

## **EFEITO DO EXTRATO BRUTO ENZIMÁTICO DE *Streptomyces viridosporus* T7A SOBRE A DIGESTIBILIDADE DE MATÉRIA SECA *in vitro* PARA RUMINANTES**

Luiz Rômulo Alberton  
Luciana Porto Souza Vandenberghe  
Ricardo Assman  
Leandro München  
Elza Maria Galvão Ciffoni  
José Ricardo Pachaly  
Carlos Ricardo Soccol

ALBERTON<sup>1</sup>, L.R.; VANDENBERGHE<sup>2</sup>, L. P. S.; ASSMAN<sup>2</sup>, R.; MÜNCHEN<sup>3</sup>, L.; CIFFONI<sup>2,3</sup>, E.M.G.; PACHALY<sup>3</sup>, J. R.; SOCCOL<sup>2</sup>, C. R. Efeito do extrato bruto enzimático de *Streptomyces viridosporus* T7A sobre a digestibilidade de matéria seca *in vitro* para ruminantes. *Arq. ciên. vet. zool. UNIPAR, Umuarama*, v. 9, n. 1, p.29-36, 2006

**RESUMO:** As forragens de um modo geral possuem boa digestibilidade para os animais ruminantes, mas os resíduos das agroindústrias, tais como palhas e bagaços, têm aproveitamento limitado, devido ao alto teor em lignina. A cepa *Streptomyces viridosporus* T7A é capaz de produzir, em substrato lignocelulósico enzimas de interesse agroindustrial como a lignina peroxidase, xilanase, esterase e celulase. Neste trabalho, estudou-se o efeito da adição do extrato bruto enzimático de *Streptomyces viridosporus* T7A sobre a digestibilidade da fibra em ruminantes, pelo método de digestibilidade *in vitro*. O extrato foi adicionado na proporção de 0,2; 0,5; 2,0 e 5,0%, durante 48 horas, em conteúdo ruminal colhido de um búfalo cirurgicamente fistulado. Não houve diferença estatística com o controle na digestibilidade *in vitro* da matéria seca, quando o extrato bruto foi adicionado nos níveis de 0,2; 0,5; 2,0 e 5,0%. No entanto, observou-se maior digestibilidade no nível de 0,2%.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Streptomyces*. Ruminantes. Digestibilidade. Lignina. Enzimas. Xilanase.

### **EFFECT OF THE *Streptomyces viridosporus* T7A CRUDE FERMENTATION EXTRACT ON THE *in vitro* DIGESTIBILITY OF DRY MATTER FOR RUMINANTS**

ALBERTON, L.R.; VANDENBERGHE, L.P.S.; ASSMAN, R.; MÜNCHEN, L.; CIFFONI, E.M.G.; PACHALY, J.R.; SOCCOL, C.R. Effect of the *Streptomyces viridosporus* T7A crude fermentation extract on the *in vitro* digestibility of dry matter for ruminants. *Arq. ciên. vet. zool. UNIPAR, Umuarama*, v. 9, n. 1, p.29-36, 2006

**ABSTRACT:** Forages generally have good digestibility in ruminant animals, but the use of agro-industrial wastes such as straws and bagasses is limited by their high proportion of lignin. In lignocellulosic substrate, the *Streptomyces viridosporus* T7A strain is capable to produce interesting enzymes as lignin peroxydase, xylanase, esterase, and cellulase. We studied the *in vitro* effect of the addition of the *Streptomyces viridosporus* T7A crude fermentation enzymatic extract on digestibility of fibers in ruminants. The extract was added to filtered ruminal fluid obtained from a surgically fistulated Asian buffalo, 0.2%, 0.5%, 2.0%, and 5.0% proportions. After 48 hours there was found no statistic difference in dry matter digestibility *in vitro* among control and the crude extract levels of 0.2, 0.5, 2.0, and 5.0% levels. Higher digestibility, however, was observed when it was added at 0.2% level.

