (ou Glu) com o sítio ativo ou (b) envolvendo a formação de um intermediário covalente pelo ataque nucleofílico do Asp (ou Glu) no C-1 do açúcar (MISHRA *et al.*,1984).

### 3.3.2 Esterase

RAMACHANDRA *et al.*(1987) estudaram a produção de enzimas extracelulares pelo *S. viridosporus* T7A em substrato lignocelulósico. Dentre as enzimas estudadas, comprovou a produção de uma cumarato éster esterase, esta enzima é potencialmente importante porque há uma grande quantidade de ligações éster entre o ácido coumárico e a lignina em gramíneas.

### 3.3.3 Lignina Peroxidase

A produção de lignina peroxidase por *S. viridosporus* T7A, em substrato lignocelulósico foi comprovada por RAMACHANDRA *et al.* (1987); RAMACHANDRA *et al.* (1988); BALL (1991) e PASTI *et al.* (1990).

Peroxidase são hemoproteínas que utilizam peróxido de hidrogênio para catalisar a oxidação de ampla variedade de substratos orgânicos e inorgânicos. Elas têm peso molecular de 35.000 a 100.000 Daltons (BANCI, 1997). No entanto, RAMACHANDRA *et al.* (1988) estimaram em 17.800 Daltons o peso da peroxidase extracelular produzida pelo *S. viridosporus* T7A.

Muitas peroxidases têm sido isoladas, seqüenciadas e caracterizadas. Elas têm sido classificadas essencialmente em três classes: I – intracelulares procarióticas peroxidases; II – peroxidases extracelulares fúngicas e III peroxidase secretadas por plantas (BANCI, 1997).

RAMACHANDRA *et al.* (1987) em estudo comparativo envolvendo a produção de peroxidase de *Streptomyces* sp, verificaram que o tempo de produção de todas as cepas seguido da produção de APPL indicou que a produção de peroxidase está correlacionada com a produção de APPL, mas não teve correlação com o aumento na taxa de crescimento microbiano.

A atividade de peroxidase detectada em fermentação submersa, após quatro dias, e suplementação com 0,05% de lignocelulose foi de 0,11 U/ml (ADHI *et al.*, 1989), no entanto RAMACHANDRA *et al.* (1987) obtiveram 0,240 U/ml após 28 horas em fermentação submersa e 0,040 U/ml, após três semanas, em fermentação no estado sólido.



As peroxidases produzidas por cepas de *Streptomyces* são lignina-induzidas, possuem quatro isoformas, divididas em 2 grupos: P1 e P2 que aparecem no início da fase logarítmica de crescimento, ocorre um pico de atividade na fase estacionária e diminui a atividade no final da fase estacionária de crescimento; já o segundo grupo: P3 e P4 também aparece na fase inicial logarítmica, mas elas permanecem ativas até o final da fase estacionária (RAMACHANDRA *et al.*, 1987).

### 3.3.4 Endoglucanase

A celulose é degradada por um complexo multienzimático envolvendo pelo menos três enzimas (RAMOS, 1993):

- Exoglucanase – 1,2- $\beta$ -glucan celobiohidrolase
- Endoglucanase – endo-1,4- $\beta$ -D-glucan 4-glucanohidrolase
- $\beta$ -glucosidase

ADHI *et al.* (1989) afirmam que no processo fermentativo envolvendo cepas de *Streptomyces* há uma interação entre as enzimas chave, que atuam sinergicamente na degradação do substrato lignocelulósico, e encontraram atividade de endoglucanase de 0,1 U/ml. Já NASCIMENTO *et al.* (2002), em cultivo submerso, com a cepa de *Streptomyces* sp AMT-3, usando celulose cristalina como substrato, detectaram 0,45 U/ml de atividade.

## 3.4 Uso de Enzimas em Dieta Animal

Altos níveis de produção, eficiência e melhor conversão alimentar são características da indústria avícola. Aumentos na eficiência de produção devem estar aliados à máxima utilização do nutriente da dieta. O milho tem sido usado como o principal ingrediente para dietas de frangos, devido ao alto teor energético (JARONI *et al.*, 1999a).

O ruminante apresenta várias particularidades no seu processo digestivo, quando comparado a outras espécies animais. O estômago é multicaviário e bastante diferenciado, distinguindo-se quatro partes: rúmen, retículo, omaso e abomaso. As três primeiras partes constituem os pré-estômagos e precedem o estômago glandular ou verdadeiro (LEEK, 1996). No rúmen e no retículo estão presentes microrganismos que constituem uma flora composta por bactérias e uma

fauna de protozoários, que vivem nas seguintes condições: pH 6, temperatura de 40° C, proporções de gases: 66% CO<sub>2</sub>, 26% de CH<sub>4</sub>, 6% de N<sub>2</sub>, 1% de O<sub>2</sub> e 0,1% de N<sub>2</sub> (ROSENBERGER, 1983). Esta microbiota vive em anaerobiose, e participa do processo de fermentação do alimento ingerido produzindo ácidos graxos voláteis, que são a principal fonte de energia do ruminante (THEODOROU & FRANCE, 1993). A celulose e a hemicelulose são os dois maiores componentes das fibras vegetais, sendo digeridas pela flora ruminal (ANDRIGUETTO, 1983). Muitas bactérias que digerem as fibras são estritamente anaeróbicas (NEWBOLD, 1996). Em contrapartida a lignina, que também compõe as fibras, é resistente ao ataque da microflora e fauna, além disto, diminui a digestibilidade da hemicelulose e da celulose (BEEVER, 1993). JUNG & VOGEL (1986) afirmam que o mecanismo de inibição da digestibilidade, exercido pela lignina, é complexo.

Alguns pesquisadores têm se dedicado, no sentido de melhorar a digestibilidade dos alimentos volumosos fornecidos aos bovinos, sendo assim LEWIS *et al.* (1995) demonstraram efeitos de enzimas fibrolíticas na dieta de vacas e verificaram aumento de 1,3 Kg/dia na produção de leite. Também BEAUCHEMIN & RODE (1996) aplicaram sobre a forragem uma solução contendo xilanase, resultando em aumento na produção leiteira.

ANNISON (1997) cita a importância da ligninase produzida pelo fungo *Phanerochaete chrysosporium*, no sentido de aumentar a digestibilidade de alimentos fornecidos aos ruminantes.

Alguns microorganismos, mesmo aeróbicos, e que não compõem a flora normal do ruminante, como o *Sacharomyces cerevisiae*, têm sido empregados, NEWBOLD *et al.* (1996) afirma que esta levedura e outras bactérias aeróbicas são capazes de remover traços de oxigênio existente no interior do rúmen, isto parece favorecer a flora celulolítica do rúmen, altamente sensível ao oxigênio.

O estudo envolvendo a adição de enzimas em dietas de animais ruminantes e monogástrico para melhorar a eficiência da produção vem sendo realizado. As principais enzimas de interesse na atualidade são: celulasas, hemicelulasas, β-glucanase, xilanase e pectinase. Estas enzimas degradam alguns componentes dos cereais e fibras, melhorando o valor nutricional dos alimentos (GALANTE *et al.*, 1998).

O trigo tem sido usado como substituto para o milho em alimentos para frango, mas algumas modificações tem sido feitas por causa dos efeitos anti-nutricionais da fração não amilácea do trigo (ANNISON, 1990; WARD, 1989; JARONI *et al.*, 1999b).

A hemicelulose da dieta tem pequeno significado nutricional para animais monogástricos. Estas fibras indigeríveis aumentam a viscosidade do alimento no intestino, a qual interfere com a penetração das enzimas digestivas no bolo alimentar, na absorção do alimento e pode facilitar condições patogênicas, especialmente em frangos de corte. O uso de xilanase junto com outras hemicelulases corrige o problema e também aumenta o valor nutritivo do alimento (KULKARNI *et al.*, 1999). Portanto,  $\beta$ -glucanases e xilanases têm sido usadas com sucesso em dietas de monogástricos para hidrólise de polissacarídeos não-amiláceos tais como  $\beta$ -glucanos e arabinosilanos (COWAN, 1996). A adição de  $\beta$ -glucanase e xilanase durante a produção da ração têm aumentado a degradação e levado a importante aumento na digestão e absorção de componentes da ração, bem como aumento do ganho de peso de frangos de corte e da produção de ovos (COWAN, 1996).

Os benefícios da adição de enzimas na dieta de frangos tem também incentivado a suplementação destas enzimas nas rações para suínos. Estudos iniciais têm mostrado que o uso de  $\beta$ -glucanases aumenta a performance de suínos alimentados com rações à base de cevada (TROMKE *et al.*, 1980). No entanto, usando suínos canulados, demonstrou-se que a adição de preparações enzimáticas contendo  $\beta$ -glucanase em dietas à base de trigo e cevada aumentou a digestão de amido, lipídios e proteínas no intestino delgado como observado em frangos, mas tem pequeno efeito na digestão da fibra (GRAHAM *et al.*, 1998). Estes resultados sugerem que suínos não respondem à  $\beta$ -glucanase da mesma maneira que os frangos, provavelmente porque a viscosidade da digesta no intestino dos suínos é relativamente inafetada pelas fibras dietéticas. Apesar disto, subseqüentes estudos com preparações multi-enzimáticas contendo xilanase e  $\beta$ -glucanase mostraram benefícios na produção de suínos (BOHME, 1990). Além disto, a suplementação de xilanase em preparações multi-enzimáticas reduziu o custo da alimentação em suínos, e viabilizou o uso de alimentos de baixo custo (BHAT, 2000).

JARONI *et al.* (1999a) compararam os efeitos da suplementação de xilanase e protease em dieta composta por milho e soja, e verificaram nos lotes que receberam a suplementação com enzimas, que ovos mais pesados foram produzidos e houve melhora na eficiência alimentar.

ZHANG *et al.* (1996) concluíram que há uma alta correlação ( $r^2 > 0,9$ ;  $p < 0,05$ ) entre a concentração de xilanase na dieta e o ganho de peso em frangos de corte. Neste mesmo estudo, pode ser gerada uma equação capaz de prever o ganho de peso em função da concentração enzimática da dieta.

YANG *et al.* (2000) concluíram que a adição de 59 e 6,9 U/kg de matéria seca de alimento, de xilanase e celulase respectivamente, melhora a produção de leite e a digestibilidade da fibra alimentar.

### 3.5 Substratos Empregados na produção de Xilanases por FES

#### *Capim Napier (Pennisetum purpureum Schm.)*

É uma variedade do capim elefante, sendo uma gramínea perene, cespitosa, natural da África, que foi introduzida no Brasil por volta de 1920. É rústica, possui rizomas curtos e grossos, e crescendo livremente atinge 3 metros de altura. Em 1908, Napier divulgou esta variedade, que mais tarde recebeu seu nome. Trata-se de um capim que apresenta excelentes rendimentos por unidade de área, com alto valor nutritivo, razão pela qual tem sido bastante utilizado para exploração pecuária (PUPO, 1995).

Na análise físico-química o capim capim Napier apresenta a composição disposta na Tabela 3.

Tabela 3 - Composição físico-química do capim Napier

Elementos	Feno (antes da Floração)
Matéria Seca	88,4
Fibra Bruta	28,2
Extrato Etéreo	1,8
Proteína Bruta	12,8
Extrativos não Nitrogenados	41,2
Nutrientes Digestíveis Totais	48,2
Cálcio	0,33
Fósforo	0,25

Fonte: JARDIM (1976)

#### *Cana de Açúcar (Saccharum officinarum L.)*

A cana é uma gramínea semi-perene, cespitosa, utilizada fundamentalmente na indústria açucareira. É de origem asiática, foi introduzida no Brasil durante o período colonial por Martin Afonso de Souza. É uma planta de fácil cultivo, atinge 3 metros de altura, proporcionando grandes rendimentos de biomassa por unidade de área (PUPO, 1995).

No Brasil, 4,5 milhões de hectares de cana de açúcar são cultivados. Desse total, 55% da safra é destinada para produção de álcool e 45% para açúcar. O estado do Paraná é o segundo maior produtor de álcool de cana de açúcar do país, e a expectativa é que a produção da safra 2004 seja de 1,127 bilhões de litros de álcool e 1,6 bilhões de toneladas de açúcar (ÚNICA 2004).

Das usinas de açúcar e álcool, o bagaço de cana é o principal resíduo produzido. Estima-se que para cada tonelada de cana sejam gerados de 300 a 500 Kg de bagaço (CRISPIM & VIEIRA, 2004). O bagaço pode ser utilizado para alimentação animal, embora seja muito pobre em nutrientes, e com fibra de baixa digestibilidade; fabricação de papel; alimentação de usinas termoelétricas; etc. A análise físico-química do bagaço da cana de açúcar está disposta na Tabela 4.

Tabela 4 - Composição físico-química do bagaço de cana

Elementos	Bagaço de Cana
Matéria Seca	95,5
Fibra Bruta	46,7
Extrato Etéreo	0,4
Proteína Bruta	1,1
Extrativos não Nitrogenados	41,0
Nutrientes Digestíveis Totais	46,5
Cálcio	0,05
Fósforo	0,14

Fonte: JARDIM (1976)

#### *Soja (Glicine max (L. Merrill)*

A soja é originária da China, Manchúria e Coréia, e vem sendo utilizada há milênios como um alimento popular. A cultura difundiu-se lentamente no Oriente, sendo atualmente reconhecido o seu importante valor econômico, conquistando hoje um dos primeiros lugares entre as oleaginosas cultivadas. Numerosos fatores determinam a riqueza e a qualidade da proteína e do óleo contido nas sementes. Variedades culturais, condições climáticas e fatores geográficos. As sementes caracterizam-se pelo elevado conteúdo de proteínas (24,9% em média) e menor riqueza de substâncias gordurosas (20% em média) (COSTA, 1994).

O Brasil é um dos maiores produtores de soja do mundo, sendo o Paraná o segundo em produção nacional. Da soja, são obtidos diversos derivados, dentre eles o farelo de soja. O farelo é uma matéria-prima de baixo valor comercial (US\$ 172 por tonelada). A produção de farelo no período de safra de todo o Brasil está em torno de 1,5 milhões de toneladas por mês (ABIOVE,2004).

A composição físico-química do farelo de soja está disposta na Tabela 5.

Tabela 5 - Composição físico-química do farelo de soja

Lipídio%	Cinzas%	Umidade%	Proteína%	Açúcares%	Fibras%
1,70	5,42	12,94	44,63	30,11	5,2

GERMANO (2000)

### 3.6 Avaliação da Digestibilidade “In Vitro” de Forrageiras pelo Procedimento em duas Etapas

A técnica consiste em deixar amostras de forrageiras em contato com o conteúdo líquido de rúmen (inóculo) no interior de um tubo de ensaio, onde se tenta reproduzir as condições predominantes do rúmen-retículo (presença de microrganismo, anaerobiose, temperatura de 39<sup>0</sup>C, poder-tampão e pH de 6,9), visando repetir o que ocorre *in vivo* durante 24 a 48 horas de fermentação. A extensão dessa digestão microbiana dos carboidratos do rúmen e a taxa de digestão desses carboidratos vão determinar o valor nutritivo da forragem para o ruminante. A adição de uma segunda etapa, de 48 horas, com solução ácida de pepsina, é utilizada para desdobrar as proteínas dos microrganismos que se desenvolveram no processo fermentativo do substrato. A técnica da fermentação *in vitro* não se destina a considerar a composição química da forragem, mas principalmente, estimar a digestibilidade, além disto, esta técnica tem demonstrado correlações satisfatórias e erro padrão não muito alto, quando comparada com a digestibilidade *in vivo* (SILVA & QUEIROZ, 2002).

### 3.7 Propriedades dos Polifenóis

Os polifenóis são uma grande e diversa classe de compostos, muitos dos quais ocorrem naturalmente em muitos alimentos vegetais. O grupo dos flavonóides é maior e melhor estudado. Estes compostos possuem propriedades importantes no organismo, como antioxidantes, anti-mutagênico, anti-estrogênico, anti-carcinogênico e antiinflamatório, efeitos que podem potencialmente ser benéficos na prevenção de doenças e proteger a estabilidade do genoma.

A Tabela 6 mostra as principais classes de compostos polifenólicos e as principais fontes naturais destas substâncias.

Tabela 6 – Principais polifenóis encontrados nas plantas com efeito antioxidantes

Classe	Esqueleto básico	Exemplo	Principal fonte
Ácidos Fenólicos	C6-C1	Àc.gálico, vanílico, siríngico, tânico	Plantas superiores
Ácidos Hidrocinâmicos	C6-C3	Ác. Ferúlico, p-cumárico, caféico	Plantas superiores, parede celular das plantas
Cumarinas, isocumarinas	C6-C3	Umbeliforme, aesculetina, scopoletina	Casca da uva
Stilbenos	C6-C2-C6	Resveratrol	Casca de uva
Anthraquinonas	C6-C2-C6		
Flavonoides	C6-C3-C6	Rutina, quercetina	Chá verde
Dierilheptanos	C6-C7-C6	Curcumina, iacuquinone	
Ligninas	(C6-C3) <sub>n</sub>	A e B	Componente de certas plantas e parede celular

FERGUSON (2001)

A hidrólise da hemicelulose das plantas tais como o arabinosilano é limitado por esterificação da hemicelulose para compostos fenólicos tais como ácido ferúlico.

GARCIA *et al.*(1997) estudou a relação da atividade da xilanase com a esterase de ácido ferúlico em *Streptomyces avermitilis* e detectou uma maior atividade desta enzima com a presença de altos níveis de xilanase.

Os ácidos diferúlicos são potentes antioxidantes abundantes componentes estruturais das paredes celulares das plantas, especialmente de cereais. Contudo estes fenólicos estão ligados aos polissacarídeos da parede celular por ligações éster e não podem ser absorvidos no intestino desta forma (ANDREASEN, 2001).

A cepa *Streptomyces viridosporus* T7A é capaz de produzir, em substrato lignocelulósico compostos fenólicos derivados da lignina, tais como ácido coumárico e ferúlico (RAMACHANDRA *et al.*, 1987). Estes compostos fenólicos têm grande importância biotecnológica para produção de antioxidantes industriais (CRAWFORD, 1984), e também para uso na medicina para combater radicais livres, desta forma,



protegendo as células da lipoperoxidação, o envelhecimento e doenças degenerativas (FERGUSON, 2001).

#### *Efeitos dos polifenóis sobre a flora ruminal*

Alguns trabalhos foram feitos no sentido de avaliar os efeitos dos compostos fenólicos sobre a flora e a capacidade de digestão da fibra em animais ruminantes. Culturas *in vitro* de microrganismos da flora ruminal foram usados para determinar os efeitos do ácido cinâmico e vanílico sobre a digestibilidade da celulose e hemicelulose. O ácido cinâmico e vanílico diminuíram a taxa de desaparecimento da matéria seca da celulose de 14 a 49%. Quando o xilano foi colocado como substrato, uma diminuição de 14% na digestibilidade foi observada com a adição do ácido vanílico; contudo, o número de células xilanolíticas viáveis cultivadas da fermentação submersa foi dez vezes maior que as fermentações controle. A taxa de crescimento de *Ruminococcus albus* e *Ruminococcus flavefaciens* foi inibida mais pelo ácido p-cumárico que pela vanilina. Estes resultados sugerem que os monômeros fenólicos podem inibir a digestibilidade da celulose e xilano, possivelmente influenciando o ataque dos organismos fibrolíticos às partículas da fibra (VAREL & JUNG, 1986).

Em outro estudo, bactérias ruminais foram submetidas a várias concentrações de compostos fenólicos, para adquirir informações fundamentais da influência no crescimento e do potencial limite para utilização por monômeros fenólicos. *Ruminococcus flavefaciens* FD-1, *Butyrivibrio fibrisolvens* 49, e *Lachnospira multiparus* D-32, foram testadas contra 1,5 e 10 concentrações de ácido sinápico, seringadeído, ácido siríngico, ferúlico, vanilina, ácido vanílico, ácido coumárico, p-hidroxibenzaldeído, ácido p-hidroxibenzóico, ácido hidrocínâmico. A degradação *in vitro* da matéria seca não foi estimulada por nenhum dos compostos, o ácido cinâmico e o aldeído benzóico reduziram a digestão pela população ruminal. O ácido p-hidroxibenzóico ou p-coumárico resultou em alterações ultraestruturais das bactérias. Ambos compostos fenólicos causaram redução no tamanho das bactérias e o ácido p-coumárico causou redução no tamanho capsular e produziu bactérias pleomórficas (BORNEMAN *et al.*, 1986).

### 3.8 Cultivo de Células Animais para Testes de Toxicidade

O cultivo de células foi iniciado por Harrison em 1907 e posteriormente Carrel em 1912, como um método para estudar o comportamento das células animais livres quanto às variações sistêmicas que podem ocorrer em estados homeostáticos ou de estresse (FRESHNEY, 1994).

Testes de toxicidade com animais são freqüentemente utilizados na investigação dos efeitos da contaminação do meio ambiente. Alguns testes são limitados pelo número de animais que podem ser econômica e convenientemente estudados, por problemas em obter animais de linhagens puras e em perfeito estado fisiológico, e dificuldade de extrapolar resultados de uma espécie para outra. Um método utilizado para superar essas dificuldades é a utilização do cultivo de células, que permite a análise de grande quantidade de amostras e determina com maior especificidade a atividade do agente tóxico (KOCAN, *et al.*, 1984, *apud* SALVO *et al.*, 1999). A citotoxicidade é um complexo evento *in vivo*, onde esta expressão pode ser manifestada num amplo espectro de efeitos, da simples morte celular, como em eventos tóxicos de drogas anticancerosas em ambas as células tumorais e normais da medula óssea, pele, ou intestino. A definição de citotoxicidade poderá variar dependendo da natureza do estudo, as células podem morrer, ou simplesmente ter o metabolismo alterado. Não é possível definir todos os requerimentos do ensaio de citotoxicidade, então o estudo é concentrado nos aspectos que influenciam o crescimento ou a sobrevivência celular. No entanto, muitas substâncias não tóxicas, se tornam tóxicas após serem metabolizadas pelo fígado, e também, muitas substâncias que são tóxicas *in vitro* podem ser detoxificadas pelas enzimas hepáticas (FRESHNEY, 1994). Para o cultivo de células animais, é preciso manter a temperatura a 37<sup>0</sup>C em meio com pH 7,0-7,2. A natureza dos subprodutos do metabolismo celular tende a converter o pH do meio para a acidez, portanto deve-se usar um tampão. O mais utilizado é um sistema bicarbonato/CO<sub>2</sub> que requer aporte de CO<sub>2</sub> na estufa e bicarbonato no meio de cultivo. Como meio de cultivo e suplementos são usados comumente o meio basal de Eagle (BME) composto por sais minerais, aminoácidos, vitaminas e glicose (MORGAN & DARLING, 1993).

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Microrganismo

A cepa utilizada para o desenvolvimento deste trabalho foi adquirida na *American Type Culture Collection - Streptomyces viridosporus* T7A (ATCC 39115).

Foi mantida em agar Y/M (*yeast extract malt agar*) em tubo de ensaio a 4°C. Antes do início da fermentação a cepa foi repicada em agar contendo milho (planta integral), em frascos *Erlenmeyer*.

#### *Preparo da Suspensão de Esporos*

As células foram suspensas em 50 ml de água estéril contida em um frasco *Erlenmeyer* contendo duas gotas de Tween 80, pérolas de vidro e uma barra magnética. Por meio de um agitador magnético, deixou-se agitando por um período de 15 min para adequada suspensão dos esporos. A solução foi armazenada sob refrigeração a temperatura de 4°C em frascos *Erlenmeyer*.

#### *Contagem de esporos*

Um 1ml da suspensão de esporos foi retirado assepticamente e diluído em água estéril. Diluições sucessivas foram realizadas para a contagem dos esporos em câmara de *Neubauer* ou *Malassez*. O número de esporos número de esporos/ml foi calculado pela equação:

$$N^{\circ} \text{ total de esporos/ml} = \frac{\text{NTE} \times 1/\text{VR} \times \text{FD} \times 10^3}{\text{NRC}}$$

NTE = Número total de esporos contados em dez quadrículos

1/VR = Inverso do volume do retículo

FD = Fator de diluição

NRC = Número de retículos contados

10<sup>3</sup> = para conversão de mm<sup>3</sup> em cm<sup>3</sup>

## 4.2 Determinação da Atividade Enzimática

### *Atividade da xilanase*

A atividade da xilanase foi estimada pela determinação da liberação da quantidade de açúcar redutor de uma solução a 1% de *oat spelt xylan* (Sigma) preparada em solução tampão citrato de sódio (pH 5,0) a 50°C (BAILEY *et al.*, 1992). A quantidade de açúcar redutor liberado foi determinada pelo método do ácido dinitrosalicílico (DNS) (MILLER, 1959). Uma unidade (U) de atividade enzimática correspondeu a 1 µmol de xilose liberada por minuto medida por espectrofotometria (leitura  $A_{540\text{ nm}}$ ), baseada na curva padrão da xilose.

### *Atividade da Peroxidase*

Para a determinação da atividade da peroxidase, foi utilizada a técnica de SICHAK & DOUNCE (1986), modificada. A oxidação do L-3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA) na presença de peróxido de hidrogênio foi monitorada. O volume final de 3,0 ml da reação foi misturada com 4,0 mM de peróxido de hidrogênio, 0,1 M tampão fosfato de potássio pH (7,0) e 1,0 mM de L-DOPA e extrato bruto enzimático (300 a 600 µl). Para o branco foi adicionado todo o reagente utilizado no ensaio, no entanto, o extrato enzimático foi previamente submetido à inativação pelo calor em forno microondas. A reação foi iniciada pela adição de peróxido de hidrogênio e o aumento da absorbância  $A_{470\text{ nm}}$  foi medida por 5 minutos a 37°C.

## 4.3 Produção de Xilanase por Fermentação Submersa

### 4.3.1 Manutenção da cepa e produção do inóculo

O *S. viridosporus* T7A foi cultivado em ágar contendo o material lignocelulósico a ser fermentado. Após a esporulação, a suspensão de esporos foi obtida como descrito anteriormente no item 4.1. Estes esporos foram ativados em meio nutritivo, na temperatura de 37°C e agitação de 150 rpm, contendo: 0,6% de extrato de levedura; solução de sais (g/L) NaHPO<sub>4</sub> (5,3); K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (1,98); MgSO<sub>4</sub>

(0,2); NaCl (0,2); CaCl<sub>2</sub> (0,02) (RAMACHANDRA *et al.*, 1987). Após 48 h de ativação, as células foram utilizadas para inocular o meio a ser fermentado.

As fermentações foram conduzidas em frascos *Erlenmeyer* de 250ml em duplicata, contendo (p/v): 0,6% de extrato de levedura; solução de sais (g/L) NaHPO<sub>4</sub> (5,3); K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (1,98); MgSO<sub>4</sub> (0,2); NaCl (0,2); CaCl<sub>2</sub> (0,02); adicionado o substrato lignocelulósico moído (200 mesh), o meio foi esterilizado por 15 minutos a 121<sup>0</sup>C. Os frascos foram, inoculados com células ativadas mantidos sob agitação a 120 rpm. As primeiras fermentações foram conduzidas em condições pré-fixadas: pH 7,5; temperatura, 37<sup>0</sup>C; agitação, 120 rpm e concentração de substrato de 1% (ADHI, 1989), com o intuito de determinar em qual substrato se conseguiria a melhor atividade xilanolítica.

#### 4.3.2 Escolha do substrato

A seleção dos substratos para o estudo foi feita com base disponibilidade e baixo custo. Desta forma optou-se em testar:

- capim Napier (Fazenda Experimental – Unipar - Umuarama-Pr)
- bagaço de cana de açúcar (Usina de Álcool Santa Elisa- Pr)
- alfafa (Fazenda Experimental – Unipar – Umuarama- Pr)
- milho (planta integral) (Fazenda Experimental – Unipar- Umuarama-Pr)

#### 4.3.3 Determinação da temperatura, concentração do substrato e pH

Para estudar o efeito destas variáveis sobre o processo fermentativo, foi feito um planejamento fatorial, 3<sup>3-1</sup> nas faixas de temperatura, concentração do substrato (capim Napier) e pH, apresentadas na Tabela 7.

Tabela 7 - Estudo da influência da temperatura, concentração do substrato e do pH sobre a fermentação do *S. viridosporus* T7A, para produção de xilanase.

Amostra	Temperatura	Concentração Substrato (%)	pH inicial
1	35	0,5	5,5
2	35	1,0	8,5
3	35	1,5	7,0
4	37	0,5	8,5
5	37	1,0	7,0
6	37	1,5	5,5
7	39	0,5	7,0
8	39	1,0	5,5
9	39	1,5	8,5

Um segundo planejamento experimental fatorial  $3^{3-1}$  foi realizado para otimizar os fatores citados anteriormente, porém em níveis diferentes. Os valores utilizados neste estudo estão apresentados na Tabela 8.

Tabela 8 - Planejamento fatorial  $3^{3-1}$  para estudar o efeito da temperatura, concentração do substrato e pH sobre a fermentação do *S. viridosporus* T7A, para produção de xilanase usando capim Napier como substrato.

Amostra	Temperatura °C	Conc. Substrato (%)	pH inicial
1	35	0,50	8,70
2	35	0,75	9,70
3	35	1,00	9,20
4	36	0,50	9,70
5	36	0,75	9,20
6	36	1,00	8,70
7	37	0,50	9,20
8	37	0,75	8,70
9	37	1,00	9,70

#### 4.3.4 Fontes de nitrogênio

A influência da natureza de fontes de nitrogênio (uréia 0,80g/l; farelo de soja a 1% e extrato de levedura a 0,6%) foi comparada, visando maiores atividades de xilanase.

#### 4.3.5 Influência da suplementação com vitamina do complexo B

Compararam-se os efeitos da suplementação com vitaminas do complexo B: Cianocobalamina 25 µg/ml; Tiamina 0,005g/ml; Piridoxina (B6) 0,0005g/ml) adicionada a 0,05% e 0,1%, comparando-se com uma fermentação controle (sem adição de vitaminas).

#### 4.3.6 Suplementação com sais

O efeito da suplementação com sais, sobre a fermentação submersa também foi estudado usando um planejamento fatorial  $10^{16-5}$ . Neste estudo foi avaliado o efeito da presença e ausência dos seguintes sais: (g/ml)  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (0,053);  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (0,002);  $\text{MgSO}_4$  (0,0002);  $\text{NaCl}$  (0,0002) ;  $\text{CaCl}_2$  (0,00002); e solução de  $\text{ZnSO}_4$ ;  $\text{FeSO}_4$ ;  $\text{CuSO}_4$ ;  $\text{MoSO}_4$ ;  $\text{MnSO}_4$  contendo 0,020 g de cada elemento em 100 ml adicionado a 1% (v/v) sobre a fermentação (RAMACHANDRA *et al.*, 1987).

A Tabela 9 mostra o planejamento fatorial utilizado para este estudo.

Tabela 9 - Estudo do efeito da presença e ausência de sais sobre a produção de xilanase, em Planejamento fatorial  $10^{16-5}$ .

Ensaio	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	MgSO <sub>4</sub>	NaCl	CaCl <sub>2</sub>	ZnSO <sub>4</sub>	FeSO <sub>4</sub>	CuSO <sub>4</sub>	MoSO <sub>4</sub>	MnSO <sub>4</sub>
1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+
3	+	+	-	+	-	-	-	+	-	+
4	+	+	-	-	-	+	+	-	+	+
5	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-
6	+	-	+	-	-	+	-	+	+	-
7	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-
8	+	-	-	-	+	-	+	+	-	-
9	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-
10	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-
11	-	+	-	+	+	-	+	-	+	-
12	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-
13	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+
14	-	-	+	-	+	+	+	-	-	+
15	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+
16	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+

#### 4.3.7 Influência da suplementação com hidroxietilcelulose (HEC)

Fez-se um estudo comparativo sobre o efeito da suplementação da HEC sobre o processo fermentativo a 0,1%, comparando-se com fermentação controle (sem adição de hidroxietilcelulose).

#### 4.3.8 Suplementação com farelo de soja, vitaminas do complexo B e Hidroxietilcelulose

Neste experimento objetivou-se otimizar os níveis adequados para suplementar com farelo de soja, vitaminas do complexo B (Cianocobalamina 25mcg/ml; Tiamina 0,005g/ml; Piridoxina (B6) 0,0005g/ml) (BORDIN, 1995), e de



hidroxietilcelulose (KULKARNI *et al.*,1999), sobre a fermentação submersa. O planejamento experimental está apresentado na tabela 10.

Tabela 10 - Planejamento fatorial  $3^{3-1}$  para estudar o efeito de diferentes níveis de suplementação com farelo de soja, de vitamina do complexo B e hidroxietilcelulose, sobre a atividade xilanolítica da fermentação por *S. viridosporus* T7A em capim Napier como substrato.

Amostra	Farelo Soja%	Vit. B%	HEC%
1	0,5	0,1	0,10
2	0,5	0,2	0,20
3	0,5	0,3	0,15
4	1,0	0,1	0,20
5	1,0	0,2	0,15
6	1,0	0,3	0,10
7	1,5	0,1	0,15
8	1,5	0,2	0,10
9	1,5	0,3	0,20

#### 4.3.9 Efeito da taxa de inoculação

A taxa de inoculação foi estudada, em níveis de 5, 10, 15 e 20%, usando as células ativadas, usando capim Napier como substrato (1%) e farelo de soja (1%), durante 48 horas com agitação em *shaker* (RAMACHANDRA *et al.*, 1987).

#### 4.3.10 Produção de xilanase em bioreator tipo bancada

Após o estudo de otimização das condições físico-químicas, realizou-se a produção de xilanase em biorreator de bancada. O biorreator utilizado tem capacidade para 1,5 litros (Inteltech –LH –SGi). Os fatores físicos foram ajustados para: pH 8,6; temperatura de 37<sup>0</sup>C e, a aeração foi mantida por um compressor e agitação de 250 rpm.

#### 4.3.11 Produção do extrato enzimático concentrado

##### *Ultrafiltração*

O processo fermentativo foi conduzido por 48 horas. Após a sedimentação, a porção sobrenadante foi submetida à ultrafiltração, em três etapas:

1- Correção do pH para 5,5

Isto era necessário para que não houvesse adesão de proteínas na membrana.

Para a correção foi utilizado solução de HCl 0,1N;

2- Ultrafiltração

Feita em equipamento (Inteltech –LH –SGi) em membrana de 30 kDa.

3 - Neutralização do pH

O pH do ultrafiltrado foi neutralizado com solução de NaOH 0,1N.

##### *Liofilização*

Para liofilizar, o ultrafiltrado era primeiramente congelado por 12 horas, e depois submetido à liofilização (liofilizador Ferroni Fauvel – LH 1500).

#### 4.4 Produção de Xilanase por Fermentação no Estado Sólido

Os primeiros ensaios foram conduzidos em frascos *Erlenmeyer*, utilizando bagaço de cana (70%), capim Napier (20%) e farelo de soja (10%) como substrato. O pH foi ajustado para 8,6 com solução de NaOH a 10%. Os frascos foram tampados com algodão e, em seguida esterilizados por 15 minutos a 121<sup>0</sup>C. O substrato foi inoculado com 10 ml da suspensão de células previamente ativadas em *shaker* (item 4.3.1) por grama de substrato.

##### 4.4.1 Definição da composição do substrato

Para o estudo da melhor composição do substrato foram usados três componentes; o bagaço de cana, capim Napier, e farelo de soja, que neste estudo permaneceu com proporção fixa, conforme a Tabela 11.

Tabela - 11 Otimizações das proporções de bagaço de cana e capim Napier para a produção de xilanase de *S. viridosporus* T7A, no estado sólido.

Substrato	%									
Bagaço	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
Capim Napier	80	70	60	50	40	30	20	10	0	0
Farelo soja	10	10	10	10	10	10	10	10	10	0

#### 4.4.2 Método de inoculação e tempo de fermentação

Este estudo foi realizado usando como inóculo uma suspensão de esporos ou de células ativadas, obtidas conforme procedimento descrito para produção de inóculo em fermentação submersa (item 4.3.1). O estudo foi conduzido em vários frascos *Erlenmeyer* correspondendo ao tempo de fermentação e método de inoculação: 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192 horas. Em cada tempo, a atividade da xilanase foi mensurada.

#### 4.4.3 Influência do tratamento térmico sobre a produção de xilanase

O substrato foi submetido a diferentes tratamentos. A esterilização por 15 minutos a 121°C e o cozimento em vapor fluente, por 60 minutos a 100°C seguido de esterilização por mais 15 minutos a 121 °C.

Fermentações foram lançadas, e a atividade da xilanase foi determinada para verificar a influência destes fatores sobre a produção.

#### 4.4.4 Otimização da umidade e aeração

O estudo do efeito da umidade e aeração sobre a produção de xilanase foi realizado em biorreator tipo coluna de Raimbault, com o suporte de um planejamento experimental do tipo 2<sup>2</sup> com ponto central. As condições testadas estão mostradas na Tabela 12.

Tabela 12 - Planejamento fatorial  $2^2$  com ponto central e uma repetição para estudar os efeitos da umidade e aeração sobre a produção de xilanase em fermentação no estado sólido pelo *S. viridosporus* T7A

Ensaio	Umidade g/g	Aeração ml/g/min
1	8	120
2	8	60
3	6	120
4	6	60
5	7	80

#### 4.4.5 Análise respirométrica

A biomassa foi estimada por análise respirométrica. A exaustão do ar saturado do biorreator produziu gás efluente que passou através de uma coluna contendo sílica gel e foi analisado por cromatografia gasosa (Shimadzu GC-8A) para determinar a concentração de  $O_2$  e  $CO_2$ , que foram correlacionados com a síntese de biomassa.

O balanço de massa foi feito por estimativa da taxa de oxigênio consumida e  $CO_2$  liberada, em termos de vazão volumétrica (L/h), desprezando-se a contribuição do vapor d'água. Se a vazão volumétrica de saída de ar ( $F_{sai}$ ) é conhecido e o fluxo de entrada é  $F_e$ , a seguinte equação foi considerada:

$$V_{O_{2sai}} = \frac{\%O_{2sai}}{100} \times F_{sai} \quad (1)$$

$$V_{CO_{2sai}} = \frac{\%CO_{2sai}}{100} \times F_{sai} \quad (2)$$

$$F_{sai} = V_{O_2} + V_{CO_2} + V_{N_{2sai}} \quad (3)$$

É sabido que:

$$VN_{2E} = \frac{79 \times F_E}{100} \quad (5)$$

$$VN_{2E} = V N_{2sai} \quad (6)$$

Então, a seguinte equação se refere à vazão volumétrica na entrada e de saída

$$F_e = \frac{(100 - \%O_{2sai} - \%CO_{2sai}) \times F_{sai}}{79} \quad (7)$$

O balanço de massa para o oxigênio é dado em função da avaliação do fluxo volumétrico do  $O_2$  consumido:

$$VO_{2CONS.} = \frac{21 \times F_E - \%O_{2SAI} \times F_{sai}}{100} \quad (8)$$

Para estimar o taxa de consumo de  $O_2$  (TCO) em em termos do fluxo de unidade de massa (mol/h), foi considerado o comportamento de gás ideal em relação ao fluxo volumétrico ( $VO_{2CONS}$  and  $V_{CO_2}$  liberado ) e foram efetuadas correções para as condições de temperatura.

Considerando o balanço da taxa de consumo de oxigênio, a seguinte equação foi obtida (PANDEY *et al.*, 2001)

$$X_n = \left\langle Y_{X/O} \Delta t \left\{ \frac{1}{2} \left[ \left( \frac{dO_2}{dt} \right)_{t=0} + \left( \frac{dO_2}{dt} \right)_{t=n} \right] + \sum_{i=1}^{i=n-1} \left( \frac{dO_2}{dt} \right)_{t=i} \right\} + \left( 1 - \frac{\alpha}{2} \right) X_0 - \alpha \sum_{i=1}^{i=n-1} X_i \right\rangle / \left( 1 + \frac{\alpha}{2} \right) \quad (9)$$

Onde :

$$\alpha = m_x y_{X/O} \Delta t$$

Dos resultados da taxa de consumo de oxigênio e produção de CO<sub>2</sub>, alguns parâmetros do bioprocesso podem ser estimados. A estimativa da biomassa num dado tempo ( $X_n$ ) é calculada baseada no consumo de oxigênio ( $y_{x/o}$ ) e o coeficiente de manutenção da biomassa ( $m_x$ ). O *software* FERSOL foi utilizado para os cálculos (RODRÍGUEZ-LEÓN *et al.*, 1988).

#### 4.4.6 Variação de escala

##### *Produção de xilanase em biorreator tipo Bandeja*

O biorreator tipo bandeja utilizado foi construído em madeira e tela de nylon na parte inferior, com dimensão de 100 x 50 x 10 cm. O substrato a ser fermentado, constituído de 70% de bagaço-de-cana, 20% de capim Napier e 10% de farelo de soja, adicionado de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.064 g/g, foi previamente esterilizado em autoclave por 15 minutos à 121<sup>0</sup>C. O pH foi corrigido para 8,6 usando solução de NaOH 10%. O substrato foi inoculado com suspensão contendo 10<sup>7</sup> esporos/g. Foram testadas três diferentes alturas do leito de fermentação (2, 4 e 8 cm). O leito era revirado, cerca de seis vezes ao dia, e borrifado com água esterilizada, com o objetivo de garantir a oxigenação e umidade do substrato.

Na Figura 3 está ilustrado o bioreator tipo bandeja, utilizado para variação de escala.



Figura 3. Fotografia ilustrativa do biorreator tipo Bandeja utilizado no estudo de escalonamento para produção de xilanase de *S. virisporus* T7A, por fermentação no estado sólido.

*Produção de xilanase em biorreator tipo tambor horizontal*

O processo foi mantido a 37°C, e umidade de 85% com pH inicial 8,6, em meio nutritivo e inoculação idênticos àqueles usados na fermentação em biorreator tipo bandeja. A agitação era feita por meio de um eixo acoplado a um motor, cerca de seis vezes ao dia. Também era feita aeração forçada, impulsionada por um compressor de ar, sendo que este era previamente aquecido passando por uma serpentina imersa em banho-maria. A Figura 4 ilustra o esquema de funcionamento do biorreator tipo tambor horizontal.

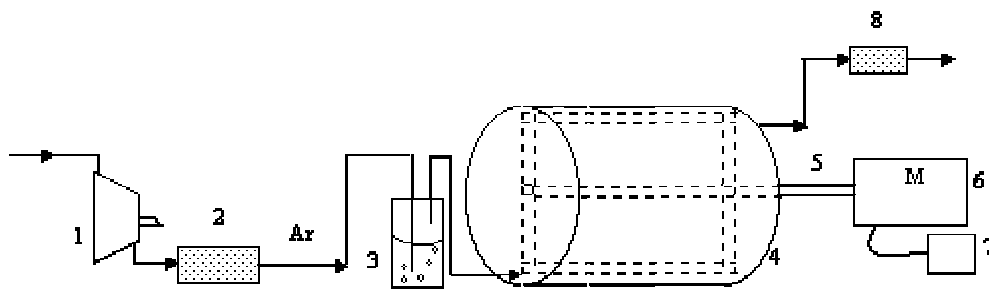


Figura 4 – Biorreator tipo tambor horizontal e equipamentos auxiliares: (1) compressor, (2) filtro de ar, (3) umidificador, (4) ,biorreator tipo tambor horizontal(5) eixo, (6) motor, (7) controle de velocidade, (8) filtro de ar.



Figura 5 - Fotografia ilustrativa do biorreator tipo tambor horizontal utilizado no estudo de escalonamento para produção de xilanase de *S. virisporus* T7A, por fermentação no estado sólido.



#### 4.5 Delineamento Experimental e Análise Estatística

Para o estudo foi utilizado o planejamento experimental fatorial, utilizando o programa STATISTICA<sup>®</sup>, para a análise de resultados e construção de gráficos.

Para a análise dos efeitos do extrato bruto enzimático na dieta de camundongos, de frangos para corte e na digestibilidade *in vitro* foram utilizados os testes de Bonferroni; de ANOVA e de Tuckey respectivamente.

#### 4.6 Atividade Antimicrobiana

##### *Determinação qualitativa da atividade antimicrobiana*

O extrato enzimático testado foi obtido por fermentação no estado sólido, seguindo o procedimento de produção previamente estudado. O pH do extrato bruto enzimático foi neutralizado com HCl 0,1M.

As cepas utilizadas para o experimento foram as seguintes:

- Bactérias Gram negativas: *Salmonella* sp, *Pseudomonas* sp e *E. coli* – cepas causadoras de intoxicação alimentar em humanos.
- Bactérias Gram positivas: *Staphylococcus* sp, *Streptococcus* sp. cepas causadoras de mastite contagiosa em bovinos e intoxicação alimentar em humanos.

Após serem repicadas em agar sangue, as bactérias foram diluídas em solução salina, seguindo o padrão da escala de *Mc Farland* ( $1 \times 10^9$  células/ml). Com um *swab*, as cepas foram semeadas sobre toda a superfície do agar contendo meio de Mueller-Hinton. O produto da fermentação foi colocado em orifícios de 0,5 cm feitos no agar. Ao mesmo tempo, discos comerciais com antimicrobianos, usados para avaliação de antibiograma (doxaciclina, cefalosporina, gentamicina, sulfa, norfloxacina, penicilina) foram colocados na mesma placa, para estudo comparativo.

As placas foram incubadas por um período de 12 a 24 h, e o halo de inibição sobre o crescimento bacteriano pode ser avaliado.

### *Determinação quantitativa da atividade antimicrobiana*

Para este estudo foi utilizada uma cepa de *S. aureus*. Uma suspensão bacteriana foi obtida ( $1 \times 10^9$  UFC/ml). As placas para avaliar o efeito inibitório foram preenchidas com agar Manitol e o extrato bruto enzimático obtido por fermentação de *S. viridosporus*, nas seguintes proporções: 21,6 g de meio manitol; 200 ml de água destilada e 0,216 g de extrato bruto enzimático (seco). Um controle foi feito contendo as mesmas proporções de meio, no entanto, sem o extrato bruto enzimático. As placas (9 cm de diâmetro) foram semeadas com 100µl do inóculo (*S. aureus*) nas seguintes diluições:  $10^{-1}$ ;  $10^{-2}$ ;  $10^{-3}$ ;  $10^{-4}$ . Após 24 horas de incubação em estufa a 37<sup>0</sup> C, foi feita a contagem de colônias.