**KEY WORDS:** *Streptomyces*. Ruminants. Digestibility. Lignin. Enzymes. Xylanase.

### **EFFECTO DEL EXTRACTO ENZIMÁTICO BRUTO DE *Streptomyces viridosporus* T7A SOBRE LA DIGESTIBILIDAD DE MATERIA SECA *in vitro* PARA RUMIANTES**

ALBERTON, L.R.; VANDENBERGHE, L.P.S.; ASSMAN, R.; MÜNCHEN, L.; CIFFONI, E.M.G.; PACHALY, J.R.; SOCCOL, C.R. Efecto del extracto enzimático bruto de *Streptomyces viridosporus* T7A sobre la digestibilidad de materia seca *in vitro* para rumiantes. *Arq. ciên. vet. zool. UNIPAR, Umuarama*, v. 9, n. 1, p.29-36, 2006

**RESUMEN:** Las forrajes generalmente tienen buena digestibilidad para los animales rumiantes, pero el uso de residuos agro-industriales como pajas y bagazos es limitado por su alta proporción de lignina. En substrato lignocelulósico, el *Streptomyces viridosporus* T7A es capaz de producir enzimas de interés industrial, como lignina peroxidase, xilanase, esterase y celulase.

<sup>1</sup>Médico Veterinário, Mestre, Doutor. Coordenador do Hospital Veterinário e Professor do Curso de Medicina Veterinária da Universidade Paranaense - UNIPAR. Umuarama, PR, Brasil. Email: [romulo@unipar.br](mailto:romulo@unipar.br)

<sup>2</sup>Laboratório de Biotecnologia do Curso de Pós Graduação em Processos Biotecnológicos da Universidade Federal do Paraná - UFPR. Curitiba, PR, Brasil.

<sup>3</sup>Curso de Medicina Veterinária da Universidade Paranaense - UNIPAR. Umuarama, PR, Brasil.

En este trabajo se estudió el efecto *in vitro* de la adición del extracto enzimático bruto de *Streptomyces viridosporus* T7A sobre la digestibilidad de fibras en rumiantes. El extracto se agregó a fluido rumial filtrado, obtenido de un búfalo quirúrgicamente fistulado, en proporciones de 0,2%, 0,5%, 2,0% y 5,0%. Después de 48 horas, no se encontró ninguna diferencia estadística en la digestibilidad de la materia seca *in vitro* entre el control y los niveles de 0,2%, 0,5%, 2,0% y 5,0% del extracto bruto. Sin embargo, se observó digestibilidad más grande con el nivel fue de 0,2%.

**PALABRAS-CLAVE:** *Streptomyces*. Rumiantes. Digestibilidad. Lignina. Enzimas. Xilanase.

## Introdução

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

Os *Streptomyces* se tornaram microrganismos de grande interesse industrial, uma vez que a maioria das cepas sintetiza substâncias antibacterianas, antifúngicas, antitumorais, antiparasitárias, herbicidas e enzimas, usadas na medicina, agricultura e vários outros processos biotecnológicos (MUTH *et al.*, 1999).

Crawford (1978) provou a atividade lignolítica de cepas de *Streptomyces*, e mais tarde Pasti *et al.* (1990) compararam a atividade lignolítica de várias das suas cepas, verificando que *S. chromofuscus* A2 e *S. viridosporus* T7A possuem atividade lignolítica alta e média, respectivamente (49,64% e 36,04% de degradação da lignina total). A cepa *Streptomyces viridosporus* T7A, portanto, 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 ácido ferúlico (RAMACHANDRA *et al.*, 1987). Estes compostos fenólicos têm grande importância biotecnológica, para produção de antioxidantes industriais (CRAWFORD *et al.*, 1984), e também usos médicos, combatendo radicais livres, e protegendo assim as células contra lipoperoxidação, envelhecimento e doenças degenerativas (FERGUSON, 2001).