## 4.7 Testes de Inocuidade

### *Cultivo celular*

Os testes de citotoxicidade foram feitos para avaliar se o extrato bruto enzimático de *S. viridosporus* T7A poderia apresentar efeitos tóxicos indesejáveis, já que o objetivo é aplicar em dietas de animais. Para realizar este estudo, testou-se o extrato bruto enzimático em três tipos de células: MDBK (*MADIN; DARBY BOVINE KIDNEY – ATCC – CCL-22*); PK<sub>15</sub> (*PORCINE KIDNEY 15- ATCC- CCL-33*) e células VERO (*Cercopithecus aethiops, MONKEY AFRICAN GRENN ATCC- CCL-81*

As células foram mantidas em meio F10+ 199 (Sigma), enriquecido com soro fetal bovino. A esta solução foram adicionados antibióticos (1,25 µg/ml de anfotericina B + 200 µg/ml de sulfato de estreptomicina +10 µg/ml de enrofloxacina) e uma solução contendo o extrato bruto enzimático, em quantidade que variou em função da diluição testada.

O cultivo celular foi lavado com solução salina (PBS), em seguida com solução de tripsina 0,02% para suspender o cultivo celular. Depois disto, com o meio F10+199 (Sigma), as células foram colocadas em microplaca de poliestireno para cultivo celular, composta por 96 poços. Em cada poço foram colocados 100µl do meio contendo cerca de  $15 \text{ a } 30 \times 10^3$  células. O cultivo foi mantido por 30 dias, em estufa a 37 °C com 5% de CO<sub>2</sub> e umidade relativa maior que 80%. Nestas

condições, avaliaram-se, ao microscópio ótico, pelo menos uma vez ao dia, as alterações da morfologia celular, viabilidade celular, estado da monocamada, longevidade celular e morte celular.

### *Camundongos*

Para este teste foram utilizados 60 (sessenta) animais, machos, da mesma idade, e peso uniforme; divididos em 3 lotes com 10 animais cada, com uma repetição. Os animais foram mantidos em gaiolas especiais, contendo cama de maravalha, ração especial para camundongos e água. Os animais testados e os do grupo controle foram mantidos na mesma sala, em condições semelhantes. Os animais foram tatuados na cauda, e foram submetidos a pesagens individuais a cada sete dias. Os animais foram agrupados da seguinte forma:

Lote 1 – controle (sem adição de extrato de Fermentação)

Lote 2 – recebeu extrato de fermentação sólida (bruto) 1/ 100 na água de bebida

Lote 3 – recebeu extrato de fermentação sólida (bruto) 1/1000 na água de bebida

Os animais foram mantidos em gaiola apropriada, durante 30 dias.

## 4.8 Inclusão em Dieta Animal

### *Frango para corte*

O extrato bruto enzimático seco foi finamente moído (200 mesh) e misturado à ração testada.

Oitenta pintainhos de 1 dia, linhagem para corte, foram separados em três grupos, e uma repetição, sendo:

Grupo 1 – controle (sem a adição de extrato de fermentação);

Grupo 2 – ração com 0,1% de extrato bruto enzimático seco;

Grupo 3 – ração contendo 0,05% de extrato bruto enzimático seco.

Os animais foram alojados em gaiolas, altas do chão, receberam água e ração à vontade. Semanalmente os animais eram pesados um a um sendo os valores de conversão alimentar (CA) e ganho de peso (GP) calculados da seguinte forma:

- $CA = \text{Ração consumida (tempo } x) / \text{Ganho de Peso (tempo } x)$
- $GP = \text{Peso final (tempo } x) - \text{Peso inicial (tempo } x)$

As aves foram abatidas aos 42 dias de idade.

### *Digestibilidade “in vitro” da Matéria Seca*

O processo de digestibilidade *in vitro* pode ser utilizado para simular a digestão em ruminantes. A flora do pré-estômago do ruminante é retirada através animais fistuados cirurgicamente. A flora obtida por filtração do conteúdo estomacal serve como inóculo para fazer o processo de fermentação do material a ser estudado (capim Napier), mantido em temperatura e pH controlado.

O estudo foi realizado da seguinte forma:

A amostra de capim Napier foi parcialmente seca (80-92% de MS), moída, selecionada com peneira de 1mm e determinada a MS (105°C). Pesou-se 0,5g da amostra, em triplicatas, deixando quatro tubos vazios para o branco.

Uma solução tampão de McDougall foi preparada recentemente e borbulhada com CO<sub>2</sub> para corrigir o pH a 6,9. Em cada tubo foi adicionado 40 mL desta mistura e mantidos em banho a 39°C. A solução é preparada da seguinte forma: 1 litro de H<sub>2</sub>O destilada; NaHCO<sub>3</sub> (9,8 g); Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O (7,0 g ou 3,69 anidro); KCl (0,57 g); NaCl ( 0,47 g); MgSO<sub>4</sub> · 7 H<sub>2</sub>O (0,12 g); CaCl<sub>2</sub> (0,04 g); Uréia (0,20 a 0,80 dependendo do conteúdo de nitrogênio do material). De uma solução 4% (4g CaCl<sub>2</sub> / 100 ml H<sub>2</sub>O / 100 ml de H<sub>2</sub>O) adicionou-se 1ml / litro antes de usar.

O fluido do rúmen foi retirado de um animal (bubalino), através de fístula ruminal, mantidos em jejum alimentar e hídrico durante uma hora antes da coleta. O fluido foi transportado ao laboratório em garrafa térmica e filtrado em quatro camadas de gaze.

O conteúdo foi mantido sob agitação e 10 ml do fluido (previamente filtrado) foram adicionados em cada tubo. Os tubos retornaram ao banho de 39,0°C, introduzindo-se CO<sub>2</sub> sem borbulhar e fechados imediatamente. Os tubos eram levemente agitados após a inoculação e repetida a operação duas vezes no 1º dia e três vezes no 2º dia.

Após 48 horas de inoculação foi feita a acidificação: adicionando em cada tubo 2 ml de HCL a 40% e 5 ml de solução aquosa de pepsina a 4% (atividade

1:10.000). Os tubos retornaram ao banho por mais 48 horas, com agitação periódica como na 1ª fase. Após esse período o conteúdo foi filtrado a vácuo, e lavado duas vezes com água destilada, em cadinhos de Goosh previamente secos e pesados.

Os cadinhos foram colocados na estufa a 105°C até atingirem peso constante, resfriados em dessecador e pesados.

Para o cálculo da digestibilidade da matéria seca *in vitro* os seguintes valores foram tomados:

A – peso da amostra (g)

B - % de MS da amostra

D – peso do cadinho vazio (g)

E – peso do cadinho + resíduo (g)

Cálculos

$$G - \text{MS da amostra} = \frac{A \times B}{100}$$

$$H - \text{MS do resíduo da amostra} = E - D$$

$$I - \text{MS do resíduo do branco} = E - D \text{ (média de 4 tubos)}$$

$$\text{Digest. "In Vitro" da MS\%} = \frac{G - (H - I)}{G} \times 100$$

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Produção de xilanase por fermentação submersa

Nesta etapa do trabalho fez-se o estudo para avaliar os efeitos de fatores físico-químicos envolvidos na produção de xilanase por *Streptomyces viridosporus* T7A . Os primeiros ensaios foram realizados para a escolha de substrato, levando em consideração o fator custo e a disponibilidade.

#### 5.1.1 Escolha do substrato

A cepa de *S. viridosporus* T7A apresentou boa adaptação em meio preparado com material lignocelulósico. A Figura 6 ilustra o desenvolvimento do microrganismo em Agar contendo extrato de milho (planta integral).

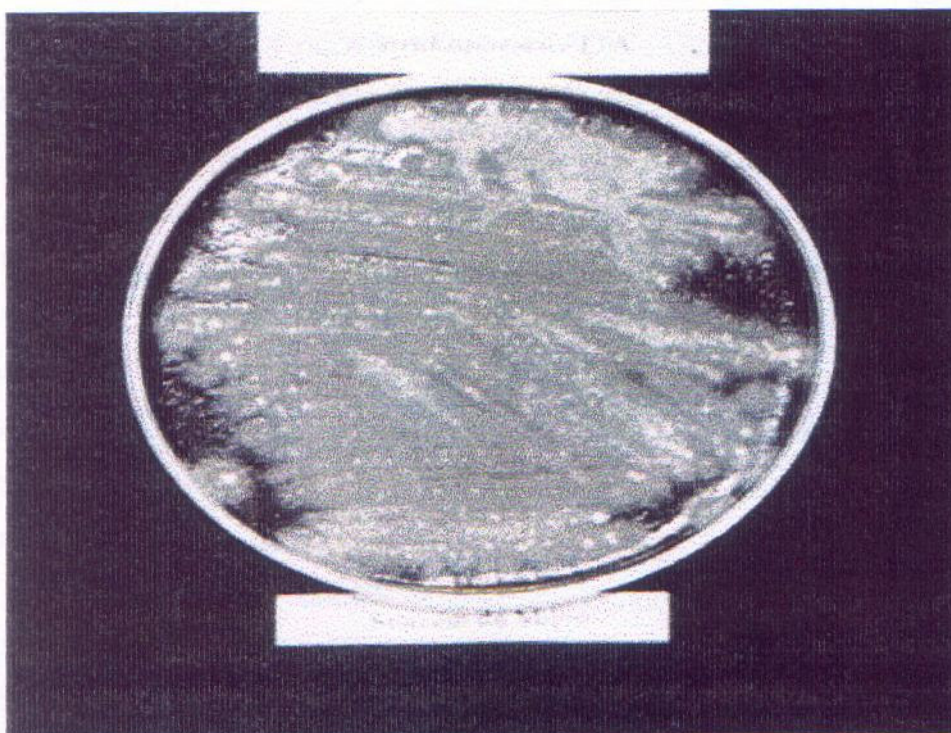


Figura 6 - Fotografia ilustrativa do cultivo de *S. viridosporus* T7A em meio sólido composto por material lignocelulósico (milho – planta)

Na seqüência, a avaliação da produção da xilanase foi comparada entre os substratos lignocelulósicos estudados.

As atividades enzimáticas obtidas utilizando diferentes substratos estão apresentadas na Tabela 13.

Tabela 13 - Atividade xilanólítica obtida em diferentes substratos naturais por fermentação submersa de *S. viridosporus* T7A conduzida em frascos de *Erlenmeyer*

Substrato	Atividade U/ml
Capim Napier	3.76
Milho (planta integral)	3.17
Bagaço-de-cana	1.89
Feno alfafa	0.86

Neste experimento verificou-se que dentre todos os substratos naturais testados, o capim Napier proporcionou a melhor atividade enzimática (3,76 U/ml). Este resultado é superior àquele obtido por ADHI (1989), de 0,3 U/ml de xilanase. O bagaço de cana é um importante resíduo agroindustrial utilizado como substrato para produção de xilanase (KULKARNI, 1999; TECHAPUN, 2001). No entanto, neste teste, o capim Napier superou em 98% a produção obtida com o bagaço de cana (1,89 U/ml). Já o feno de alfafa, como substrato proporcionou a menor produção de xilanase (0,86 U/ml). A alfafa é um alimento volumoso considerado de alto valor nutritivo para os animais sendo que o motivo da baixa produção poderia ser explicado pelo alto teor em açúcares redutores, o que pode causar inibição da produção da xilanase (KULKARNI, 1999). Em boa parte dos estudos publicados sobre a produção de xilanase utiliza-se xilano purificado.

Neste ensaio, o capim Napier proporcionou maior produção que a obtida por MOROSSOLI (1986) e ADAMSEN (1995) com *Streptomyces lividans* (1,05 U/ml) e *Dictyoglanus* sp B1 (2,3 U/ml), respectivamente, usando xilano de aveia purificado (*oat spelt xylan*) como substrato. Não foram encontradas referências na literatura sobre o uso do capim Napier em processo fermentativo para a produção de xilanase. No entanto, os resultados mostram que este substrato tem aplicação promissora

para a produção desta enzima, pois é uma fonte de carbono de fácil obtenção, de baixíssimo custo e que pode proporcionar bons níveis de atividade de xilanase.

### 5.1.2 Determinação do efeito da temperatura, concentração do substrato e do pH em fermentação submersa.

A produção da xilanase foi incrementada após estudos voltados para avaliar o efeito da temperatura, concentração do substrato e do pH. Estes fatores foram estudados em dois experimentos, que estão detalhados a seguir.

#### *Planejamento experimental 1*

Os níveis de pH, temperatura e concentração de substrato foram testados neste experimento. Os resultados estão apresentados na Tabela 14.

Tabela 14 - Planejamento fatorial  $3^{3-1}$  para estudo dos efeitos temperatura, concentração de substrato e pH inicial analisados sobre a produção de xilanase por fermentação submersa por *S. viridosporus* T7A

Amostra	Temperatura	Conc. Substrato (%)	pH inicial	Atividade U/ml
1	35	0,5	5,5	2,86
2	35	1,0	8,5	4,20
3	35	1,5	7,0	1,50
4	37	0,5	8,5	3,12
5	37	1,0	7,0	3,03
6	37	1,5	5,5	0,70
7	39	0,5	7,0	4,14
8	39	1,0	5,5	2,97
<b>9</b>	<b>39</b>	<b>1,5</b>	<b>8,5</b>	<b>4,20</b>

A máxima atividade xilanásica observada neste ensaio foi de 4,2 U/ml, que foi obtida em fermentações cujo pH inicial era de 8,5 e a concentração de substrato em torno de 1%. Já em pH inicial ácido (5,5), a atividade da xilanase foi menor (0,70



U/ml). O pH final da fermentação observado variou de 7,1 a 8,7. Mesmo com pH inicial ácido (pH), o processo fermentativo evoluiu para meio alcalino, indicando que valores mais altos de pH são importantes para o microrganismo e para a produção de xilanase. Também foi possível observar que em temperaturas mais elevadas foi obtido melhor resultado (4,2 U/ml).

Na Figura 7 o gráfico de Pareto esquematiza o efeito da temperatura, pH e concentração de substrato sobre a produção de xilanase.

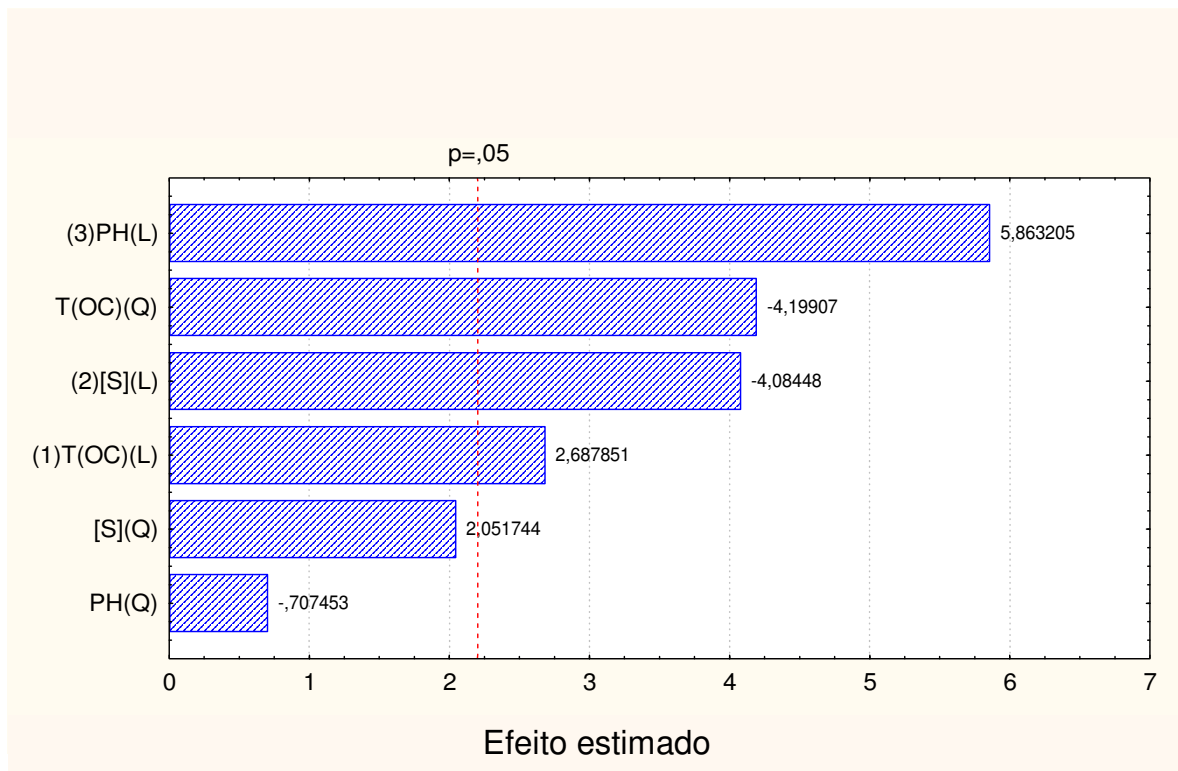


Figura 7 - Efeito do pH, temperatura e concentração do substrato sobre a produção de xilanase por *S. viridosporus* T7A em fermentação submersa

O coeficiente de regressão obtido neste experimento foi de 0,885, considerado um resultado satisfatório. Todas as variáveis exerceram influência significativa sobre a produção de xilanase ( $p < 0,05$ ). Entre os fatores estudados o pH foi o que mais teve influência, indicando que pH alcalino proporciona melhor produção enzimática (4,2 U/ml). A temperatura exerceu efeito positivo, pois em nível mais alto proporcionou melhor produção de xilanase (4,2 U/ml). Já a concentração do substrato exerceu efeito negativo sobre a fermentação em nível superior a 1 %.

Com o intuito de manter as condições próximas das ideais para o processo fermentativo, foi conduzido um segundo experimento. Desta forma, pôde-se avaliar a concentração do substrato (%) em níveis mais baixos e o pH em níveis mais altos. Com relação a temperatura, optou-se por utilizar a temperatura limite de 37°C por razões operacionais.

### *Planejamento experimental 2*

Na Tabela 15 estão sumarizados os níveis testados no planejamento fatorial  $3^{3-1}$  para estudo da temperatura, concentração do substrato e pH para a produção de xilanase.

Tabela 15 - Planejamento fatorial  $3^{3-1}$  para o estudo dos efeitos da temperatura, concentração de substrato e pH analisados sobre a produção de xilanase fermentação submersa por *S. viridosporus* T7A.

Amostra	Temp.	Conc. Substrato (%)	pH inicial	Atividade U/ml
1	35	0,50	8,70	1,65
2	35	0,75	9,70	3,10
3	35	1,00	9,20	2,95
4	36	0,50	9,70	1,74
5	36	0,75	9,20	2,47
6	36	1,00	8,70	4,01
7	37	0,50	9,20	3,01
8	37	0,75	8,70	3,96
<b>9</b>	<b>37</b>	<b>1,00</b>	<b>9,70</b>	<b>4,09</b>

Neste experimento verificou-se que a maior atividade de xilanase obtida foi de 4,09 U/ml, em concentração do substrato e temperaturas mais altas.

Estes resultados estão em acordo com a literatura, pois usando cepa de *Streptomyces* sp. na produção de xilanase, em cultivo submerso, MOROSOLI (1986), GRABASKI (1986), MAHESAWARI (2000) E TECHAPUN (2001), citam temperatura de 37°C, pH neutro a alcalino e concentração de substrato de 1%, como sendo ideais para cepas de *Streptomyces*.

O efeito exercido pelos fatores testados neste ensaio está detalhado na Figura 8, por meio do gráfico de Pareto.

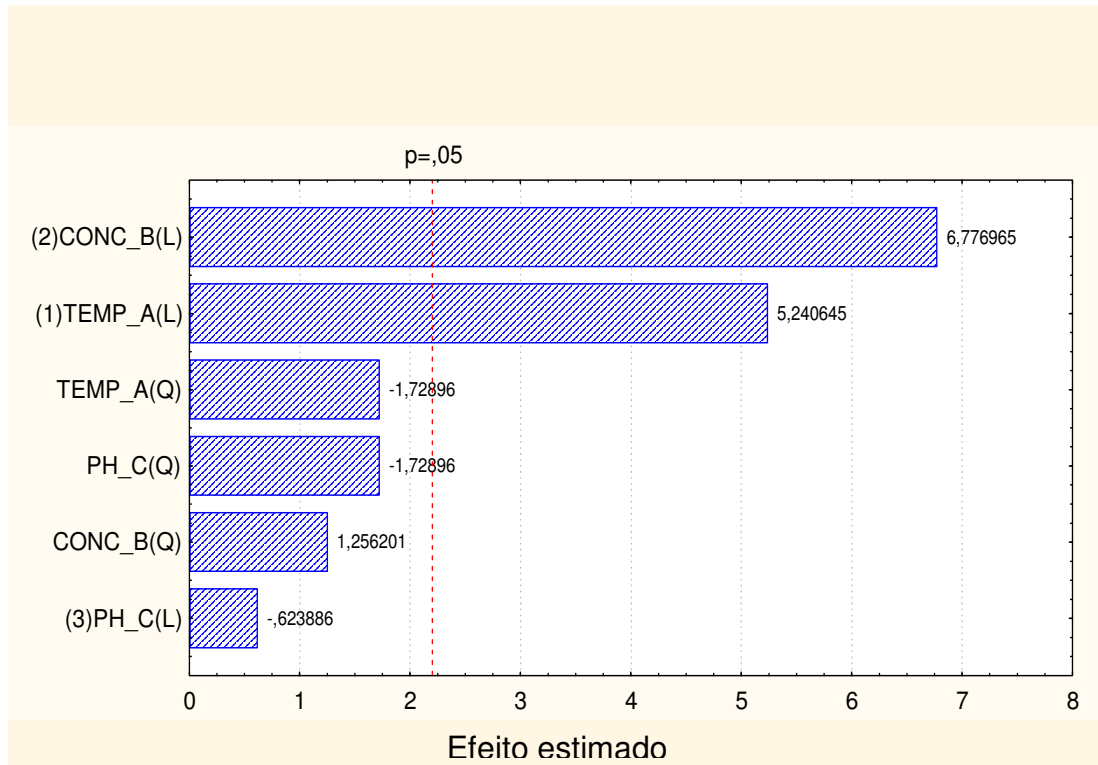


Figura 8 - Gráfico de Pareto mostrando o efeito da temperatura, pH e concentração de substrato na produção de xilanase de *S. viridosporus* T7A em fermentação submersa

O efeito da temperatura e da concentração do substrato foi estatisticamente significativo sobre a produção de xilanase ( $p < 0,05$ ). Através deste estudo, pode-se afirmar que a concentração do substrato ideal está compreendida entre 0,5 a 1,0 %, pois no estudo anterior, a concentração do substrato de 1,5% causou diminuição na produção enzimática e neste planejamento o modelo estatístico indica que deve ser maior que 0,5%

O pH, nos níveis testados, não teve significância a 5%. O modelo estatístico indica que em nível muito alto ( $>9,0$ ) pode diminuir a atividade enzimática. Já no estudo anterior o gráfico de Pareto indicava que em torno de 8,5 os resultados eram melhores, então, a faixa ideal de pH pode estar entre 8,5 e 9,0. Este resultado está em acordo com as afirmações de POMETO III & CRAWFORD (1986), onde a cepa

de *S. viridosporus* T7A decompõe melhor o material em meio alcalino, atingindo a máxima degradação da lignina na faixa de pH entre 8,4 a 8,8. Nos experimentos subseqüentes optou-se por manter o pH inicial da fermentação em 8,6. Em relação à temperatura, esta deve ser mantida no mínimo em 37°C.

### 5.1.3 Otimização de fatores nutricionais

Este estudo foi conduzido visando uma melhor produção de xilanase em fermentação submersa.

#### *Escolha da Fonte de Nitrogênio*

Procurou-se determinar dentre três diferentes fontes de nitrogênio aquela que melhor estimularia a produção de xilanase. Incluiu-se no estudo a uréia, o farelo de soja e o extrato de levedura. O farelo de soja foi incluído porque é uma fonte barata e de fácil aquisição, visto que o Brasil um dos maiores produtores de soja e farelo do mundo. Deve-se destacar que o objetivo principal deste estudo é a inclusão do extrato em dieta animal, e o farelo de soja está presente em grande parte das formulações de rações para animais.

A Tabela 16 mostra os resultados obtidos no estudo.

Tabela 16 - Influência de diferentes fontes de nitrogênio para produção de xilanase de *S. viridosporus* T7A em fermentação submersa.

Tipo de Suplementação	Atividade U/ml
Uréia (0,80 g/l)	1,06
Farelo de Soja 1%	2,39
Extrato de Levedura 0,6%	2,03

De acordo com os resultados sumarizados na Tabela 16, verificou-se que melhor atividade de xilanase (2,39 U/ml) foi obtida com a suplementação de farelo de soja na razão de 1% no meio de fermentação. Os resultados foram superiores quando comparados com os obtidos com a uréia (mg/ml) e o extrato de levedura a 0,6%, 1,06 e 2,03 U/ml, respectivamente.

Em estudos realizados com o *Streptomyces viridosporus* T7A, RAMACHANDRA (1987) e ADHI (1989) destacaram o uso de extrato de levedura (0,5 a 0,6%) para produção de enzimas extracelulares em meio submerso. No entanto, verificou-se que o farelo de soja adicionado a 1% pode também proporcionar resultados positivos para a atividade da xilanase. Este resultado é bastante promissor porque o farelo de soja é um subproduto agroindustrial, de fácil aquisição, e de baixo custo, o que viabiliza o processo para produção de enzimas.

#### *Estudo da influência da taxa de inoculação*

Com relação à taxa de inoculação, estudaram-se os níveis de 5 a 20% (v/v). Os resultados estão sumarizados na Tabela 17.

Tabela 17 - Uso de diferentes taxas de inoculação (%) para produção de xilanase em fermentação submersa de *S. viridosporus* T7A

Amostra	Inoc%	Atividade U/ml média
1	5	1.80
2	10	3.73
3	15	3.80
4	20	2.80

Os resultados acima mostram que a melhor taxa de inoculação está em torno de 10 a 15%, pois à medida que a taxa de inoculação aumenta, além de 15%, ocorre uma diminuição da atividade xilanolítica. Possivelmente, a competição pelo substrato não induza à maior atividade enzimática em *Streptomyces viridosporus*. A faixa de inoculação obtida neste estudo está em acordo com aquela utilizada por ADHI (1989), em torno de 12%.

Este resultado é bom, pois, em taxa menor de inoculação, bons rendimentos na atividade enzimática podem ser obtidos. Isso também é importante, do ponto de vista econômico para a execução do processo, porque a etapa de produção de inóculo implica em maiores custos com mão-de-obra e equipamentos.

#### 5.1.4 Efeito da Suplementação com vitaminas do complexo B e Hidroxietilcelulose sobre a produção de xilanase

Os resultados obtidos com a suplementação de vitaminas do complexo B e de hidroxietilcelulose estão sumarizados na Tabela 18.

Tabela 18 - Efeito da suplementação de Vitaminas do Complexo B, e da Hidroxietilcelulose (HEC), sobre a produção de xilanase de *S. viridosporus* T7A, em fermentação submersa.

Tipo de Suplementação	Atividade U/ml
Farelo de Soja + 0,05% vit.B	2,26
Farelo de Soja + 0,1% vit B	3,10
Farelo de soja + 0,1% vit B + HEC 0,1%	4,42

A presença de vitaminas do complexo B é importante para o crescimento e o metabolismo dos microrganismos. Acredita-se que este estímulo metabólico possa melhorar a produção de xilanase. A presença de HEC 0,1% proporcionou maior atividade enzimática, isso comprova a afirmação feita por KULKARNI *et al.*(1999), que a xilanase de *Streptomyces* sp pode ser induzida por celulose cristalina. Desta forma, pode-se afirmar que tal suplementação é benéfica para a produção de xilanase, embora não se possa esclarecer qual é o mecanismo que a celulose cristalina exerce para incrementar a produção.

Com estes resultados verificou-se que pode ser obtida melhor atividade xilanolítica quando o meio de fermentação é suplementado com vitaminas do complexo B e celulose como a hidroxietilcelulose, já que a produção obtida de 4,42 U/ml significou aumento de 95% em relação ao ensaio onde foi usado apenas farelo de soja com 0,05% de vitamina B.

A adição de vitaminas do complexo B e de hidroxietilcelulose pode incrementar a produção de xilanase em fermentação submersa, no entanto um outro estudo foi realizado para determinar os níveis ideais da adição destas substâncias ao meio de cultivo.

### Otimização de Sais Para a Produção de Xilanase em Fermentação Submersa

Os resultados do estudo para verificar os efeitos da suplementação com sais sobre a atividade xilanolítica estão apresentados na Tabela 19.

Neste estudo foi avaliado o efeito da presença e ausência dos seguintes sais: (g/ml) Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0,053); K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0,002); MgSO<sub>4</sub> (0,0002); NaCl (0,0002) ; CaCl<sub>2</sub> (0,00002); e solução de ZnSO<sub>4</sub>; FeSO<sub>4</sub>; CuSO<sub>4</sub>; MoSO<sub>4</sub>; MnSO<sub>4</sub> contendo 0,020 g de cada elemento em 100 ml adicionado a 1% (v/v) sobre a fermentação.

Tabela 19 - Estudo do efeito da suplementação com sais sobre a produção de xilanase em fermentação submersa por *S. viridosporus* T7A.

Ensaio	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	MgSO <sub>4</sub>	NaCl	CaCl <sub>2</sub>	ZnSO <sub>4</sub>	FeSO <sub>4</sub>	CuSO <sub>4</sub>	MoSO <sub>4</sub>	MnSO <sub>4</sub>	Xilanase U/ml
1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	11.0
2	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	9.0
3	+	+	-	+	-	-	-	+	-	+	10.5
4	+	+	-	-	-	+	+	-	+	+	9.8
5	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	10.0
6	+	-	+	-	-	+	-	+	+	-	7.5
7	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	9.0
8	+	-	-	-	+	-	+	+	-	-	9.5
9	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	5.8
10	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	2.4
11	-	+	-	+	+	-	+	-	+	-	1.4
12	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	5.0
13	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	5.0
14	-	-	+	-	+	+	+	-	-	+	2.4
15	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	5.0
16	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	4.9

A Tabela 19 mostra que o melhor nível de atividade xilanásica foi obtido quando todos os sais estavam presentes no ensaio (11,0 U/ml). No entanto, na ausência do fosfato de sódio (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) ocorre uma drástica redução na atividade enzimática. Este estudo sugere que a fonte de fosfato é imprescindível para que

níveis maiores de enzima sejam produzidos pelo *S. viridosporus* T7A em cultivo submerso.

Para efeito de análise e visualização, a Figura 9 explicita o efeito dos sais sobre a atividade enzimática.

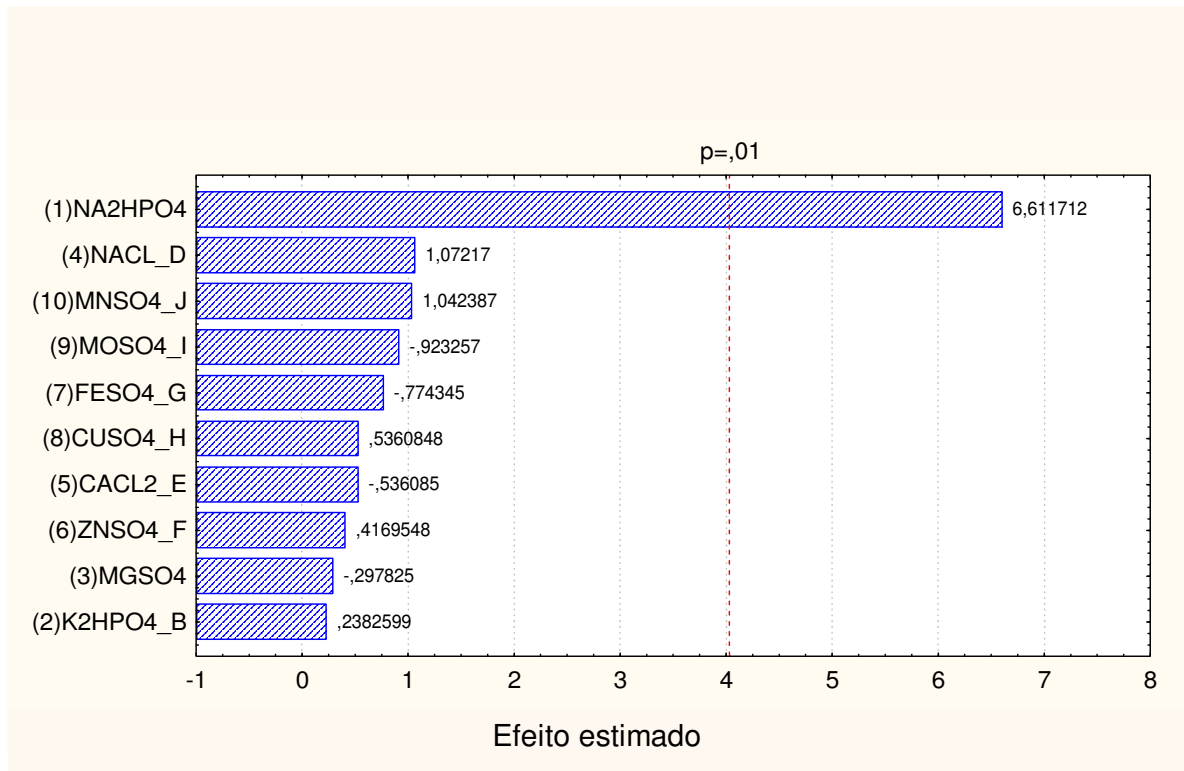


Figura 9 - Efeitos da suplementação com sais sobre a produção de xilanase de *S. viridosporus* T7A, em fermentação submersa

Conforme o gráfico acima, verifica-se que a suplementação de fosfato na forma de fosfato de sódio dibásico foi a única fonte de mineral que teve influência positiva e estatisticamente significativa ( $p < 0,01$ ) para a produção de xilanase em meio submerso. Os outros sais (NaCl; MnSO<sub>4</sub>; CuSO<sub>4</sub>; ZnSO<sub>4</sub>; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) também exerceram efeito positivo sobre a produção enzimática, no entanto não significativo estatisticamente, nos níveis testados. Já o MoSO<sub>4</sub>, FeSO<sub>4</sub>, CaCl<sub>2</sub> MgSO<sub>4</sub> exerceram efeito negativo, sobre a atividade xilanolítica. NASCIMENTO (2002) verificou que as xilanases de *Streptomyces* sp AMT-3 foram fortemente inibidas pela adição de íons cobre, manganês e ferro. É possível que estes elementos, exceto o cobre, também possam inibir a atividade da xilanase de *S. viridosporus* T7A.



Citações na literatura destacam a importância da suplementação dos sais (ADHI, 1989; RAMACHANDRA,1987), mas este estudo mostrou que apenas o fosfato de sódio bibásico anidro interfere de forma positiva sobre a atividade da xilanase. Isto é importante, no ponto de vista econômico do processo, já que podem ser obtidos bons níveis de produção usando apenas a suplementação com fosfato de sódio.

Para otimizar os níveis mais próximos do ideal para a suplementação de farelo de soja, vitaminas do complexo B e de HEC, um planejamento fatorial  $3^{3-1}$  foi realizado.

Os resultados da otimização estão apresentados a seguir.

Tabela 20 - Planejamento experimental para otimização dos níveis de farelo de soja, vitamina do complexo B e hidroxietilcelulose para a produção de xilanase em fermentação submersa pelo *S. viridosporus* T7A.

Amostra	Far. Soja%	Vit. Cpx B%	HEC %	Atividade U/ml
1	0,5	0,1	0,10	19,48
2	0,5	0,2	0,20	22,49
3	0,5	0,3	0,15	23,69
4	1,0	0,1	0,20	23,14
5	1,0	0,2	0,15	24,09
6	1,0	0,3	0,10	21,00
7	1,5	0,1	0,15	22,12
8	1,5	0,2	0,10	23,62
9	1,5	0,3	0,20	24,31

Para melhor visualização e discussão dos resultados, dois gráficos foram construídos, e estão apresentados nas Figuras 10 e 11.

Na tabela 20 verificou-se que houve resposta positiva na produção de xilanase, quando maiores porcentagens de farelo de soja, vitaminas do complexo B e hidroxietilcelulose foram adicionados ao meio (24,31 U/ml). O resultado obtido

neste ensaio é bastante superior ao que ADHI (1989) obteve em cultivo submerso (0,3 U/ml) usando a cepa de *S. viridosporus* T7A, e que TECHAPUN (2001) (12 U/ml) com *Streptomyces albus* e ANTONOPOULOS (2001) (15 U/ml) obtiveram com cepa de *Streptomyces* sp. AB.

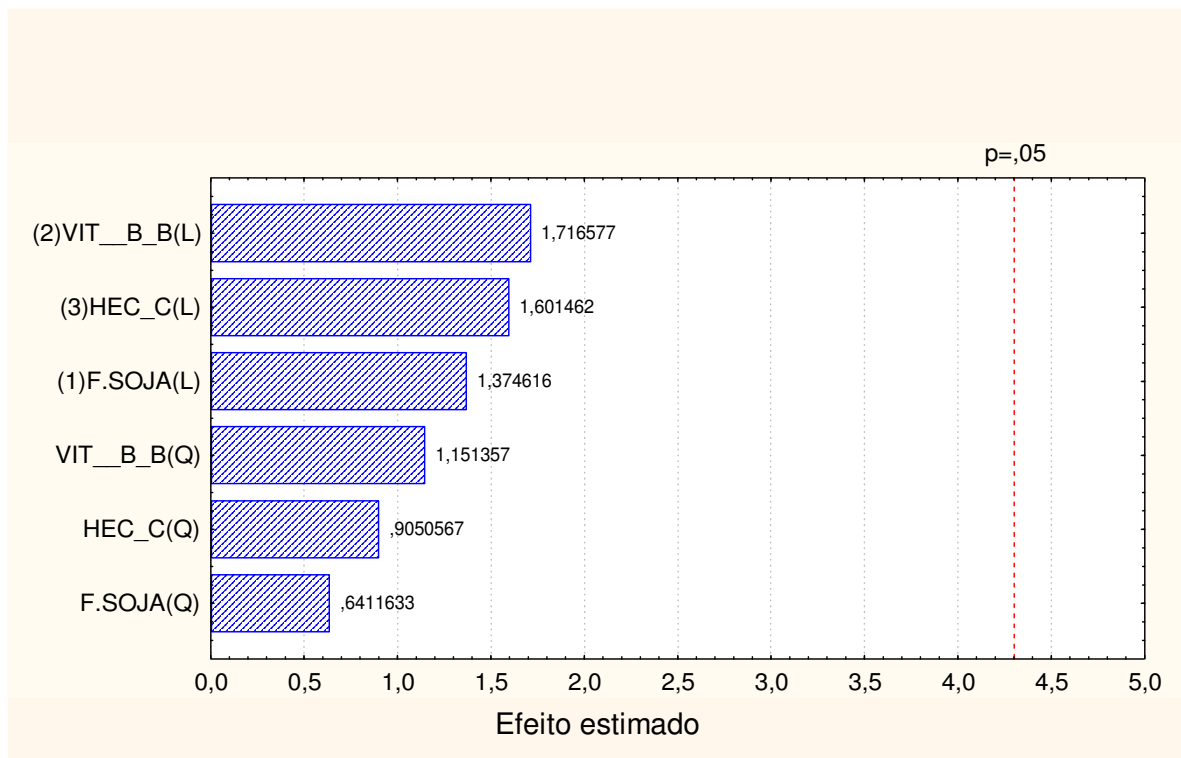


Figura 10 - Influência da suplementação com HEC, vitaminas do complexo B e F de soja sobre a produção de xilanase de *S. viridosporus* T7A em fermentação submersa.

Nos níveis testados de farelo de soja (0,5;1,0 e 1,5%); vitaminas do complexo B (0,1;0,2 e 0,3%) e de HEC (0,1; 0,15 e 0,2%) não foram verificadas diferenças significativas estatisticamente ( $p < 0,05$ ) entre os ensaios.

O resultado da análise estatística sugere que o percentual mais baixo de inclusão do farelo de soja (0,5%), vitaminas do complexo B (0,1%) e HEC (0,1%) proporcionam boa produção de xilanase. Deverá ser levado em conta o custo-benefício da suplementação para que se possa optar pelo nível de inclusão destes elementos no meio para fermentação.

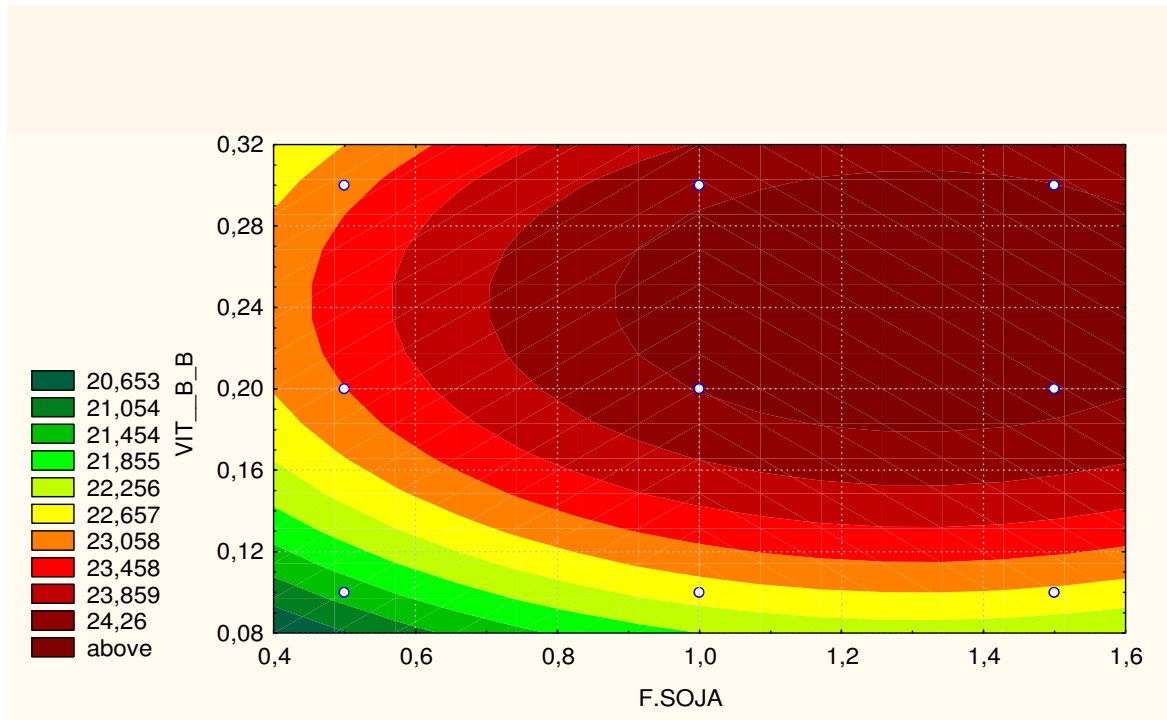


Figura 11- Influência da suplementação vitamina B, HEC e F. de soja sobre a produção de xilanase de *S. viridosporus* T7A, em fermentação submersa.

O gráfico acima mostra que podem ser estimados estatisticamente níveis teóricos para a variável farelo de soja e vitaminas do complexo B. O modelo aponta como sendo o nível ideal para o farelo de soja e vitamina B 1,3% e 0,25 %, respectivamente, em fermentação submersa para *S. viridosporus* T7A, visando a produção de xilanase, mas estatisticamente não significativos, ou seja concentrações menores destes elementos não afetam significativamente os resultados.

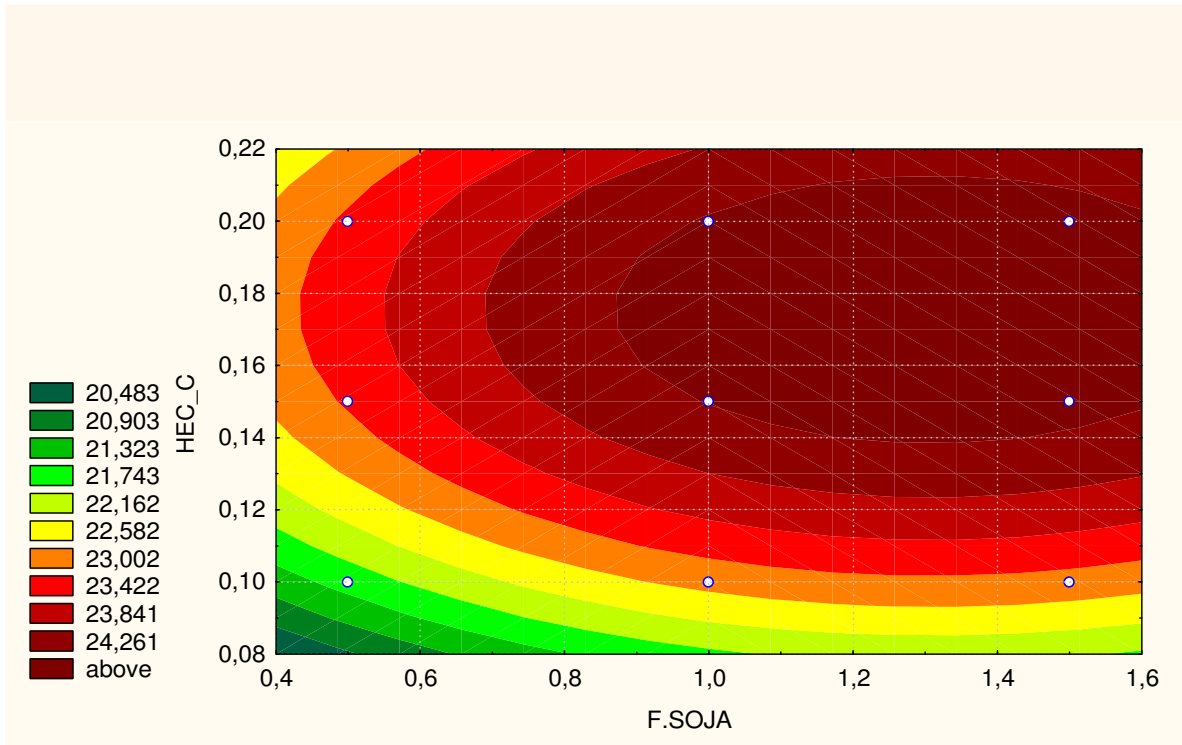


Figura 12 - Influência da suplementação com HEC e farelo soja sobre a produção de xilanase de *S. viridosporus* T7A, em fermentação submersa.

Já com relação à HEC, o modelo matemático estimou como nível de inclusão ideal 0,17% para o meio para fermentação, mas também estatisticamente não significativos, ou seja, da mesma forma que no caso da suplementação do meio com farelo de soja e vitamina do complexo B, na faixa testada, os resultados de atividade enzimática não são significativamente menores com o uso de concentrações menores dos produtos.