Dos materiais existentes na natureza, as substâncias lignocelulósicas são as mais abundantes. São ricas em carbono, e importante fonte de energia para animais herbívoros. A lignina, juntamente com a celulose, é responsável pela estrutura e rigidez das plantas, e possui grande resistência ao ataque de microrganismos comuns (CRAMPTON & HARRIS, 1974). Embora os herbívoros 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.

A pecuária é um setor que cresce a cada ano, e grandes áreas de florestas são desmatadas para o plantio de pastagens, pela necessidade de atender o consumo interno e de exportação da carne bovina. O setor agroindustrial brasileiro é um dos mais importantes do mundo, produzindo anualmente enorme volume de materiais lignocelulósicos, do qual somente pequena parcela tem aproveitamento animal, sendo a maior parte incorporada ao solo ou se tornando elemento poluente.

As forragens de um modo geral possuem boa digestibilidade para os animais ruminantes, mas os resíduos

das agroindústrias, tais como palhas e bagaços, têm aproveitamento limitado devido ao alto teor em lignina, uma vez que os herbívoros e sua microbiota simbiote são incapazes de digerir tais materiais, bem como de solubilizar o complexo formado entre a lignina e a celulose.

A indústria de rações para animais é um importante setor do agronegócio, com produção anual de 600 milhões de toneladas, e valores de cerca de 50 bilhões de dólares. Do total produzido, a maior parte (90%) se destina a aves, suínos e ruminantes, sendo o restante destinado a animais de companhia e peixes (BHAT, 2000).

A adição de enzimas em dietas de animais herbívoros ruminantes vem sendo estudada, com a finalidade de melhorar a eficiência produtiva, e celulases e hemicelulases apresentam grande potencial de aplicação na composição da dieta animal (GALANTE *et al.*, 1998; BHAT, 2000).

As enzimas de maior interesse na atualidade são celulases, hemicelulases,  $\beta$ -glucanase, xilanase e pectinase, que degradam alguns componentes dos cereais e fibras, melhorando assim o valor nutricional dos alimentos (GALANTE *et al.*, 1998).

Apesar de existir 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 em animais, principalmente aqueles de interesse econômico.

O estudo desses microrganismos na produção de enzimas destinadas ao emprego na alimentação animal pode contribuir para melhorar a eficiência da produção de carne e leite, bem como diminuir o impacto ambiental das explorações pecuária e agroindustrial. As enzimas podem melhorar a digestibilidade dos alimentos, substituindo o efeito dos aditivos nas rações para animais, e tornando possível aproveitar resíduos agroindustriais de baixo custo para produção de proteína animal.

## Revisão de Literatura

Em sua maioria, as enzimas utilizadas na indústria são extracelulares e têm origem microbiana, sendo que 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 de *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*, têm potencial na conversão de materiais lignocelulósicos em glicose (WARD, 1989). Alguns estudos demonstraram a produção de xilanases em fermentação no

estado sólido, com cepas de *Trichoderma* sp., *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp., usando bagaço de cana como substrato-suporte (PANDEY *et al.*, 2001).

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. O *Streptomyces viridosporus* T7A despolimeriza a lignina enquanto degrada a celulose, e produz lignina polimérica ácido-precipitável (*acid-precipitable polymeric lignin* – APPL), solúvel em água, como principal produto da degradação da lignina (RAMACHANDRA *et al.*, 1987). APPLs são polifenólicos que podem ser obtidos em alta concentração a partir de resíduos lignocelulósicos, e têm considerável potencial para grande número de aplicações industriais.