#### *Produção de xilanase por fermentação submersa em biorreator de bancada*

Para finalizar o estudo da produção de xilanase de *S. viridosporus* T7A, em cultivo submerso, alguns ensaios foram feitos em biorreator de bancada (Inteltech), com volume útil de 2,0 litros.

A produção de xilanase, neste modelo de biorreator, foi de cerca de 25 U/ml. Comparando com os estudos iniciais, que partiram de cerca de 3 U/ml, houve um aumento de aproximadamente 6 vezes na produção da enzima. Este resultado é muito maior que aquele obtido por ADHI (1989) e MAGNUSON (1997) de 0,3 e 8 U/ml, respectivamente, usando a cepa de *S. viridosporus* T7A. O resultado também é superior a atividade alcançada por MOROLI (1986); GRABSKI (1991); ANTONOPOULOS (2001) E TECHAPUN (2001) de 1,05; 16,0; 12,0 e 15 (U/ml) respectivamente, em condições semelhantes com cepas de *Streptomyces*. No entanto, é similar à produção obtida por MAHESAWAKI (2000) e NASCIMENTO (2002) de 22,0 e 28,4 U/ml com cepas de *Streptomyces* sp.

Pode-se afirmar, diante dos resultados obtidos neste estudo, que a produção de xilanase de *S. viridosporus* T7A foi boa, quando comparada com os resultados alcançados recentemente por outros pesquisadores. O processo fermentativo proposto neste estudo é viável economicamente, pois permite a utilização de subprodutos e resíduos agroindustriais de baixo valor comercial.

#### *Produção de extrato enzimático concentrado*

A concentração enzimática foi conduzida em 2 etapas: ultrafiltração e liofilização. A atividade enzimática obtida antes e depois da ultrafiltração está apresentada na Tabela 21.

Tabela 21 - Atividade enzimática obtida antes e após a ultrafiltração em membrana de 30

kDa	
Atividade Antes	Atividade Após
20,0 U/ml	62,0 U/ml

Ensaio prévios para determinar o peso molecular das enzimas de interesse neste estudo não foram realizados. Para tanto, a concentração enzimática foi feita baseada em estudos encontrados na literatura. Conforme NASCIMENTO (2002) o peso molecular das xilanases de *Streptomyces* sp AMT-3 é de 170 a 700 kDa e

MAGNUSON & CRAWFORD (1997) purificaram uma xilanase alcalina de *S. viridosporus* T7A com peso molecular de 59 kDa.

O processo de ultrafiltração proporcionou aumento de cerca de 3 vezes na atividade enzimática, usando uma coluna com membrana de 30 kDa. No entanto, para que o processo de ultrafiltração possa ser otimizado, estudos para determinar o peso molecular de todas as xilanasas de *S. viridosporus* T7A deverão ser conduzidos em trabalhos futuros.

Com relação à peroxidase, RAMACHANDRA *et al.* (1988) estimaram em 17,8 kDa a peroxidase de *S. viridosporus* T7A, no entanto BANCI (1996) citam o peso molecular das peroxidases em torno de 35 a 100 kDa.

### Liofilização

O processo de liofilização foi feito após a ultrafiltração. Antes de submeter à liofilização, o ultrafiltrado foi congelado.

Os valores da atividade enzimática estão dispostos na Tabela 22.

Tabela 22 - Atividade da xilanase de *S. viridosporus* T7A, produzida em fermentação submersa, após ultrafiltração seguida de liofilização.

Processo	Atividade da xilanase	Atividade da peroxidase
Ultrafiltração	62,0 U/ml	-
Congelamento	50,0 U/ml	-
Liofilização	2.272,0 U/g	100,0 U/g

Antes de submeter o extrato ultrafiltrado à liofilização faz-se necessário o congelamento por 12 horas. Neste processo ocorreu uma perda de atividade da xilanase em torno de 20%. No entanto, após a liofilização conseguiu-se concentrar cerca de 45 vezes a atividade enzimática em relação à obtida após o congelamento.

Também foi possível fazer ensaio para determinação da peroxidase que apresentou atividade de 100 U/g; este resultado é bom, quando comparado com os que RAMACHANDRA *et al.* (1988) que obtiveram em meio suplementado com xilano purificado (140 e 150 U/g de proteína purificada), respectivamente. Isto é um indício de que a peroxidase produzida pelo *S. viridosporus* T7A possa ter peso molecular

superior àquele estimado por RAMACHANDRA *et al.* (1988) de 17,8 kDa para a peroxidase de *S. viridosporus* T7A, já que a membrana utilizada foi de 30 kDa. Isto está em acordo com a afirmação de BANCI (1996) que cita o peso molecular das peroxidases em torno de 35 a 100 kDa.

No processo de ultrafiltração seguido de liofilização encontrou-se uma alternativa eficaz para concentrar a atividade enzimática do extrato bruto.

## 5.2 Produção de Xilanase por Fermentação no Estado Sólido (FES)

A produção de xilanase foi conduzida em FES com o objetivo de se testar esta outra alternativa, procurando alcançar melhores concentrações da enzima em questão. Os mesmos substratos empregados em fermentação submersa foram utilizados em FES, podendo-se assim observar as reais vantagens desta técnica para a produção de xilanase pelo gênero *Streptomyces* com resíduos agroindustriais de baixo custo.

### 5.2.1 Estudo do efeito da composição do substrato sobre a produção de xilanase

A produção de xilanase por FES foi inicialmente baseada nas condições determinadas anteriormente em fermentação submersa (pH 8,5, temperatura 37°C), utilizando o bagaço de cana como suporte (maior proporção em fibras), capim Napier e farelo de soja como substratos (fontes de carbono e nitrogênio). As proporções estudadas dos componentes estão apresentadas na Tabela 23.

Tabela 23 - Estudo do efeito de diferentes proporções bagaço de cana e capim Napier para a produção de xilanase de *S. viridosporus* T7A por FES

Substrato	%									
Bagaço de cana	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
Capim Napier	80	70	60	50	40	30	20	10	0	0
Farelo de Soja	10	10	10	10	10	10	10	10	10	0
Atividade U/g	21,2	25,5	32,9	60,4	150,4	210,1	390,4*	360,6	290,9	35,0

Após 5 dias de fermentação, verificou-se que a composição que proporcionou a melhor produção de xilanase (390,4 U/ml) foi aquela contendo 70% de bagaço de cana, 20 % de capim Napier e 10% de farelo de soja. Acredita-se que o bagaço de cana seja importante, pela grande capacidade de retenção de água (ROUSSOS *et al.* 1989), pois o *S. viridosporus* é um microrganismo que se desenvolve melhor em percentuais de umidade bastante elevados (acima de 90%), como disposto na Tabela 26. À medida que o percentual de bagaço foi aumentado, acima de 70%, verificou-se que houve uma diminuição na produção da enzima. Isto pode ser explicado pelo fato de que a proporção do capim Napier diminuiu, então o bagaço de cana, que contém teor de fibra bruta maior que o capim Napier, 41,0 e 28,2%, respectivamente (JARDIM, 1976) terá, conseqüentemente, maior percentual de lignina e menor quantidade de hemicelulose disponível ao microrganismo. Além disto, à medida que a fibra bruta aumenta, menor é a quantidade de outros nutrientes (aminoácidos, vitaminas), que possam desempenhar um papel importante para o metabolismo do microrganismo.

Posteriormente, um estudo foi conduzido separadamente para determinar o melhor nível de inclusão do farelo de soja.

Na seqüência, os outros ensaios foram realizados sempre utilizando as seguintes condições: bagaço de cana 70%, capim Napier 20%, farelo de soja 10%, temperatura de 37 °C e pH 8,6. É importante lembrar que a temperatura e o pH foram estudados em ensaios prévios onde se produziu xilanase por fermentação submersa.

### 5.2.2 Estudo da forma de inoculação

Para que um processo biotecnológico seja viável economicamente, um dos fatores a serem estudados é o tempo de fermentação, o que inclui a definição do menor tempo de fermentação a fim de maximizar a produção do metabólito ou biomolécula desejada. Uma maneira de minimizar o tempo de fermentação seria o uso de um pré-inóculo, ou seja, células cultivadas em condições adequadas, estando no estado vegetativo. Os resultados obtidos em ensaios comparando a



inoculação com esporos ou células no seu estado vegetativo (células ativadas) em função do tempo estão apresentados na Tabela 24.

Tabela 24 - Atividade da xilanase de *S. viridosporus* T7A em função do modo de inoculação e do tempo produzida por FES

Tempo	Atividade U/g c/ células ativadas	Atividade U/g c/ esporos
24	117,33	38,45
48	283,33	88,18
72	227,33	217,16
96	<b>243,66</b>	367,5
120	229,40	385,2
144	-	390,7
168	-	<b>410,9</b>
172	-	320,4

Os resultados da tabela acima indicam que, para a FES, o substrato poderá ser inoculado com esporos diretamente, pois apesar da atividade máxima (410,9 U/g) ter sido alcançada após 168 horas, não há necessidade do preparo de um pré-inóculo. Isto pode ser uma vantagem econômica em termos de operações unitárias que seriam eliminadas do processo. A Figura 13 mostra a produção de xilanase com o uso de pré-inóculo onde os melhores resultados (243,6 U/g) foram alcançados em 96 horas, o que representaria um importante ganho de tempo. No entanto, escolheu-se trabalhar com a inoculação sob a forma de esporos, por razões de praticidade e facilidade quanto ao preparo do inóculo. Portanto, as fermentações subseqüentes foram conduzidas com inoculação com suspensão de esporos.

É possível que o microrganismo quando passa da fase de esporo para células no estado vegetativo, exerça um consumo maior de açúcares solúveis substrato e compostos fenólicos, presentes no substrato, os quais atuam como inibidores da xilanase (KULKARNI *et al.*, 1999). Desta forma, quando são inoculados os esporos, pode haver menor disponibilidade de açúcares redutores no meio para a produção

de xilanase, o que pode reprimir a sua produção pelo microrganismo para tempos de cultivo menores ou iguais a 85 h (ver Figura 13).

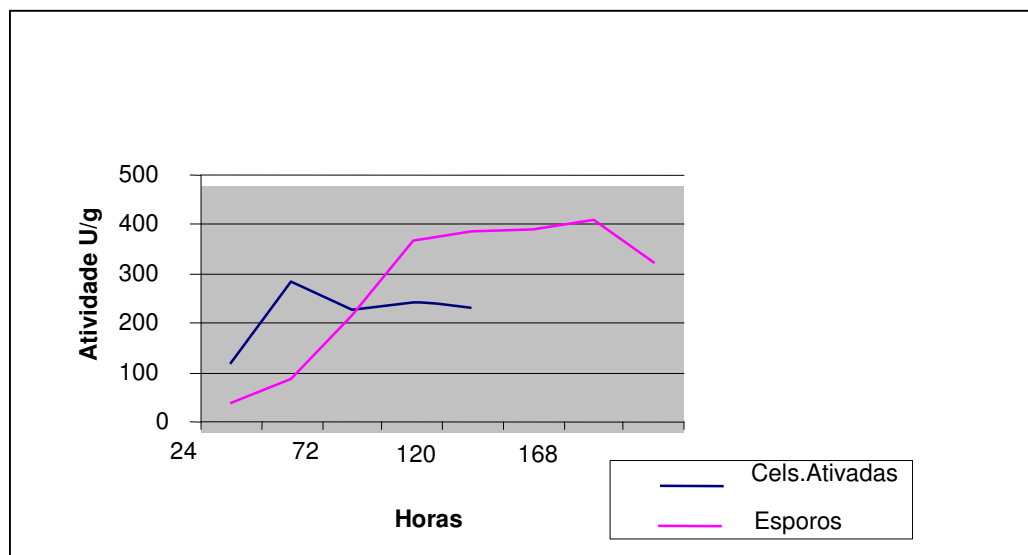


Figura 13 - Produção de xilanase por FES de *S. viridosporus* T7A em função da forma de inoculação.

### 5.2.3 Efeito do tratamento térmico do substrato sobre a atividade de xilanase

O presente estudo foi conduzido com o objetivo de verificar o efeito da combinação do tratamento térmico do substrato com vapor fluente seguido por uma esterilização. As condições dos tratamentos e os resultados do estudo do tratamento térmico do substrato estão dispostos na Tabela 25.

Tabela 25 - Efeito do tratamento térmico sobre a atividade da xilanase de *S. viridosporus* T7A em meio sólido

Ensaio	Atividade U/g
Apenas Esterilizado a 121°C/15 min	411,16
Vapor fluente (100°C por 60' + esterilização a 121°C/15 min)	337,5

Verificou-se que o tratamento térmico com vapor fluente antes da esterilização, por 15 minutos a 121°C, teve efeito negativo sobre a produção de

xilanase, de 411,16 para 337,5 U/g. Este resultado é importante, pois pode tornar o processo fermentativo menos dispendioso e trabalhoso. Acredita-se que o processo de cozimento por 60 minutos (100°C) possa alterar as características do substrato, tornando indisponíveis nutrientes importantes, ou solubilizando substâncias que possam agir como inibidores, principalmente os açúcares solúveis e compostos fenólicos, que atuam como repressores da produção de xilanase (KULKARNI, 1999). Desta forma, as fermentações subseqüentes foram conduzidas somente com a esterilização do material durante 15 minutos a 121°C.

#### 5.2.4 Estudo da influência da umidade e da taxa de Inoculação

Os resultados do estudo da influência do teor de umidade e da taxa de inoculação sobre a produção de xilanase estão apresentados na Tabela 26, e analisados na Figura 14 e 15.

Tabela 26 - Efeito da umidade e taxa de inoculação sobre a produção de xilanase de *S. viridosporus* T7A em FES

Umidade %	Inoculação	Atividade U/g
90	10 <sup>9</sup>	346,1
95	10 <sup>8</sup>	350,0
80	10 <sup>7</sup>	229,0
80	10 <sup>8</sup>	193,5
95	10 <sup>9</sup>	200,0
90	10 <sup>7</sup>	333,9
<b>95</b>	<b>10<sup>7</sup></b>	<b>423,9</b>
90	10 <sup>9</sup>	90,8
95	10 <sup>8</sup>	319,3

Neste estudo verificou-se que a umidade é um parâmetro físico muito importante para o microrganismo no processo de produção de xilanase por FES. Portanto, maiores porcentagens de teor de umidade proporcionaram maiores níveis de atividade da xilanase (423,9 U/g). Mantendo-se a taxa de inoculação constante

( $10^7$  esp/g) a atividade xilanásica passou de 229,0 U/g (80% de umidade) para 423,9 U/g (95% de umidade). O gráfico de superfície, na Figura 15, mostra que a umidade ideal está compreendida em torno de 92%. Este fato em fermentação sólida é um grande problema, pois poucos materiais utilizados como suporte são capazes de reter tanta umidade, sem deixar água livre. Mas, o bagaço de cana, sem casca, moído e peneirado é um dos poucos resíduos agroindustriais que tem a capacidade de reter maior volume de água por unidade de peso seco (ROUSSOS, *et al.*1989).

Quanto à taxa de inoculação, o ensaio indicou que o ideal é em torno de  $10^7$  esporos/grama de substrato; e que à medida que há um aumento, além desta quantidade, a atividade da xilanase diminui, embora este efeito não tenha sido estatisticamente significativo. Este resultado é semelhante àquele obtido em fermentação submersa usando células ativadas (estado vegetativo) como inóculo.

O gráfico de Pareto na Figura 14 esquematiza os efeitos da umidade e taxa de inoculação sobre a produção de xilanase.

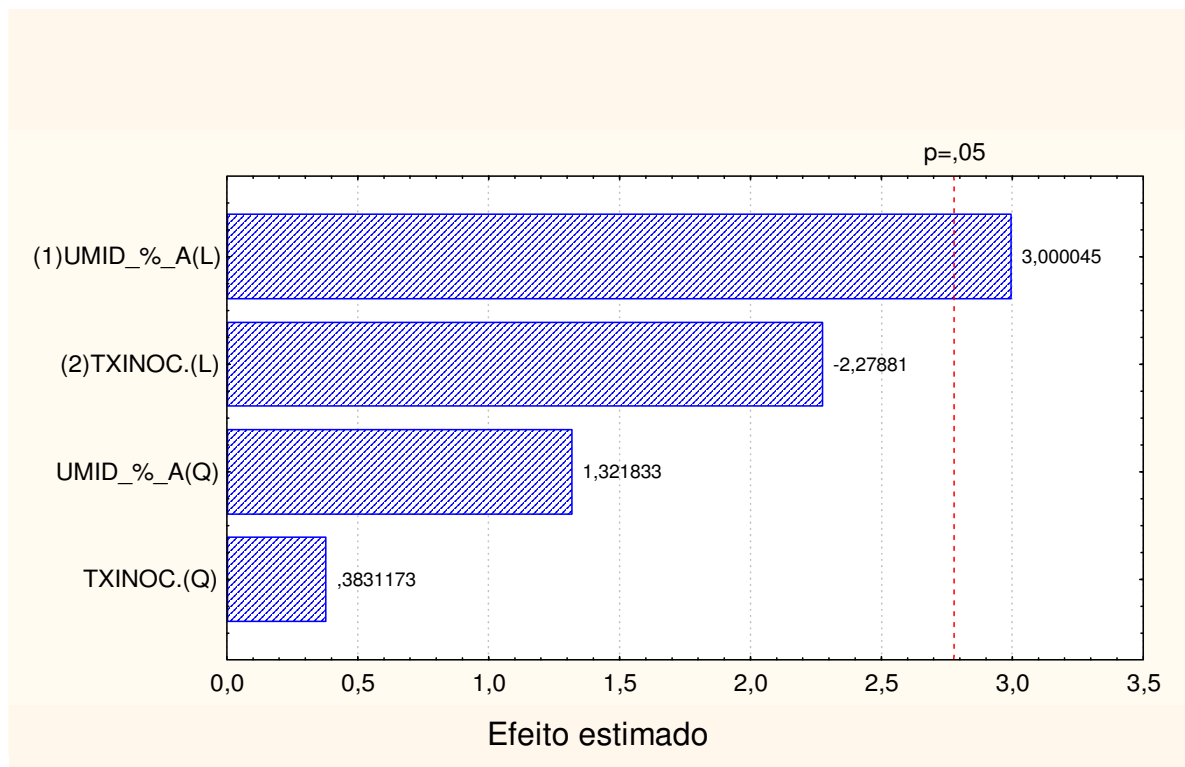


Figura 14 - Efeito da umidade (%) e taxa de inoculação sobre a produção de xilanase por *S. vridosporus* T7A em FES

Na Figura 15 o gráfico de superfície de resposta ilustra os efeitos da umidade e da taxa de inoculação sobre a produção de xilanase em meio sólido.

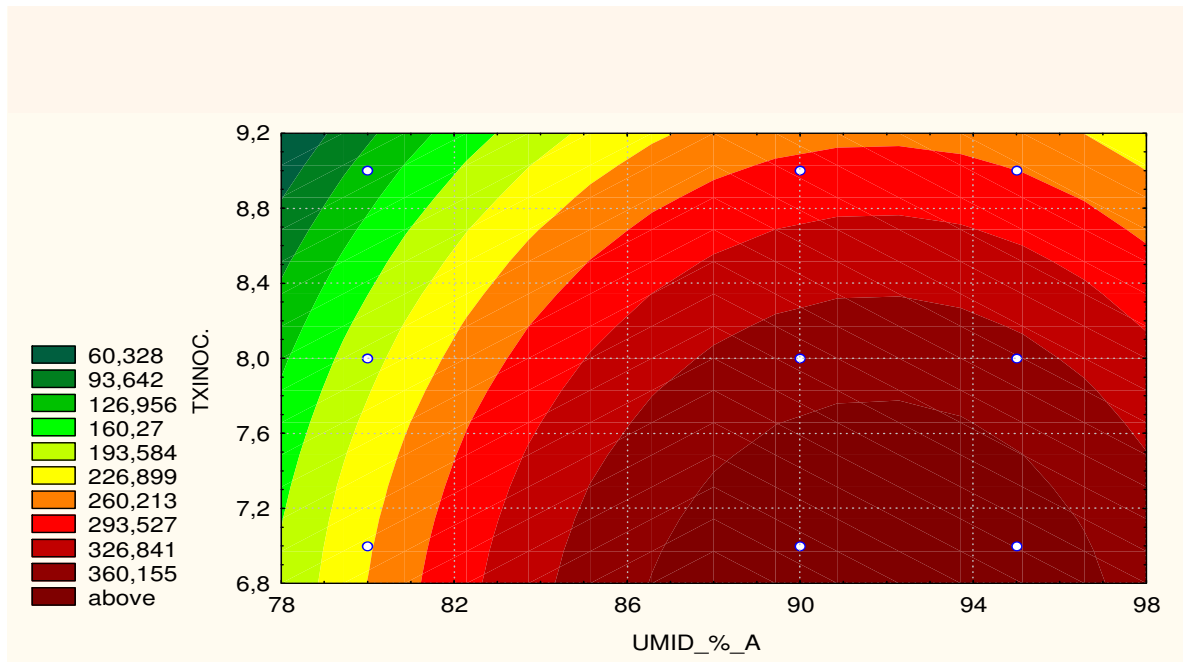


Figura 15 - Gráfico de superfície mostrando o efeito da umidade e da taxa de inoculação para produção de xilanase de *S. viridosporus* T7A em FES

#### 5.2.5 Efeito da umidade e aeração sobre a atividade xilanásica em biorreatores do tipo Coluna de Raimbault

O estudo do efeito da umidade e aeração sobre a produção de xilanase foi realizado em biorreatores do tipo coluna de Raimbault. Este ensaio teve como objetivo realizar uma otimização para definição das melhores condições destes parâmetros visando sempre uma melhor produção da enzima, além de fixar as condições para o escalonamento do processo. Posteriormente, foi realizado também o estudo respirométrico do microrganismo durante a produção de xilanase, visando estimar a biomassa produzida, um dos aspectos mais difíceis de se determinar na FES.

Os resultados da otimização para umidade e aeração em biorreatores tipo coluna estão dispostos na Tabela 27 e Figura 16.