Antai & Crawford (1981), estudando os efeitos da fermentação pelo *S. viridosporus* T7A em substrato lignocelulósico de gramíneas, observaram que após três meses de fermentação, houve degradação de 68,0% e 44,0% de carboidrato e lignina, respectivamente. Resultados semelhantes foram obtidos por Crawford *et al.* (1983), que estudaram o *S. viridosporus* T7A em fermentação no estado sólido, usando material lignocelulósico de milho, sendo que após oito semanas de incubação, houve degradação de 36,2% do material, com redução do conteúdo de carboidrato e lignina em 44,4 e 19,7%, respectivamente. Já Pometo III & Crawford (1986) verificaram que *S. viridosporus* T7A decompõe melhor o material em meio alcalino, atingindo a máxima degradação da lignina na faixa de pH localizada entre 8,4 a 8,8.

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

## Enzimas

### Xilanase

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

As xilanases microbianas são proteínas com massa molecular na faixa de 8 a 145 kDa, e D-xilanases são usualmente estáveis numa faixa de pH entre 3,0 e 10,0, sendo considerado ótimo o pH de 4,0 a 7,0 (KULKARNI, 1999). Xilanases têm potencial de utilização no branqueamento da polpa de papel e no aumento da digestibilidade do material lignocelulósico para alimentação animal (GEORIS *et al.*, 2000), e celulasas e hemicelulasas têm grande aplicabilidade na indústria de rações e suplementos alimentares para animais (BHAT, 2000).  $\beta$ -Glucanases e xilanases têm sido usadas

com sucesso em dietas de monogástricos, para hidrólise de polissacarídeos não-amiláceos (PNA) tais como  $\beta$ -glucanos e arabinoxilanos. A presença de altos níveis de PNA em dietas baseadas em cereais resulta em baixa conversão alimentar e lento ganho de peso, e atualmente há grande interesse em usar preparações enzimáticas contendo altos níveis de celulasas e hemicelulasas em dietas de ruminantes, com a finalidade de melhorar conversão alimentar, produção de leite e ganho de peso (BHAT, 2000).

Segundo Nascimento *et al.* (2002), que estudaram a produção de xilanase pela cepa de *Streptomyces* sp. AMT-3, após análise de zimograma observou-se que a família da isoenzima apresentava peso molecular entre 170 a 700 kDa, e que o pH e a temperatura para a atividade enzimática máxima eram de 6,0 e 65°C, respectivamente. Além disso, a enzima mantinha 50% da atividade durante 20 horas, a 55°C. Magnuson & Crawford (1997) purificaram uma xilanase alcalina de *S. viridosporus* T7A com peso molecular de 59 kDa.

O gênero *Streptomyces* é conhecido por produzir duas xilanases de alto peso molecular, cuja composição em aminoácidos indica predominantemente ácido aspártico, ácido glutâmico, glicina, serina e treonina. As xilanases são enzimas aptas a reter estrutura secundária e terciária similar e o mesmo resíduo de aminoácidos de 20 a 50% da posição correspondente de 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 dessas proteínas pode ser explicado pela duplicação do gene ancestral original, uma ocorrência comum no gênero *Streptomyces* (KULKARNI *et al.*, 1999).

### Esterase

Ramachandra *et al.* (1987) estudaram a produção de enzimas extracelulares pelo *S. viridosporus* T7A, em substrato lignocelulósico. Dentre as enzimas estudadas, comprovou-se a produção de uma cumarato éster esterase, enzima potencialmente importante, uma vez que, em gramíneas, há grande quantidade de ligações éster entre o ácido cumárico e a lignina.

### 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).

Peroxidasas são hemoproteínas que utilizam peróxido de hidrogênio para catalisar a oxidação de grande variedade de substratos orgânicos e inorgânicos. Segundo Banci (1997), têm peso molecular de 35.000 a 100.000 Daltons (Da), sendo que o peso da peroxidase extracelular produzida pelo *S. viridosporus* T7A foi estimado em 17.000 Da por Ramachandra *et al.* (1988).

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

Ramachandra *et al.* (1987) em estudo comparativo

envolvendo a produção de peroxidase por *Streptomyces* sp., verificaram que o tempo de produção de todas as cepas, seguido da produção de APPL, indica que a produção de peroxidase está correlacionada à produção de APPL, mas não há correlação com o aumento na taxa de crescimento microbiano.

De acordo com Adhi *et al.* (1989), a atividade de peroxidase detectada após quatro dias de fermentação submersa com 0,05% de lignocelulose, foi de 0,11 U/mL. Entretanto 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, e possuem quatro isoformas, divididas em dois grupos. As enzimas P1 e P2, do primeiro grupo, aparecem no início da fase logarítmica de crescimento, ocorrendo pico de atividade na fase estacionária e diminuição da atividade no final da fase estacionária de crescimento. Já as enzimas do segundo grupo, P3 e P4, também aparecem na fase logarítmica inicial, mas permanecem ativas até o final da fase estacionária (RAMACHANDRA *et al.*, 1987).

#### Endoglucanase

Segundo Ramos (1993), a celulose é degradada por um complexo multienzimático que envolve pelo menos três enzimas, a exoglucanase – 1,2- $\beta$ -glucan celobiohidrolase, a endoglucanase – endo-1,4- $\beta$ -D-glucan 4-glucanohidrolase e a  $\beta$ -glucosidase.

No processo fermentativo envolvendo cepas de *Streptomyces*, de acordo com Adhi *et al.* (1989), há interação entre as enzimas chave, que atuam sinergicamente na degradação do substrato lignocelulósico, sendo de 0,1 U/mL a atividade de endoglucanase. Já Nascimento *et al.* (2002), trabalhando em cultivo submerso com a cepa de *Streptomyces* sp. AMT-3 e empregando celulose cristalina como substrato, detectaram atividade de 0,45 U/mL.

#### Uso de enzimas em dietas para animais

Altos níveis de produção, eficiência e melhor conversão alimentar são características da indústria avícola, e a maior eficiência produtiva está relacionada à utilização máxima dos nutrientes da dieta. Devido a seu alto valor energético, o milho é o principal ingrediente para dietas de frangos (JARONI *et al.*, 1999).

Os ruminantes apresentam várias particularidades em seu processo digestivo, em comparação a outras espécies animais. O estômago de tais animais 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 microbiota composta por bactérias e protozoários, que vivem em temperatura de 40°C, pH de 6,0 e nas seguintes proporções de gases: CO<sub>2</sub> – 66,0%, CH<sub>4</sub> – 26,0%, N<sub>2</sub> – 6,0%, O<sub>2</sub> – 1,0% e N<sub>2</sub> – 0,1% (ROSENBERGER, 1983). Esta microbiota vive em anaerobiose, e participa do processo de fermentação do alimento ingerido, produzindo os 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 microbiota ruminal (ANDRIGUETTO, 1983). Em contrapartida a lignina, que também compõe as fibras, é resistente à ação da microbiota e, além disso, diminui a digestibilidade da hemicelulose e da celulose (BEEVER, 1993). Segundo Jung & Vogel (1986), o mecanismo de inibição da digestibilidade, exercido pela lignina, é bastante complexo.

Diversos esforços vêm sendo feitos no sentido de melhorar a digestibilidade dos alimentos volumosos fornecidos aos bovinos. Lewis *et al.* (1995) demonstraram efeitos de enzimas fibrolíticas na dieta de vacas, verificando aumento de 1,3 Kg/dia na produção de leite. Da mesma forma, Beauchemin & Rode (1996) aplicaram sobre a forragem uma solução contendo xilanase, observando aumento na produção leiteira, e Annison (1997) cita a importância da ligninase produzida pelo fungo *Phanerochaete chrysosporium*, no sentido de aumentar a digestibilidade de alimentos fornecidos aos ruminantes.