Tabela 27 - Efeito da umidade e aeração em FES para produção de xilanase de *S. viridosporus* T7A

Ensaio	Umidade g/g	Aeração ml/coluna/min	Atividade U/g	
1	8	120	450.1	444.0
2	6	60	426.8	415.2
3	6	120	221.1	210.5
4	8	60	191.8	202.1
5	7	80	379.8	385.0

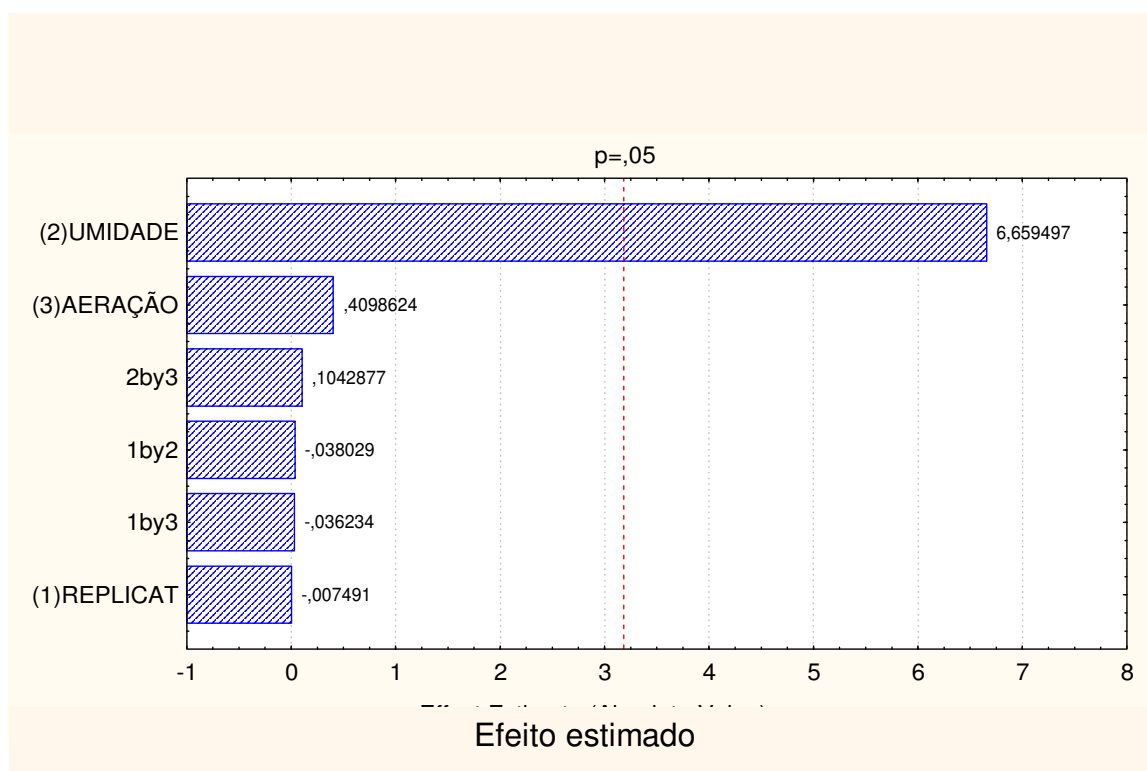


Figura 16 - Efeito da umidade e aeração sobre a produção de xilanase obtida por FES em biorreator tipo coluna de Raimbault

A produção de xilanase em biorreator do tipo coluna (447 U/g) foi 6% superior à obtida em frascos de Erlenmeyer (423,9 U/g), mostrando a importância da aeração para o processo. Embora, nos níveis testados ela não tenha se apresentado significativa, do ponto de vista estatístico. Portanto, pode-se trabalhar com níveis mais baixos de aeração (60 ml/coluna/min)

A seguir, a Figura 17 apresenta o gráfico de superfície de resposta para avaliação do efeito da umidade e da aeração sobre a produção de xilanase.

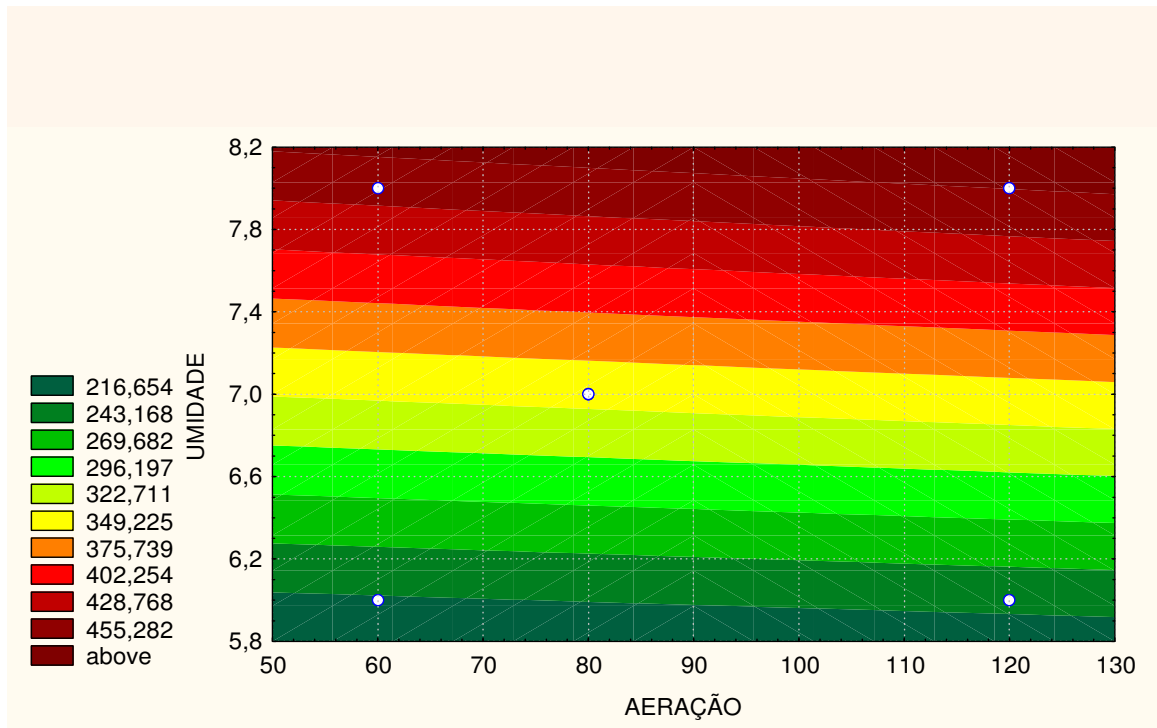


Figura 17 - Efeito da umidade e aeração sobre a produção de xilanase de *S. viridosporus* T7A biorreator tipo coluna em meio sólido

Conforme o gráfico da Figura 17, verificou-se que a umidade é um fator limitante para o processo quando se trabalha em biorreatores do tipo coluna. Mesmo utilizando bagaço de cana como suporte, verificou-se a quantidade de água que o bagaço consegue reter é menor neste tipo de biorreator, pois quando a umidade é muita elevada, observou-se que o formato da coluna faz com que a água livre escorra da coluna para os aeradores. A drenagem da água do substrato sólido foi observado nos testes com umidade de 8g/g e assim, só é viável neste tipo de reator, o trabalho com umidade de 6g/g.

Grandes quantidades de água presente no substrato sólido com uma certa quantidade de água livre caracterizam a técnica de fermentação semi-sólida. Tal aspecto deve ser observado no escalonamento do processo, pois pode dificultar de maneira significativa o desenvolvimento do processo.

### 5.2.6 Estudo do escalonamento do processo de produção de xilanase em FES

#### *Produção de xilanase em biorreator do tipo bandeja perfurada*

Um dos mais importantes fatores que devem ser otimizados na FES utilizando biorreatores do tipo bandeja, é a altura do leito. Foram testadas três diferentes alturas do leito de fermentação. Na Tabela 28 estão sumarizados os resultados da atividade enzimática obtida nas diferentes condições.

Tabela 28 - Atividade xilanolítica, por fermentação no estado sólido, por *Streptomyces viridosporus* T7A, em biorreator tipo bandeja.

Tempo (dias)	Altura do leito (cm)	Atividade U/g (seco)
5	2	60,70
	4	74,60
	6	51,60
6	2	71,69
	4	66,00
	6	46,28
7	2	62,26
	<b>4</b>	<b>90,00</b>
	6	85,63
8	2	22,10
	4	36,40
	6	29,00

A atividade xilanolítica no reator tipo bandeja começou a ser detectada a partir do segundo dia, e foi aumentando até o sétimo dia. Depois deste momento, a atividade entrou em declínio a partir do oitavo dia. As análises continuaram sendo feitas até o décimo dia.

Quanto à altura do leito, pode-se constatar que nas bandejas cujo leito apresentava 4 cm a atividade enzimática obtida foi maior (90 U/g). Nas bandejas com altura de leito de 2 cm, o controle da umidade foi mais difícil de ser feito. Isto se



deve provavelmente à perda de água por evaporação do substrato nestas condições. Como a umidade é um fator físico importante para o microrganismo, a produção nesta condição foi menor (60,0; 71,7; 62,2; 22,1 U/g; nos dias 5,6,7 e 8 da fermentação, respectivamente). Com a altura de 6 cm, um leito mais alto, pode haver uma maior compactação do material, além de dificuldades de trocas gasosas, o que levou a produções menores de xilanase (51,6; 46,3; 85,6; 29,0 U/g nos dias 5, 6,7 e 8 da fermentação, respectivamente).

#### *Produção de xilanase em Biorreator do tipo tambor horizontal com agitação*

Os resultados obtidos em biorreator do tipo tambor horizontal com agitação estão sumarizados na Tabela 29. Neste tipo de biorreator a atividade máxima alcançada também ocorreu no sétimo dia, embora tenha sido menor (80,50 U/g) do que a obtida em biorreatores do tipo bandejas perfuradas.

É importante ressaltar que a produção de xilanase não ocorreu conforme o esperado. Em colunas aeradas, a produção foi maior (447 U/g), o que demonstra a importância de uma aeração eficiente. Em escala maior podem ocorrer problemas de compactação do substrato que dificultam as transferências gasosas, havendo ainda um aumento excessivo da temperatura e, conseqüente, perda de água por evaporação, ou seja, diminuição da umidade.

Com a análise dos resultados do escalonamento, verifica-se que há possibilidade de se produzir xilanase por *Streptomyces viridosporus* T7A em ambos os tipos de biorreatores, tambor horizontal com agitação e do tipo bandejas perfuradas. Desta forma faz-se necessário adequar um equipamento que mantenha os fatores físicos próximos do ideal. Este problema não foi verificado na fermentação submersa, pois estes fatores puderam ser controlados de forma adequada. Infelizmente a indisponibilidade de dados da literatura sobre a produção de xilanase pelo *S. viridosporus* T7A por FES, não permite uma discussão para que se possa comparar os resultados. De qualquer forma, pode-se afirmar que em escala laboratorial e no cultivo submerso a produção da xilanase foi satisfatória, no entanto, do ponto de vista de viabilidade biotecnológica, a produção precisa ser incrementada e, portanto, novos estudos deverão ser conduzidos.

Tabela 29 - Atividade xilanolítica, por fermentação no estado sólido, por *Streptomyces viridosporus* T7A, em biorreator horizontal.

Tempo (dias)	U/g (seco)
5	66,00
6	74,30
7	80,50
8	39,00

A Figura 18 ilustra a produção máxima obtida em biorreator horizontal em função do tempo

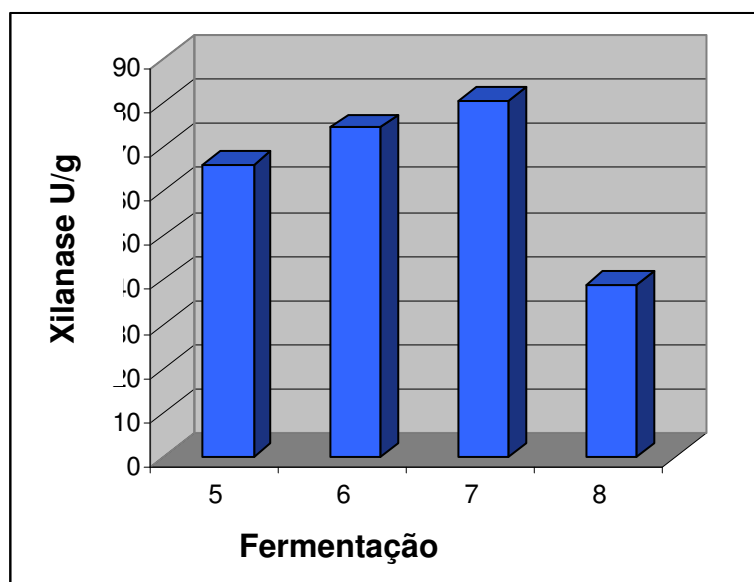


Figura 18 - Produção de xilanase de *Streptomyces viridosporus* T7 em biorreator tipo tambor horizontal com agitação por FES

### 5.2.7 Evolução da produção de xilanase e biomassa por FES em biorreatores do tipo coluna

Um dos aspectos mais importantes da FES, tanto em escala laboratorial quanto nas escalas piloto e industrial, é a estimativa da biomassa. Os métodos

normalmente utilizados em cultura líquida não podem ser aplicados. A adesão do microrganismo ao suporte/substrato inviabiliza tal estimativa. Uma forma de avaliar o crescimento e a sua relação com a produção de biomoléculas em sistemas de FES seria analisar a produção de CO<sub>2</sub> e consumo de O<sub>2</sub> durante o processo. O consumo de O<sub>2</sub> e a produção de CO<sub>2</sub> é o resultado da atividade metabólica dos microrganismos, através da qual obtém-se a energia necessária para o seu crescimento e manutenção. Esta metodologia pode ser utilizada como estimativa da síntese da biomassa. Muitos autores utilizaram a respirometria para acompanhar de maneira contínua os gases, CO<sub>2</sub> e O<sub>2</sub>, que saem dos biorreatores (SOCCOL & VANDENBERGHE, 2003).

Nos biorreatores do tipo coluna, a aeração ocorre por injeção de ar comprimido. As trocas gasosas são então realizadas entre o ar e a matriz sólida. Em FES a aeração tem as seguintes finalidades: manutenção das condições aeróbias, retirada do CO<sub>2</sub>, controle da temperatura e umidade.

A Figura 19 apresenta a evolução do CO<sub>2</sub> (A) e produção de xilanase (B). Observa-se que o CO<sub>2</sub> começa a ser detectado após 12 horas de fermentação, atingindo o máximo fluxo (0,50 mM/h) em 21 horas. A partir deste momento, há um decréscimo da quantidade de CO<sub>2</sub> liberada até 41 horas onde permanece constante (0,20 mM/h) até o final da fermentação mostrando que o microrganismo permanece respirando.

A produção de xilanase (Figura 19 B) se inicia somente a partir de 24 horas de fermentação (4,65 U/g), atingindo o ponto máximo (76,2 U/g) em 96 horas. Tal fato demonstra uma produção não associada ao crescimento do *Streptomyces viridosporus*. A produção da enzima neste experimento, apesar deste ter sido realizado nas condições previamente estabelecidas como favoráveis, não foi satisfatória por uma série de fatores. Em primeiro lugar, a umidade do substrato não estava nas condições ideais, ou seja, 90%, pois a água livre escorreu do material. Outro fator importante a ser relatado foi a dificuldade de se manter a temperatura em 37°C, o que contribuiu para uma produção mais baixa de xilanase. Mesmo assim, pode-se prever, a partir dos presentes resultados, o comportamento do microrganismo, o seu crescimento e a relação deste com a produção de xilanase.

Verificou-se uma queda na produção de xilanase a partir de 97 horas de fermentação. Sugere-se que tal decréscimo possa ser devido à presença de inibidores no meio, tais como proteases que estão sendo produzidas paralelamente. Outros inibidores podem estar atuando, como açúcares que vão sendo liberados no decorrer do processo, além de outros compostos. Estudos futuros deverão ser conduzidos para elucidar estes fatos.

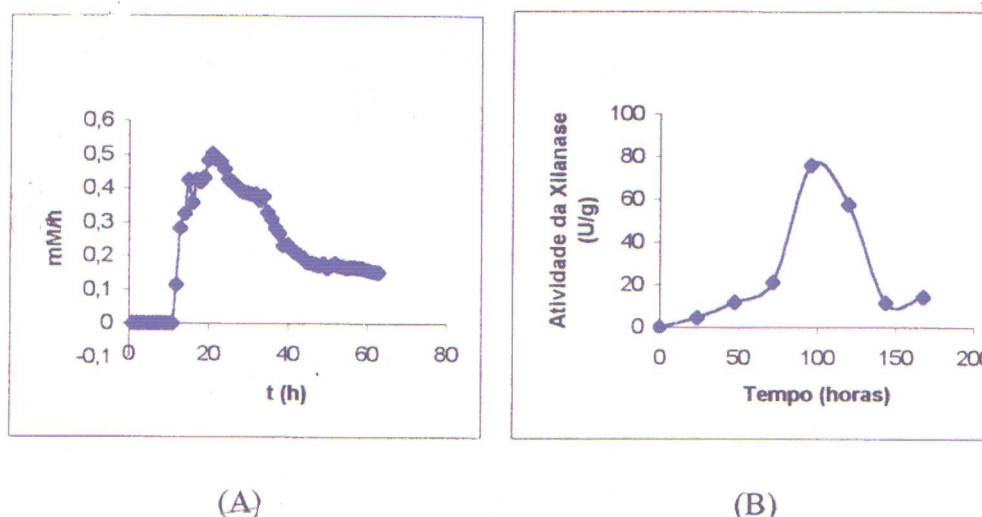


Figura 19 - (A) Evolução do CO<sub>2</sub> durante a produção de xilanase (B) por FES por *Streptomyces viridosporus*

A biomassa, estimada no período de 0 a 26 horas de fermentação, período de crescimento exponencial, variou de 0,1 a 0,44 g.

A partir de valores calculados para a produção de CO<sub>2</sub>, estimou-se os parâmetros biotecnológicos do processo. Considerou-se o balanço de massa em relação à produção de CO<sub>2</sub>, em correspondência linear em relação ao consumo de O<sub>2</sub>, pois ocorreram problemas com o sistema de análises de O<sub>2</sub>. A equação de SATO *et al.* (1983), apresentada no item 4.4.6, foi utilizada para os cálculos.

O procedimento para o cálculo da biomassa (X<sub>n</sub>) em um dado tempo (t), consiste em estimar os valores de rendimento de biomassa baseado no consumo de O<sub>2</sub> e para o coeficiente de manutenção (m). O software FERSOL (RODRIGUEZ LÉON *et al.*, 1988) foi utilizado nos cálculos. Dois (2) pontos de biomassa foram

medidos analiticamente para as amostras nos tempos 0 e 26 horas. Os valores medidos foram confrontados com os valores preditos. Por aproximação sucessiva, o software permitiu determinar os coeficientes da equação. A partir dos valores obtidos experimentalmente, o sistema determinou um rendimento de biomassa ( $Y_{x/o}$ ), baseado no consumo de  $O_2$  de 2,816 g de biomassa de  $O_2$  consumido e um coeficiente de manutenção de 0,0036 g de  $O_2$  consumido de biomassa $^{-1}h^{-1}$ .

A biomassa, estimada no período de 0 a 26 horas de fermentação, período de crescimento exponencial, variou de 0,1 a 0,44 g. A partir da estimativa da biomassa, foi calculada uma velocidade ( $\mu$ ) de crescimento específica de 0,126  $h^{-1}$  com um coeficiente de regressão ( $R^2$ ) de 0,987.

### 5.3 Atividade Antimicrobiana do Extrato Bruto Enzimático

O extrato enzimático obtido da fermentação por *S. viridosporus* T7A, não foi capaz de inibir o crescimento das bactérias Gram negativas (*Salmonella* sp., *Pseudomonas* sp e *E.coli*). No entanto, o produto promoveu um halo de inibição nas culturas de *Staphylococcus aureus* tanto naquelas causadoras de intoxicação alimentar quanto nas de mastite. Apesar do halo de inibição ter sido modesto, acredita-se que utilizando um processo de separação ou de purificação os resultados possam ser mais consistentes. O efeito do extrato bruto enzimático sobre o crescimento de *S. aureus* está apresentado na Figura 20.



Figura 20 - Halo de inibição do crescimento de cultura de *Staphylococcus aureus* pelo extrato bruto enzimático obtido pela fermentação de com *S. viridosporus* T7A

Após o período de incubação dos meios contendo o extrato bruto enzimático obtiveram-se os resultados apresentados na Tabela 30.

Tabela 30 - Resultados da inibição do crescimento pelo extrato bruto enzimático de *S. viridosporus* sobre o crescimento de *S. aureus* em agar manitol

Diluição	Controle	Meio Manitol + Extrato bruto enzimático	Diferença
S/ diluir	$0,9 \times 10^9$	$1,2 \times 10^5$	$10^4$
$10^{-1}$	$1,1 \times 10^8$	$1,05 \times 10^4$	$10^4$
$10^{-2}$	$1,2 \times 10^7$	$1,08 \times 10^3$	$10^4$
$10^{-3}$	$1,04 \times 10^6$	$1,3 \times 10^2$	$10^4$
$10^{-4}$	$0,9 \times 10^5$	$10^1$	$10^4$

Conforme os resultados obtidos com este estudo, observou-se que o extrato bruto enzimático quando adicionado ao meio manitol inibiu o crescimento do *S. aureus*. Em todas as diluições a diferença entre os valores obtidos nas placas contendo extrato e controle foram de menos quatro ciclos logarítmicos.

Sugere-se que a atividade antimicrobiana possa ser determinada por algum metabólito secundário excretado pelo *S. viridosporus* T7A, durante o processo fermentativo. Tal fato não foi relatado na literatura. Também pode –se sugerir que os polifenólicos provenientes da degradação da cadeia da lignina, exercida pelo

microrganismo, possam ter efeitos como antimicrobiano. Quanto ao espectro de inibição, é necessário verificar se a substância só inibe o crescimento de bactérias Gram positivas, ou se é preciso uma quantidade maior da substância antimicrobiana para que haja também a inibição do crescimento das bactérias Gram negativas.

Sugere-se que estudos de separação e purificação sejam feitos para caracterizar a substância antimicrobiana liberada durante o processo fermentativo do *S. viridosporus* T7A, em meio sólido.

#### 5.4 Teste de Inocuidade do Extrato Bruto Enzimático

Durante 30 dias, o desenvolvimento celular foi acompanhado diariamente em microscópio ótico. Avaliava-se a integridade da monocamada, a viabilidade celular (conformação e coloração), morte celular e longevidade.

A Figura 21 ilustra o método empregado para avaliação da inocuidade do extrato bruto enzimático em cultivo de células animais.

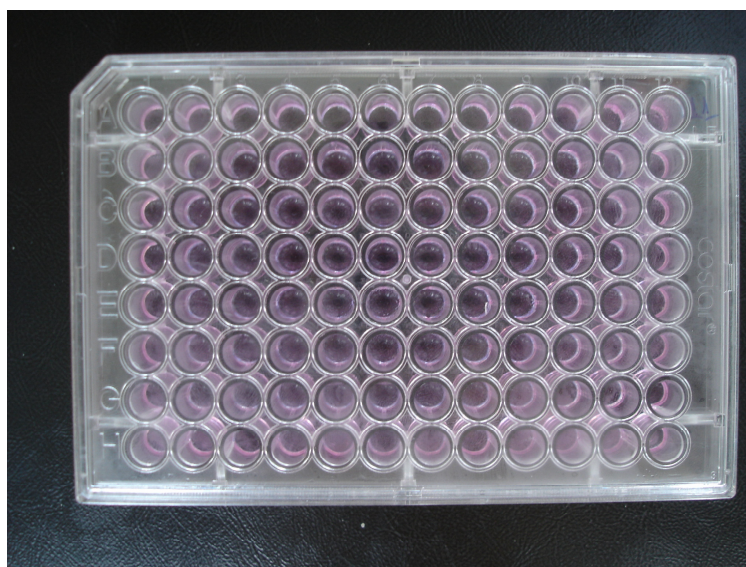


Figura 21 - Diferentes diluições do extrato bruto enzimático de *S. viridosporus* T7A, em cultivo de células MDBK, PK-15 e VERO, feita em microplaca de poliestireno.

Os resultados deste estudo estão sumarizados na Tabela 31.