Alguns microrganismos, mesmo sendo aeróbicos, e não componentes da microbiota normal dos ruminantes, como o *Sacharomyces cerevisiae*, também têm sido empregados. Newbold *et al.* (1996) afirmam que esta levedura e outras bactérias aeróbicas são capazes de remover traços de oxigênio existente no interior do rúmen, o que parece favorecer a microbiota celulolítica do rúmen, altamente sensível ao oxigênio.

Na atualidade, as principais enzimas estudadas em termos de adição a dietas de animais ruminantes e monogástricos, com objetivo de melhorar sua eficiência produtiva, são celulasas, hemicelulasas,  $\beta$ -glucanase, xilanase e pectinase. Tais enzimas degradam alguns componentes dos cereais e fibras, melhorando assim o valor nutricional dos alimentos (GALANTE *et al.*, 1998).

A hemicelulose da dieta tem pequeno significado nutricional para animais monogástricos. Essas fibras indigeríveis aumentam a viscosidade do alimento no intestino, o que interfere na penetração das enzimas digestivas no bolo alimentar e na absorção do alimento, podendo facilitar condições patogênicas, especialmente em frangos de corte. O uso de xilanase e outras hemicelulasas corrige tal problema, e também aumenta o valor nutritivo do alimento (KULKARNI *et al.*, 1999). Assim,  $\beta$ -glucanases e xilanases têm sido usadas com sucesso em dietas de monogástricos, para hidrólise de polissacarídeos não-amiláceos tais como  $\beta$ -glucanos e arabinoxilanos (COWAN, 1996). A adição de  $\beta$ -glucanase e xilanase, durante a produção da ração avícola, aumenta a degradação, levando a incremento na digestão e absorção dos componentes da mesma, bem como no ganho de peso de frangos de corte e na produção de ovos (COWAN, 1996).

Jaroni *et al.* (1999) compararam os efeitos da suplementação de xilanase e protease em dieta composta por milho e soja, observando ovos mais pesados e melhoria na eficiência alimentar nos lotes que receberam a suplementação com enzimas. 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. No mesmo estudo, foi proposta uma equação capaz de prever o ganho de peso em função da concentração enzimática da dieta.

Os benefícios da adição de enzimas na dieta de

frangos incentivam também o mesmo tipo de suplementação em rações para suínos, e estudos iniciais mostraram que o uso de  $\beta$ -glucanases aumenta o desempenho produtivo de suínos alimentados com rações à base de cevada (TROMKE *et al.*, 1980). No entanto, trabalhando com suínos submetidos a canulação do trato digestório, Graham *et al.* (1998) demonstraram 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 de fibras. Tais resultados sugerem que suínos não respondem à  $\beta$ -glucanase da mesma maneira que os frangos, provavelmente em função da viscosidade da digesta no intestino dos suínos não ser relativamente afetada pelas fibras dietéticas. Ainda assim, preparações multi-enzimáticas contendo xilanase e  $\beta$ -glucanase mostraram-se benéficas na produção de suínos (BOHME, 1990), e a utilização de xilanase em tais preparações reduziu o custo da alimentação em suínos, por viabilizar o uso de alimentos de custo mais baixo (BHAT, 2000).

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

A hidrólise da hemicelulose das plantas é limitada por sua esterificação para compostos fenólicos, tais como ácido ferúlico. Os ácidos diferúlicos são potentes antioxidantes, e abundantes componentes estruturais das paredes celulares das plantas, especialmente de cereais. Contudo, tais compostos fenólicos se ligam aos polissacarídeos da parede celular por ligações éster, e desta forma não podem ser absorvidos no intestino (ANDREASEN, 2001).

Garcia *et al.* (1997) estudou a relação da atividade da xilanase com a esterase de ácido ferúlico, em *Streptomyces avermitilis*, detectando maior atividade desta enzima na presença de altos níveis de xilanase.

A cepa *Streptomyces viridosporus* T7A é capaz de produzir, em substrato lignocelulósico, compostos fenólicos derivados da lignina, tais como os ácidos cumárico e ferúlico (RAMACHANDRA *et al.*, 1987). Tais compostos fenólicos têm grande importância biotecnológica para produção de antioxidantes industriais (CRAWFORD, 1984), e também para uso médico, no combate a radicais livres, protegendo as células de lipoperoxidação, envelhecimento e doenças degenerativas (FERGUSON, 2001).

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

Alguns trabalhos foram feitos no sentido de avaliar os efeitos dos compostos fenólicos sobre a microbiota e a capacidade de digestão de fibras em animais ruminantes.

Culturas *in vitro* de microrganismos da microbiota ruminal foram usadas 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 usado como substrato, observou-se diminuição de 14% na digestibilidade. Com adição do ácido vanílico, contudo, o número de células xilanolíticas viáveis cultivadas da fermentação submersa foi dez vezes maior que nas fermentações-controle. A taxa de crescimento

de *Ruminococcus albus* e *Ruminococcus flavefaciens* foi mais inibida pelo ácido  $\rho$ -cumárico que pela vanilina. Tais resultados sugerem que os monômeros fenólicos podem inibir a digestibilidade de 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, visando obtenção de informações sobre a influência no crescimento e o 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 siringico, ferúlico, vanilina, ácido vanílico, ácido cumárico,  $p$ -hidroxibenzaldeído, ácido  $p$ -hidroxibenzoico e ácido hidrocinâmico. A degradação *in vitro* da matéria seca não foi estimulada por nenhum dos compostos, e ácido cinâmico e aldeído benzoico reduziram a digestão pela população ruminal. Ácido  $\rho$ -hidroxibenzoico e  $\rho$ -cumárico resultaram em alterações ultraestruturais nas bactérias, causando redução em seu tamanho, e o ácido  $\rho$ -cumárico causou redução no tamanho capsular e pleomorfismo nas bactérias (BORNEMAN *et al.*, 1986).

#### **Material e Métodos**

##### ***Produção do extrato bruto enzimático***

A cepa utilizada para o desenvolvimento deste trabalho, *Streptomyces viridosporus* T7A (ATCC 39115), foi adquirida na *American Type Culture Collection*. O extrato bruto enzimático foi obtido por fermentação no estado sólido, utilizando como substrato bagaço de cana, farelo de soja e capim Napier. O extrato bruto enzimático foi utilizado na proporção de 100 a 500 U de xilanase por quilograma de matéria seca (MS).

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 1,0  $\mu$ mol de xilose liberada por minuto, medida por espectrofotometria (leitura A540 nm), baseada na curva padrão da xilose.

Para determinação da atividade da peroxidase, foi utilizada a técnica de Sichak & Dounce (1986), modificada. Monitorizou-se a oxidação da L-3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA) na presença de peróxido de hidrogênio. O volume final de 3,0 mL da reação foi misturado com 4,0 mM de peróxido de hidrogênio, 0,1 M de tampão fosfato de potássio (pH 7,0) e 1,0 mM de L-DOPA e extrato bruto enzimático (300 a 600  $\mu$ L). Para o branco foi adicionado todo o reagente utilizado no ensaio, sendo o extrato enzimático previamente submetido à inativação pelo calor em forno de microondas. A reação foi iniciada pela adição de peróxido de hidrogênio, e o aumento da absorbância A470 nm foi medido por cinco minutos, a 37°C.

Para a análise dos efeitos do extrato bruto enzimático sobre a digestibilidade *in vitro* foi utilizado o

teste de ANOVA .

### Digestibilidade “in vitro” da matéria seca

O processo de digestibilidade *in vitro* foi utilizado para simular a digestão em ruminantes, sendo a microbiota dos pré-estômagos colhida de um búfalo saudável cirurgicamente fistulado, mantido em jejum alimentar e hídrico por uma hora antes da colheita. O fluido assim obtido foi transportado ao laboratório em garrafa térmica e filtrado em quatro camadas de gaze, sendo a microbiota obtida por esta filtração usada como inóculo para o processo de fermentação de capim Napier, que foi mantido em temperatura e pH controlados, sendo o estudo realizado da seguinte forma:

Uma amostra de capim Napier foi parcialmente seca, moída e selecionada com peneira de 1,0 mm. A seguir, sob temperatura de 105°C, determinou-se sua matéria seca (MS).