Tabela 31 - Estudo da influência do extrato bruto enzimático de *S. viridosporus* T7A, obtido por fermentação sólida, em cultivo celular

Diluição	1:5	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280	1:2560	1:5120	Controle
MDBK	-	-	-	-	-	-	-	-	-	*	-	-
PK-15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	*	-	-
VERO	-	-	-	-	-	*	-	-	-	-	-	-
CONT.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

MDBK: *Madin Darby Bovine Kidney*

PK-15: *Porcine Kidney*

VERO: *Cercopithecus aethiops, Monkey African Green*

\*: viabilidade celular superior ao grupo controle, maior longevidade, monocamada confluenta - ausência de toxicidez.

Na presença do extrato bruto enzimático as células apresentaram crescimento e longevidade superiores às células de controle.

Na Figura 22 está ilustrada a imagem microscópica do cultivo celular com linhagem PK-15.

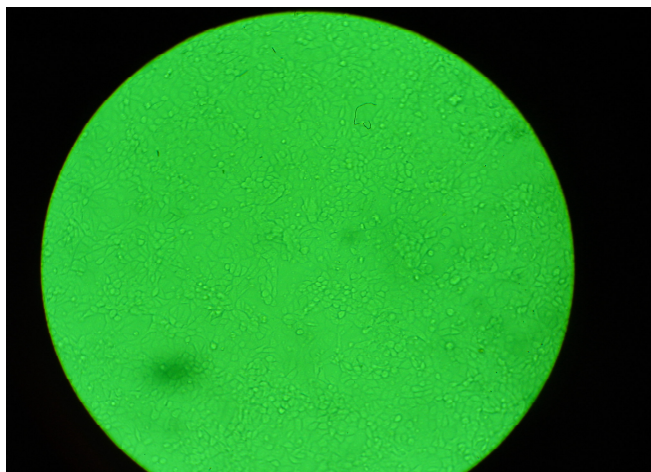


Figura 22 - Foto ilustrativa da imagem microscópica ao M.O. (200x) do cultivo celular, com células PK-15, com 4 dias de incubação. A imagem revela monocamada confluenta e intacta.



Na Figura 22 observa-se que as células tratadas com extrato bruto enzimático em diluições de 1: 2.560 mantiveram estas características por mais tempo, cerca de 20 dias a mais (o dobro) que as células não tratadas (controle).

O extrato bruto enzimático não apresentou toxicidade para as linhagens de células testadas, ao contrário, nas diluições de 1:2560 para as linhagens MDBK e PK-15 verificaram-se maior crescimento e maior longevidade, já em cultivo de células VERO, este mesmo efeito foi verificado, mas em diluição de 1:160.

Após 30 dias, nos cultivos celulares onde extrato bruto enzimático estava presente, as células apresentavam viabilidade com monocamada sem deslocamento e ainda confluenta. Nas células controle, no vigésimo dia, todas as células já estavam mortas. Estes resultados sugerem que o extrato bruto enzimático obtido por fermentação sólida tem propriedades citoprotetoras.

Acredita-se que isto se deva aos compostos fenólicos presentes no extrato bruto enzimático, liberados durante a fermentação (cumárico e ferúlico) (RAMACHANDRA, 1997), os quais possuem atividades antioxidantes, bloqueando os radicais livres, protegendo a célula da lipoperoxidação e do envelhecimento (FERGUSON, 2001; ANDREASEN *et al.* , 2001). Embora, esta afirmação seja prematura, sugere-se que estudos mais aprofundados sejam feitos para elucidar e validar o efeito citoprotetor do extrato bruto enzimático obtido pela fermentação de *S. viridosporus* T7A. A morte celular e o descolamento da monocamada estão ilustradas na Figura 23.

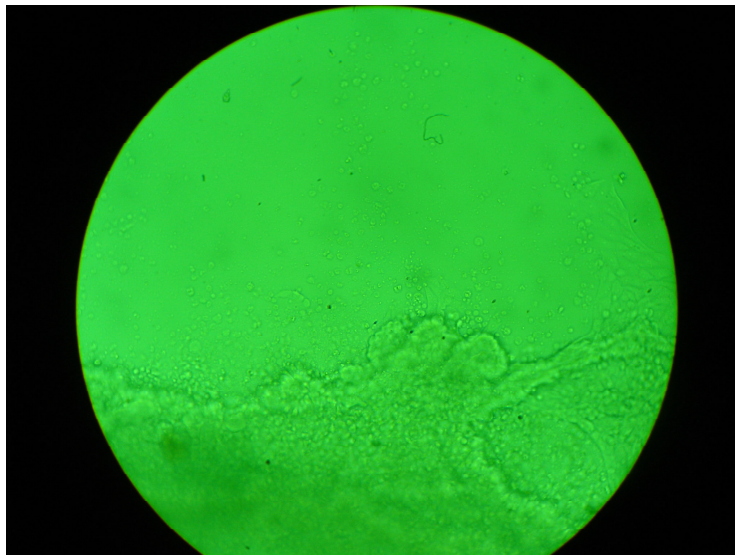


Figura 23 - Foto ilustrativa da imagem microscópica ao M.O (200x) do cultivo celular, com células PK-15, descolamento da monocamada do cultivo celular. As células descoladas formam um agregado na parte inferior da imagem. As células que aparecem destacadas já estão mortas.

Na Figura 23 observa-se que as células que não receberam o extrato bruto enzimático de *S. viridosporus* este evento ocorreu mais cedo, entre o 7<sup>o</sup> e 10<sup>o</sup>, e a morte de todas as células no 20<sup>o</sup> dia. No entanto para as células em presença do extrato bruto enzimático (em diluição 1:2560) este evento iniciou somente a partir do 30<sup>o</sup> dia.

#### *Teste de inocuidade em camundongos*

Todos os animais que fizeram parte do experimento sobreviveram. Nenhuma alteração que pudesse ser atribuída à possível toxicidade do extrato bruto enzimático foi observada. Figura 24 está ilustrada a condição em que o teste com o extrato bruto enzimático foi realizado em camundongos.



Figura 24 - Foto ilustrativa do experimento realizado com a inclusão do extrato bruto enzimático de *S. viridosporus* T7A na água de bebida de camundongos, em diluições de 1/100 e 1/1000, comparando-se com controle, sem adição.

Os animais que receberam o extrato bruto enzimático na diluição de 1/100 na água de bebida apresentaram peso final superior à média do grupo controle, ou seja, de 21,95 e 20,21 g respectivamente, significativo a 5%. Já o grupo que recebeu o extrato em proporção de 1/1000, na água de bebida, embora tenha tido média de peso final superior à do grupo controle, esta diferença não foi significativa estatisticamente. Os dados estão apresentados na Tabela 32.

O objetivo deste experimento era apenas avaliar se o extrato bruto enzimático poderia apresentar algum tipo de toxidez para os animais. No entanto, o extrato não foi tóxico para os animais, bem como melhorou o desempenho em termos de peso final. Sugere-se que novos estudos sejam conduzidos para avaliar detalhadamente os compostos presentes no extrato bruto enzimático proveniente da fermentação no estado sólido por *S. viridosporus* T7A que influenciam na flora intestinal, digestão e absorção de nutrientes, além do complexo enzimático fibrolítico conhecido.

A Tabela 32 sumariza os resultados obtidos no experimento, bem como a análise estatística empregada

Tabela 32 - Resultado da análise de inocuidade do extrato bruto enzimático, em camundongos, obtido por fermentação de *S. viridosporus* T7A, no estado sólido.

Doses	Controle		1/100 (D1)		1/1000 (D2)	
Média	20.21		21.95		21.17	
Teste	Bonferroni	P	Bonferroni	p	Bonferroni	P
Controle	-	-	-	-	-	-
1/100 (D1)	3.982	0.0002*	-	-	-	-
1/1000 (D2)	2.248	0.0285	-1.777	0.081	-	-

\* existe diferença significativa entre o grupo 1/100 e o controle.

#### *Inclusão do extrato fermentado em dieta de frango de corte*

Os resultados do ganho de peso e conversão alimentar para o teste com frango de corte são apresentados na Tabela a seguir.

Tabela 33 - Peso e conversão alimentar de lotes de frango de corte com dietas contendo extrato bruto enzimático de *S. viridosporus* T7A

Lote	Conversão Alimentar	Peso aos 42 dias
		Gramas
1	1,76	1.820
2	1,68	1.840
3	1.72	1.740

Lotes:

1- sem adição de extrato bruto enzimático

2 - 0,1% de extrato bruto enzimático

3 – 0.05% de extrato bruto enzimático

Como evidencia a Tabela 33 os animais do lote que receberam 0,1% de extrato bruto enzimático apresentaram desempenho superior com relação aos demais. No entanto, apesar do peso final ter sido maior, não houve diferença significativa entre os lotes testados. Com relação à conversão alimentar, o lote 2 apresentou vantagem (4,76%) em relação ao grupo controle. A análise estatística para avaliar o grau de significância deste dado não pode ser feita, já que é uma variável calculada por lote e não por indivíduo.

Estes resultados mostram que a adição de extrato bruto enzimático de *S. viridosporus* T7A não acarretou efeitos colaterais nas aves testadas. Acredita-se que os efeitos benéficos do extrato se refletiram na melhor conversão alimentar, o que pode ser explicado pela atividade da xilanase presente no extrato. Pois o uso de xilanase junto com outras hemicelulases aumenta o valor nutritivo do alimento (KULKARNI *et al*, 1999; COWAN, 1996). A adição de  $\beta$ -glucanase e xilanase durante a produção da ração aumenta a sua degradabilidade e como conseqüência tem-se o aumento na digestão e absorção de componentes da ração (COWAN, 1996).

Acredita-se que as propriedades antioxidantes exercidas pelos compostos fenólicos (cumárico, ferúlico e vanílico) além do efeito inibidor sobre o crescimento de bactérias Gram positivas, tais como *Streptococcus* sp. e *Staphylococcus* sp. possam também ter colaborado para o desempenho das aves tratadas, com relação ao grupo controle. Como exemplo, observa-se que o *Streptococcus fecalis* que causa enterite e interfere na digestão e absorção dos alimentos. Novos ensaios deverão ser feitos no intuito de determinar e quantificar estas substâncias no extrato bruto enzimático de *S. viridosporus* T7A. Embora estas afirmações sejam um pouco prematuras, elas podem ser explicadas em parte, baseando-se em dados da literatura (FERGUSON, 2001 e ANDREASEN, 2001), e evidências neste estudo, que estes compostos poderão trazer benefícios à saúde animal, tais como o efeito inibidor de crescimento de bactérias patogênicas e citoprotetor, que podem melhorar o desempenho dos animais de produção.

Portanto, a partir deste estudo preliminar, novos ensaios deverão ser feitos no intuito de determinar e quantificar estas substâncias no extrato bruto enzimático de *S. viridosporus* T7A, bem como detalhar os efeitos sobre a flora intestinal e o processo de digestão e absorção das aves, além dos efeitos das enzimas fibrolíticas conhecidas

A Figura 25 ilustra o experimento realizado com a inclusão do extrato bruto enzimático de *S. viridosporus* T7A na dieta de frangos para corte.



Figura 25 - Foto ilustrativa do experimento realizado, para avaliar os efeitos do extrato bruto enzimático de *S. viridosporus* T7A, obtido por fermentação no estado sólido, na dieta de frangos para corte.

*Efeito do extrato bruto enzimático sobre a digestibilidade “in vitro” da matéria seca em ruminantes*

Os resultados obtidos nos testes de digestibilidade *in vitro* estão apresentados a seguir.

Tabela 34 Efeitos do extrato bruto enzimático de *S. viridosporus* T7A em prova de digestibilidade *in vitro* da matéria seca em ruminantes

Grupo	Média da Digestibilidade <i>in vitro</i> %
Controle (s/ adição)	55,89
0,2%	56,43
0,5%	55,05
2%	55,39
5%	55,62

Por meio da análise e com base no teste ANOVA, verificou-se que não houve diferença estatística significativa entre os grupos em nível de 5%, embora o grupo tratado com 0,2% tenha tido média de digestibilidade superior aos demais. Estes resultados mostram que o complexo enzimático, nos níveis testados, contido no extrato bruto enzimático, principalmente a xilanase, não foi capaz de incrementar o

processo de digestibilidade nos ruminantes. Os resultados não foram os mesmos obtidos por YANG *et al.* (2000), que verificaram um aumento da digestibilidade usando 59 U/Kg de matéria seca, quantidade inferior à utilizada neste estudo (de 100 a 500 U/Kg). A flora do ruminante produz grandes quantidades de xilanase e celulase (ANDRIGUETTO, 1983), portanto o impacto sobre a digestão é menor do que aquele observado em monogástricos. Também deve ser ressaltada a presença dos compostos fenólicos liberados na degradação da lignina (no processo de fermentação do *S. viridosporus* T7A), pois VAREL & JUNG (1986) provaram que os monômeros fenólicos podem inibir a digestibilidade da celulose e xilano, possivelmente influenciando o ataque dos organismos fibrolíticos às partículas da fibra. Também BORNEMAN (1986) confirmou esta hipótese, pois a presença de ácido sinápico, seringadeído, ácido siríngico, ferúlico, vanilina, ácido vanílico, ácido coumárico, p-hidroxibenzaldeído, ácido p-hidroxibenzóico, ácido hidrocínâmico não estimulam a degradação *in vitro* da matéria seca, enquanto o ácido cinâmico e o aldeído benzóico reduzem a digestão pela população ruminal, além disto, o ácido p-hidroxibenzóico ou p-coumárico resulta em alterações ultraestruturais das bactérias ruminais. Desta forma pode-se dizer que a xilanase liberada pelo *S. viridosporus* T7A pode contribuir com a digestibilidade da matéria seca para os ruminantes. No entanto, quando a porção da lignina é hidrolisada, os compostos fenólicos resultantes podem influenciar negativamente no processo fermentativo da fibra da dieta desses animais. Também, foi verificado que o extrato bruto enzimático tem propriedades antimicrobianas, o que pode também inibir o crescimento de bactérias importantes para o processo fermentativo da fibra no ruminante. Então, acredita-se que a xilanase do extrato bruto enzimático possa ter exercido um efeito positivo na fermentação, mas pode ter sido sobrepujado pela ação de compostos fenólicos liberados e, também pelo efeito inibitório do extrato bruto sobre bactérias Gram positivas.

## 6. CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos e analisados nestes experimentos, conclui-se que:

*Na fermentação submersa:*

- Dos substratos naturais utilizados no processo fermentativo, o capim Napier proporcionou melhores produções de xilanase, seguido pelo milho (planta integral). Destaca-se o fato de serem substratos de baixo custo e facilmente obtidos;
- Com relação à concentração do substrato, conclui-se que quando utilizada próximo de 1% (p/vol) resulta em melhores produções de xilanase;
- O pH é um fator importante, mostrando que a produção de xilanase do *S. viridosporus* T7A é maior em meio alcalino, em torno de 8,6;
- Pode-se afirmar que as temperaturas próximas de 37°C podem proporcionar boas produções de xilanase.
- Melhores resultados foram obtidos com a suplementação usando farelo de soja a 1 % (p/v), quando comparada à uréia e ao extrato de levedura;
- Ocorre um incremento na produção de xilanase quando ao meio é adicionado vitaminas do complexo B;
- Quando se adiciona hidroxietilcelulose ao meio de fermentação há resposta positiva na produção de xilanase;
- Quanto à suplementação de sais, nos níveis testados, apenas a fonte de fosfato ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) apresentou resultado positivo com significância estatística ( $p < 0,01$ );
- O processo de ultrafiltração (em coluna de 30 kDa) seguido de liofilização foi efetivo para concentração enzimática da xilanase (45 vezes, 2.272,0 U/g) e peroxidase (100U/g);



#### *Na fermentação em meio sólido:*

- O estudo para determinar o substrato-suporte revelou que a proporção em que melhores resultados foram obtidos para produção de xilanase foi : 70% de bagaço de cana; 20% de capim Napier e 10% de farelo de soja;
- A inoculação pode ser feita diretamente com esporos, no entanto a atividade máxima de xilanase é alcançada a partir de 168 horas de fermentação (410,9 U/g). No entanto, quando o substrato é inoculado com células na forma vegetativa (pré-ativação) à partir de 48 horas, a produção de xilanase é inferior (283,33 U/g)
- O pré-tratamento do substrato em vapor fluente por 60 minutos a 100<sup>0</sup>C é dispensável, já que maiores níveis de produção de xilanase foram obtidos com substrato apenas esterilizado;
- A taxa de inoculação de 10<sup>7</sup> esporos/g de substrato, neste estudo, foi considerada a melhor, e verificou-se também que à partir deste número a produção de xilanase entra em declínio;
- Com relação aos fatores físicos estudados, a umidade exerceu grande influência sobre a produção de xilanase, já que altos percentuais resultaram em melhores produções. O bagaço de cana é um substrato-suporte adequado, pois mostrou grande capacidade de retenção de água. A aeração também exerceu efeito positivo, mas nos níveis testados, não houve diferença significativa;
- Quanto ao escalonamento, os resultados em biorreatores tipo bandeja e em tambor rotativo com aeração forçada foram semelhantes, embora a atividade obtida em escala semi-piloto tenha sido inferior, quando comparada à escala laboratorial;

#### *Atividade antimicrobiana*

- O extrato bruto enzimático obtido por fermentação no estado sólido inibiu o crescimento de cepas patogênicas de *S. aureus* e *Streptococcus* sp, no entanto não foi capaz de inibir o crescimento de cepas Gram negativas tais como a *Salmonella* sp., e *E. coli*;

#### *Testes de Inocuidade*

- Em cultivo de células tipo PK-15; MDBK e VERO, o extrato bruto enzimático não apresentou efeitos citotóxicos nas diluições testadas (1:5 a 1:5.120). Evidências de propriedades citoprotetoras foram observadas no extrato bruto enzimático, já que em células do tipo MDBK e PK-15 nas diluições de 1:2560 foi observado maior viabilidade e longevidade celular.
- Em camundongos o extrato bruto enzimático incluído na água de bebida não causou efeitos tóxicos, e além disto melhorou o peso final dos animais tratados (1:100) em relação ao grupo controle ( $p < 0,05$ );

#### *Influência do extrato bruto enzimático em dieta animal*

- A inclusão do extrato bruto enzimático seco na dieta de frangos para corte melhorou a conversão alimentar (4,76%) em níveis de 0,1% sobre a ração quando comparada ao grupo controle. No entanto, a adição do extrato bruto enzimático não influenciou significativamente o ganho de peso dos animais tratados;
- O extrato bruto enzimático adicionado em níveis de 0,2; 0,5; 2,0 e 5% não afetou a digestibilidade da matéria seca, em provas de digestibilidade de ruminantes *in vitro*.
- O extrato bruto enzimático apresenta um complexo enzimático fibrolítico, e também substâncias antimicrobianas e citoprotetoras, que merecem ser estudados mais profundamente devido ao grande potencial de aplicação em saúde animal.

#### SUGESTÕES PARA ESTUDOS FUTUROS

A partir deste estudo, acredita-se que trabalhos futuros, usando a cepa de *S. viridosporus* T7A, poderão ser feitos para:

- separar e caracterizar as substâncias produzidas pelo microrganismo, decorrentes da degradação da lignina, e testá-las isoladamente em cultivos de células de animais e em testes de inibição de crescimento de bactérias patogênicas;

- avaliação do potencial antioxidante dos derivados da lignina, para aplicação em dietas de animais e para fins farmacológicos;
- testar o produto em animais desafiados com agentes patogênicos;
- seguir a seqüência de otimizações ou produzir cepa mutante para aumentar a produção da xilanase;
- estudar a produção da lignina peroxidase, que têm aplicações importantes para biodegradação de resíduos lignocelulósicos.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIOVE. Associação brasileira da indústria de óleos vegetais. Disponível em: <http://www.abiove.com.br/estatis.html>> Acesso em: 03 dez. 2004.

ABRAHÃO NETO, J. Purificação de enzimas In: LIMA, U.; AQUARONE, E. BORZANI, W.; SHIMIDELL, W., **Biotecnologia industrial**. vol. 3 .São Paulo: Edgard Blücher Ltda, 2001. p. 377-404.

ADAMSEN, A K.; LINDHAGEN, J.; AHRING, B. K. Optimization of extracellular xylanase production by *Dictyoglomus* sp. B1 in continuous culture. **Applied Microbiology Technology**, v.44; 327-332, 1995.

ADHI, T. P.; KORUS, R. A.; CRAWFORD, D.L. Production of major extracellular enzymes during lignocellulose degradation by two Streptomyces in agitated submerged culture. **Applied environmental microbiology**, p. 1165-1168, may. 1989.

ANDREASEN, M. F.; KROON, P. A.; WILLIAMSON, G.; GARCIA-CONESA, M.T. Intestinal release and uptake of phenolic antioxidant diferulic acids. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 31, n. 3, p. 304-314, 2001.

ANDRIGUETTO, J. M. **Nutrição animal**. 4. ed. São Paulo: Nobel, 1983.

ANNISON, G. The use of enzymes in ruminant diets In: BIOTECHNOLOGY IN THE FEED INDUSTRY PCOCEEDINGS OF ALLTECH'S 13 TH ANIMAL SYMPOSIUM. Nattingam, UK.: Nattingham University Press, 1997. p 115-127.

ANTAI, S.P. & CRAWFORD, D.L. Decomposition of softwood, hardwood and grass lignocelluloses by two *Streptomices strains*. **Applied Environmental Microbiology**, v. 42, p. 378-380, 1981.

ANTONOPOULOS, V. T.; HERNANDEZ, M.; ARIAS, M.E.; MAVRAKOS, E. BALL, A. S. The use of extracellular enzyme from *Streptomyces albusi* ATCC 3005 for the bleaching of eucalyptus kraft pulp. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 54, p. 92-97, 2001.

BALL, A.S. Degradation by *Streptomyces viridosporus* T7A of plant material grown under elevated CO<sub>2</sub> conditions. **Fems Microbiology Letters**, v.68, n.2, p.139-42, nov. 1991.

BAILEY, M..J.; BIELY, P.; PANTONEN, K. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. **Journal of Biotechnology**.,v. 23, 257-270. 1992

BAGNON, S.M. **Production de 6-pentyl-alfa-pyrone par Trichoderma harzianum cultivé sur support solide**. Montpellier, 1999. Thèse (Doctoract, es Sci.) – Université de Montpellier II.

BANCI, L. Strutral properties of peroxidases. **Journal of Biotechnology**, v. 53, p. 253-263, 1997.

BEAUCHEMIN, K. A.; RODE, L. M. Use of feed enzymes in ruminant nutrition. In: ANIMAL SCIENCE RESEARCH AND DEVELOPMENT. PROCEEDING OF CANADIAN SOCIETY OF ANIMAL SCIENCE MEETING. Alberta. Lethbride: 1996. p. 103-130.

BEEVER, D.E. Rumen function In: FORBES, J.M.; FRANCE, J. **Quantitative aspects of ruminant digestion and metabolism**. New York: Cab. International, 1993. p 187-193.

BEG, Q.K.; BHUSHAN, B.; KAPOOR, M.; HOONDAL, G. S. Enhanced production of a thermostable xylanase from *Streptomyces* sp. QG-11-3 and its application in biobleaching of eucalyptus kraft pulp. **Enzyme Microbiology Techonology**, v. 27, p.459-466. 2000.

BHAT, 2000 Cellulases and related enzymes in biotechnology. **Biotechnology Advances**, v. 18, p. 355-383, 2000.

BORDIN, E. M. **Otimização de diferentes celluloses como substrato para obtenção de celulase por fermentação fúngica submersa**. Curitiba, 1995. 41. Monografia (Especialização em Processos Biotecnológicos) – Setor de Tecnologia – Universidade Federal do Paraná.

BOHME H. Experiments on the efficacy of enzyme supplements as a growth promoter for piglets. **Landbauforsch Volkenrode**, v. 40, p.213-217, 1990.

BORNEMAN, W.S.; AKIN, D. E.; VANESELTINE, W. P. Effect of phenolic monomers on ruminal bacteria. **Applied Environmental Microbiology**, p.1331-1339, dec. 1986.

BRECCIA, J. D.;SIFIERIZ, F.; BAIGORI M. D.; CASTRO, G.R.; HATTI-KAUL, R. Purification and characterization of a thermostable xylanase from *Bacillus amyloliquefaciens*. **Enzyme Microbiology Technology**, v. 9, p. 22-42. 1998.

CANNEL, E. & MOO-YOUNG, M. Solid state fermentation systems. **Process Biochemistry**, p. 2-7, jun/jul. 1980.

COWAN, W.D. Animal feed. In: Godfrey T. **Industrial Enzimology**. London Macmillan Press, 2 ed, 1996. p. 360-71.

COSTA, A.F. Farmacognosia. v.1, 5. ed. Lisboa: Calouste Gulbenkian, 1994.

CRAMPTOM, E.W.; HARRIS, L. **Nutrição animal aplicada**. Zaragoza: Acribia, 1974.

CRAWFORD, D.L. Lignocellulose decomposition by selects *Streptomyces* strains. **Applied Environmental Microbiology**, v.35, n.6, p. 1041-5.1978.

CRAWFORD, D. L.; POMETTO III, A. L.; CRAWFORD, R. L. Lignin degradation by *Streptomyces viridosporus*: Isolation and characterization of a new polymeric lignin degradation Intermediate. **Applied and Environmental Microbiology**, v.45, n. 3, p.898-904, mar.1983.

CRAWFORD, D. L.; POMETTO III, A. L.; CRAWFORD, R. L. Production of useful modified lignin polymers by bioconversion of lignocellulose with *Streptomyces*. **Biotechnology advances**, v. 2, p. 217-232, 1984.

CRISPIM, J. E. & VIEIRA, S. A. Cana de açúcar: boa alternative agrícola e energética para a agricultura nacional, 2004. Disponível em: <<http://www.planetaorganico.com.br/trabcana.1.htm>>Acesso em: 08 dezembro 2004.

DUARTE, M. C. T.; PORTUGAL, E. P.; PONEZI, A. N.; BIM, M. A; TAGLIARI, C. V.; FRANCO, T. T. Production and purification of alkaline xylanases. **Bioresource Technology**, v. 68, 49-53, 1999.

DEL BIANCHI, V. L.; MORAES, I. O.; CAPALBO, D. M. F. Fermentação no estado sólido In: LIMA, U.; AQUARONE, E. BORZANI, W.; SHIMIDELL, W., **Biotecnologia industrial**. São Paulo: Edgard Blücher Ltda, 2001. p. 247-275.

DOELLE, H. W. Biotechnology of solid substrate fermentation in the production of food. **ASEAN Food Journal**, v.1, n.1, p.10-14, mar.1985.

FERGUSON, L. R. Role of plant polyphenols in genomic stability. **Mutation research**, v. 475, p. 89-111, 2001.

FERNANDEZ-ESPINAR, M. T.; RAMON, D.; PINAGA, F.; VALLES, S. Xylanase production by *Aspergillus nidulans*. **FEMS Microbiology** v.6, p. 91-91, 1992.

FRESHNEY, I. R. **Culture of animal cells**.3 ed.New York: Wiley-Liss. 1994

GALANTE Y.M.; DE CONTI A .; MONTEVERDI R.. Application of *Trichoderma* enzymes in food and feed industries. In: Harman G.F; Kubicek C.P, editors. *Trichoderma & Gliocladium. Enzymes, biological control and commercial applications*. vol. 2. London: Taylor & Francis, 1998. p. 327-42.

GARCIA, B.L.; BALL, A. S., RODRIGUEZ, J.; PÉREZ-LEBLIC, ARIAS, M.E.; COPA-PATIÑO, J.L. Induction of ferulic acid esterase and xylanase activities in *Streptomyces avermitilis* UAH30. **FEMS Microbiology Letters**, v. 158, p. 95-99, 1997.

GEORIS, J.; GIANNOTTA, F.; DE BUYL, E.; GRANIER, B.; FRÈRE, J-M. Purification and properties of three endo- $\beta$ -1,4-xylanases produced by *Streptomyces* sp. Strain S38 which differ in their ability to enhance the bleaching of kraft pulps **Enzyme and Microbial. Technology**, v. 26, p.178-186, 2000.

GERMANO, S. **Desenvolvimento de bioprocesso para produção, caracterização e purificação de proteases de *Penicillium* sp, por fermentação no estado sólido**, Curitiba, 2000. 142 p. Tese (Doutorado- Processos Biotecnológicos) – Setor de Tecnologia- Universidade Federal do Paraná.

GERVAIS, P.; MOLIN, P.; GRAJEK, W.; BENSOUSSAN, M. Influence of the water activity of solide substrate on the growth rate and sporogenesis of filamentous fungi. **Biotechnol. Bioeng**,, v. 31, p.457-463, 1988.

GESSESSE, A.; MAMO, G. High-level xylanase production by an alkalophilic *Bacillus* sp. By using solid-state fermentation. **Enzyme Microbiology Technology**, v.72, p. 25-68, 1999.



GOMES, J.; GOMES, I.; TERLER, K.; GUBALA, N.; DITZELMULLER G.; STEINER, W. Optimisation of culture medium and conditions for  $\alpha$ -l-arabinofuranosidase production by the extreme thermophilic eubacterium *Rhodotermus marinus*. **Enzyme Microbiology Technology**, v.27, p. 414-422.

GRAHAM H.; LOWGREN W.; PETTERSSON D.; AMAN P. Effect of enzymes supplementation on digestion of a barley/pollard based pig feed. **Nutrition Report International**; p.38, 1073-1079, 1998.

GRABSKI, A. C.; JEFFRIES, T. W. Production, purification and characterization of  $\beta$ -(1,4)-endoxylanases of *Streptomyces roseiscleroticus*. **Applied Environment Microbiology**, v.57, p.987-992, 1991.

HESELTIME, C. W. Solid State Fermentation: an overview. **International Biodeterioration**, v. 23, p.78-79, 1987.

HESELTIME, C. W. Solid state fermentations. **Biotechnology and Bioengineering**, v.14, p. 517-532, 1972.

JARDIM, W. R. **Alimentos e alimentação do gado bovino**. São Paulo: Editora Agronômica Ceres. 1976.

JARONI, D. SCHEIDELER, E.; BECK, M.; WYATT, C. Late egg production efficiency, egg yields, and egg composition in two strains of leghorn hens. **Poultry science**, v.78, p. 841-847, 1999b.

JARONI, D. SCHEIDELER, E.; BECK, M.; WYATT, C. The effect of dietary wheat middlings and enzyme supplementation II: apparent nutrient digestibility, digestive tract size, gut viscosity, and gut morphology in two strains of leghorn hens. **Poultry Science**, v.78, p.1664-1674. 1999a.

JUNG, H.G.; VOGEL, K.P. Influence of lignin in digestibility of forage cell wall material. **J. Animal Science**, v.62, n.6, p.1703-12, jun./1986.

KANG, S. W.; KIM, S.W.; LEE, J. S. Production of cellulase an xylanase in a bubble column using immobilized *Aspergillus niger* KKS. **Applied Biochemical Biotechnology**, v.53, p. 101-106, 1995.

KASTNER-SHIMIDT, G. ; GÖLKER, C. F. Processamento em biotecnologia In: BU'LOCK, J. ; KRISTIANSEN, B. **Biotecnologia básica**. Zaragoza: Acribia. 1991. p. 175-197.

KLUEFEL, D. VATS-MEHTA, S.; AUMONT, F.; SHARECK, F.; MOROSOLI, R. Purification and characterization of a new xylanase (xylanase b) produced by *Streptomyces lividans* 66. **J. Biochem**, v. 267, p. 45-50.

KULKARNI, N.; SHENDYE, A.; RAO, M. Molecular and biotechnology aspects of xylanases. **FEMS Microbiology. Reviews**, v.23, 411-456, 1999.

LEEK, B.F. Digestão no estômago dos ruminantes. In: SWENSON, M.J.; RECCE, O.W. **Fisiologia dos animais domésticos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan,1996. p 353-389.

LEWIS, G.E.; SANCHEZ, W.K.; TREACHER, R.; HUNT, C.W.; PRITCHARD, G.T. Effect of direct-fed fibrolytic enzymes on lactational performance of midlactation Holstein cows. In: Proceedings of Western Section American Society Animal Science. 46:310, 1995.

LONSANE, B. K.; GHIDYAL, N.P.; BUDIATMAN, S.; RAMAKRISHNA, S. V. Engineering aspects of solid state fermentation. **Enzyme Microbiology and Technology**. v.7, p. 258-265, 1985.

LOPEZ-FERNANDEZ, C. L.; RODRIGUEZ, J.; BALL, <sup>a</sup> S.; COPA-PATINO, J. L.; PEREZ-LEBLIC, M. I.; ARIAS, M.E. Application of the affinity binding of xylanases to oat-spelt xylan in the purification of endoxylanase CM-2 from *Streptomyces chatanoogensis* CECT3336. **Applied Microbiology Biotechnology**. V. 50 (2), p. 284-287, 1998.

MACHADO, C. M. **Produção de Ácido Giberélico por Fermentação no Estado Sólido em Bio-Resíduos da Agroindústria do Café**. Curitiba, 2000. 73 f. Dissertação (Mestrado). Setor de Tecnologia Química, Universidade Federal do Paraná. 2000 p24.

MAESAWARI, M. U.; CHANDRA, T. S. Production and potential applications of xylanase from a new strain of *Streptomyces viridosporus*. **World J. Microbiology Biotechnology**, v.16, p. 257-263.

MAGNUSON, T.S. & CRAWFORD, D.L. Purification and characterization of an alkaline xylanase from *Streptomyces viridosporus* T7A. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 21, p 160 –164, 1997.

MAHEVA, E. *et al.* Sporulation of *Penicillium roqueforti* in Solid Substrate Fermentation. **Biotechnology Letters**, v.6, p. 97-102, 1984.

MILLER, L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Anal. Chem.** v. 31, p. 426-428, 1959.

MISHRA, C., KESKAR, S.; RAO, M. Production and properties of extracellular endoxylanases from *Neurospora crassa*. **Applied Environmental Microbiology**, v. 48, p.224-228, 1984.

MOO-YOUNG, M.; MOREIRA, A. R.; TENGEDY, R. P. Principales of solid-substrate fermentation. In: **The Filamentous Fungi**. London, v.4, p.177-144, 1983.

MORGAN, S. J.; DARLING, D. C. **Cultivo de células animales**. Zaragoza: Acribia. 1993.

MOROSOLI, R. M.; BERTRAND, J.; MONDOU, F.; SHARECK, F.; KLUPPEL, D. Purification and properties of a xylanase from *Streptomyces lividans*. **J. Biochem**, v.239, p.587-592, 1986.

MUTH, G.; BROLLE, D. F.; WOHLLEBEN, W. Genetics of Streptomyces In: DEMAIN, A. L.; DAVIES, J. **Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology**. Washington: ASM Press, 2 ed., 1999. p. 353.

NASCIMENTO, R.P.; COELHO, R.R.R; MARQUES, S.; ALVES, L.; GÍRIO, F.M.; BOM, E.P.S.; AMARAL-COLAÇO, M.T. Production and partial characterization of xylanase from *Streptomyces* sp. Strain AMT-3 isolated from Brazilian cerrado soil. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, p. 549-555, 2002.

NEWBOLD, C.J.; MARTIN, S.A. Mode of action of the yeast *Sacharomyces cerevisiae* as a feed additive for ruminants. **Journal Nutr.**, v.76, p. 249, 1996.

NISHIO, N.; TAI, K.; NAGAL, S. Hydrolase production by *Aspergillus niger* in solid state cultivation. **Europ. J. Appl. Microbial Biotechnology**, v. 8, p.263-270, 1979.

PANDEY, A. Aspects of fermenter design for solid-state fermentations. **Process Biochemistry**, v.26, p.355-361, 1991.

PANDEY, A. Aspects of fermenter design for solid-state fermentations. **Process Biochemistry**, v.27, p. 109-117,1992.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; RODRIGUÉZ-LEON, J. A.; NIGAM, P. **Solid-state fermentation in biotechnology**. New Delhi: Asiatech Publishers, 2001.

PASTI, M. B.; POMETO, A. L.; NUTI, M.P.; CROWFORD, D.L. Lignin-solubilizing ability of actinomycetes isolated from termites (Termitidae) gut. **Applied Environmental Microbiology**, v.56, n.7, p. 2213-8, jul.1990.

PENAZOLA, W.; MOLINA, M.R.; BRENES, R. G.; BRESSANI, R. Solid-state fermentation: an alternative to improve the nutritive value of coffee pulp. **Applied Environmental. Microbiology**, v. 49, p. 338-393, 1985.

POMETTO III, A. L. & CRAWFORD, D.L. Effects of pH on lignin and cellulose degradation by *Streptomyces viridosporus*. **Applied and Environmental Microbiology**, p. 246-250, aug. 1986.

PUPO, N. I. H. **Manual de Pastagens Forrageiras**. Campinas: Instituto Campineiro de Ensino Agrícola, 1995.

QUINN, P.J.; CARTER, M.E.; MARKEY, B.; CARTER, G.R. **Clinical Veterinary Microbiology**. London: Mowsby-Year Book Europe Limited, 1994.

RAIMBAULT, M. **Fermentation em Millieux Solide. Crioissance de Champignons fillamenteux Sur substract Amylacé**.Toulouse, 1980. 291 f. Thése (Doctoract, es Sci).- Université Paul Sabatier.

RAIMBAULT, M. General and microbiological aspects of solid substratate fermentation. In: INTERNATIONAL TRAINING COURSE IN SOLID STATE FERMENTATION. Curitiba, 1997

RAIMBAULT, M.; ALAZARD, D. Culture method to study fungal growth in solid fermentation. **European J. Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 9, p.199-209,1980.

RAMACHANDRA, M.; CRAWFORD, D.L.; HERTEL, G. Characterization of an extracellular lignin peroxidase of the lignocellulytic Actinomycete *Streptomyces viridosporus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.54, n. 12, p. 3057-63, 1988.

RAMACHANDRA, M.; CRAWFORD, D.L.; POMETTO III, A. L. Extracellular enzyme activities during lignocellulose degradation by *Streptomyces* spp.: A comparative study of wild type and genetically manipulated strains. **Applied and Environmental Microbiology**, p. 2754-2760, dec. 1987.

RAMOS, L.P.; BRUIL, C. & SADDLER, L.N. The use of enzyme recycling and the influence of sugar accumulation on cellulose hydrolysis by *Trichoderma* cellulases. **Enzyme Microbiology. Technology**, v. 15, p. 19-25, 1993.

RODRÍGUEZ-LEÓN, J. A.; SASTRE, L.; ECHEVARRIA, J.; DELGADO, G.; BECHSTEDT, W. A Mathematical approach for the estimation of biomass production rate in solid-state fermentation. **Acta Biotechnologica**, v. 8, p. 307-310, 1988.

RODRIGUÉZ LEÓN, J.A. A., STERTZ, S. C., SOCCOL, C.R. and RAIMBAULT, M. Kinetics of the solid state fermentation of raw Cassava flour by *Rhizopus Formosa* 28422. In: INTERNATIONAL TRAINING COURSE ON SOLID STATE FERMENTATION. Curitiba, 1997.

ROSENBERGER, G. **Exame clínico dos bovinos**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1983.

ROUSSOS, S.; AQUIHUALT, M. A.; BRIZUELA, M. A. OLMOS, A.; RODRIGUEZ, W.; VINIEGRA, G. Production, conservation and viability of filamentous fungi inoculum fo solid substrate fermentation. **Micol Neotro. Apl.** , v.2, p.3-17, 1989.

SALVO, L.M.; RICHARTZ, R. R. T. B.; JOINEAU, M. E. G.; MALUCELLI, M. I. C.; BACILA, M. Citotoxicidade *in vitro* de clorofenoxiacetato com células hepáticas de *Metynnis roosevelti* (PISCES, CHARACIDAE) em cultivo. **Archives of Veterinary Science**, v. 4, n.1, p.45-49, 1999.

SANT'ANNA JR, G. L. Produção de Enzimas Microbianas. In: LIMA, U.; AQUARONE, E. BORZANI, W.; SHIMIDELL, W. **Biotecnologia Industrial**. vol 3. São Paulo: Edgard Blücher, 2001.p. 351-362.

SANTOS, E. S. D.; GUIRARDELLO, R.; FRANCO, T. T. Preparative chromatography of xylanase using expanded bed adsorption. **Journal of Chromatography**.p.217-224, 2002.

SAXENA, S.; BAHADUR, J.; VARNA, A. Production and localisation of carboxymethylcellulase xylanase and  $\beta$ -glucosidase from *Cellulomonas* and *Micrococcus* spp. **Applied Microbiology Biotechnology**, v.34, 668-670, 1991.

SCHREMPF, H. Investigations of Streptomycetes using tools of recombinant DNA technology In:DEMAIN, A. L.; DAVIES, J. E. **Manual of industrial microbiology and biotechnology** 2 d. Washington: ASM Press. 1999. p.501-510.

SICHAK, P. S.; DOUNCE, A. L. Analysis of peroxidatic mode of action of catalase. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 219, p. 286-295, 1986.

SILVA, D. J.; QUEIROZ, A. C. **Análise de alimentos**. 3 ed.Viçosa: UFV, 2002.

SOCCOL, C.R. Contribuição ao estudo de fermentação no estado sólido em relação à produção do ácido fumárico, biotransformação de resíduo sólido de mandioca por *Rhizopus* e basidiomicetos do gênero *Pleurotus*. Curitiba, 1994. Tese (Professor titular em biotecnologia e Tecnologia de Alimentos) – Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná.

SOCCOL, C. R. & VANDENBERGHE, L. P. S. Overview of applied solid-state fermentation in Brazil. **Biochemical Engineering Journal**, v.13, p. 205-218 2003.

TECHAPUN, C. SINSUWONGWAT, S. POOSARAN, N. WATANABE, M.; SASAKI, K. Production of a cellulase-free xylanase from agricultural waste materials by a thermotolerant *Streptomyces* sp. **Biotechnology Letters**, v. 23 , p. 1685-1689, 2001.

TECHAPUN, C.; POOSARAN, N.; MASANORI, W.; SASAKI, K. Thermostable and alkaline-tolerant microbial cellulase-free xylanases produced from agricultural wastes and the properties required for use in pulp bleaching bioprocesses: a review. **Process Biochemistry**, v.38, p. 1327-1340, 2003.

THEODOROU, M.K & FRANCE, J. Rumen microorganisms and their interactions. In: FORBES, J.M.; FRANCE, J. **Quantitative aspects of ruminant digestion and metabolism**. New York, USA. Cab. International, 1993. p. 146-193.

THEILLEUX, J. Los actinomicetos In: J. Y. LEVEAU; BOUIX, M. **Microbiología industrial**. Zaragoza: Acribia. 2000. p. 418-471.

TROMKE S.; RUNDGREEN M, HESSELMAN K. The effects of feeding high-viscosity barley to pigs. In: PROCEEDINGS OF THE 3 ST MEETING OF THE EUROPEAN ASSOCIATION OF ANIMAL PRODUCTION, COMMISSION ON ANIMAL PRODUCTION. Munich, 1980. p 5.



UNICA, União da agroindústria canaveira de São Paulo. Disponível em: <<http://www.unica.com.br>> Acesso em: 08 dez. 2004.

VAREL, V., JUNG H-J. G. Influence of forage phenolics on ruminal fibrolitic bacteria and in vitro degradation. **Applied and Environmental Microbiology**, p 275-280, aug. 1986.

ZHANG, Z.; MARQUARDT, R.; WANG, G.; GUENTER, W.; CROW, G. H.; HAN, Z.; BEDFORD, M. R. A simple model for predicting the response of chicks to dietary enzyme supplementation. **Journal Animal Science**, v. 74, p. 394-402, 1996.

WARD, O. P. **Biotecnologia de la fermentacion**. Zaragoza: Acribia.1989.

WONG, K. K.Y. & SADDLER, J. N. In: J. Visser, **Xylans and xylanases**, Amsterdam: Elsevier, 1992. p.171.

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

## ANEXOS

## Tabela ANOVA

Planejamentos para estudo do efeito da temperatura, concentração de substrato e pH:

## Planejamento 1

Fator	SS	Df	MS	F	p
T L+Q	1,1932	2	0,5966	12,428	0,0015
(S) L+Q	1,1977	2	0,5988	12,475	0,0014
pH	1,167	2	0,8371	17,438	0,0003
Erro	0,5280	11	0,4800		
Total SS	4,5982	17			

$R^2=0,88$

## Planejamento 2

Fator	SS	Df	MS	F	p
T L+Q	4,1728	2	2,086	15,226	0,00067
C B L+Q	6,5092	2	3,254	23,752	0,00010
pH	6,5092	2	0,231	1,6892	0,22920
Erro	1,5072	11	0,1370		
Total SS	12,652	17			

$R^2=0,88087$  Adj= 0,81589

Efeito da suplementação com sais sobre a produção de xilanase em fermentação submersa

Fator	SS	Df	MS	F	p
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	123,21	1	123,21	43,71	0,0011
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,16	1	0,16	0,056	0,8211
MgSO <sub>4</sub>	0,25	1	0,25	0,0887	0,7778
NaCl	3,24	1	3,24	1,149	0,3326
CaCl <sub>2</sub>	0,81	1	0,81	0,2873	0,6148
ZnSO <sub>4</sub>	0,49	1	0,49	0,1738	0,6940
FeSO <sub>4</sub>	1,69	1	1,69	0,5996	0,4737
CuSO <sub>4</sub>	0,81	1	0,81	0,2873	0,6148
MoSO <sub>4</sub>	2,40	1	2,40	0,8524	3,982
MnSO <sub>4</sub>	3,06	1	3,06	1,086	0,3449
Total	150,21	15	150,21		

$R^2=0,90619$

## Influência da suplementação com HEC, vitaminas do complexo B e Farelo de Soja

Fator	SS	Df	MS	F	P
F. soja L+Q	3,344	2	1,672	1,115	0,4650
Vit. B	6,211	2	3,105	2,136	0,3188
HEC L+Q	4,919	2	2,4598	1,691	0,3714
TOTAL SS	17,384				

$R^2=0,83273$  Adj= 0,3309

## Estudo do efeito da umidade e taxa de inoculação sobre a produção de xilanase no estado sólido

Fator	SS	Df	MS	F	P
Umid L+Q	49873,78	2	24936,89	6,3499	0,573
Tx. Inoc. L+Q	20969,75	2	10484,88	2,6698	0,1834
Total	86551,91	8			
T					

$R^2=0,8185$  Adj= 0,6370

## Estudo do efeito da umidade e taxa de aeração em reator tipo coluna de Raimbault sobre a produção de xilanase em meio sólido

Fator	SS	Df	MS	F	P
Umidade	103649,0	1	103649,0	88,6156	0,000082
Aeração	392,6	1	392,6	0,33566	0,583425
1 by 2	25,4	1	25,4	0,02173	0,8876
Erro	7017,9	6	1169,6		
Total SS	111085,0	9			

$R^2=0,93682$  Adj 0,9052