Foram preparadas três séries de seis tubos, sendo que cada série constou de quatro tubos para o estudo da fermentação, um tubo para controle e um tubo branco.

Uma solução tampão de McDougall foi preparada com um litro de água destilada, 9,8 g de NaHCO<sub>3</sub>, 7,0 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 0,57 g de KCl, 0,47 g de NaCl, 0,12 g de MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 0,04 g de CaCl<sub>2</sub> e 0,20 a 0,80 g de uréia (dependendo do conteúdo de nitrogênio do material).

A seguir, adicionou-se 10 mL do conteúdo ruminal previamente filtrado a cada tubo, exceto os brancos. Assim inoculados, os tubos foram mantidos em banho a 39,0°C, sob agitação constante, e em cada um introduziu-se CO<sub>2</sub>, após o que foram imediatamente tampados. Quarenta e oito horas depois, realizou-se acidificação, adicionando-se a cada tubo 2,0 mL de HCl a 40%, e imediatamente a seguir adicionou-se também 5,0 mL de solução aquosa de pepsina a 4,0% (atividade de 1:10.000).

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 em estufa, a 105°C, até atingirem peso constante, sendo então resfriados em dessecador e pesados. Foram tomados os seguintes valores: A – peso da amostra (g), B – percentual de MS da amostra, D – peso do cadinho vazio (g) e E – peso do cadinho + resíduo (g). A partir daí, calculou-se a MS da amostra (G) por meio da fórmula  $G = (A \times B) \div 100$ , a MS do resíduo da amostra (H) por meio da fórmula  $H = E - D$ , e a MS do resíduo do branco (I) por meio da fórmula  $I = E - D$  (média de 4 tubos).

Finalmente, a digestibilidade *in vitro* da matéria seca foi calculada por meio da seguinte fórmula: **Digestibilidade in vitro da MS % = {[G - (H - I)] ÷ G} x 100**

### Resultados, discussão e conclusões

#### 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 na Tabela 1.

**Tabela 1 - 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
2,0%	55,39
5,0%	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. Tais resultados mostram que, nos níveis testados, o complexo enzimático contido no extrato bruto enzimático, principalmente a xilanase, não foi capaz de incrementar o processo de digestibilidade em 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 microbiota dos ruminantes produz grandes quantidades de xilanase e celulase (ANDRIGUETTO, 1983). Portanto, seu 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 de celulose e xilano, possivelmente influenciando o ataque dos organismos fibrolíticos às partículas da fibra. Borneman (1986) também confirmou esta hipótese, pois a presença de ácido sinápico, seringaldeído, ácido siríngico, ácido ferúlico, vanilina, ácido vanílico, ácido cumárico, p-hidroxibenzaldeído, ácido p-hidroxibenzóico e 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-cumárico resulta em alterações ultraestruturais das bactérias ruminais. Desta forma pode-se dizer que a xilanase liberada pelo *S. viridosporus* T7A pode contribuir para 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. Em outro estudo, verificou-se que o extrato bruto enzimático tem propriedades antimicrobianas, o que também pode inibir o crescimento de bactérias importantes para o processo fermentativo das fibras em ruminantes.

Acredita-se que a xilanase do extrato bruto enzimático possa ter exercido um efeito positivo na fermentação, o qual pode ter sido sobrepujado pela ação de compostos fenólicos, e também pelo efeito inibitório do extrato bruto sobre bactérias ruminais.

## Referências

- 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. *et al.* 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 Proceedings of Alltech's 13<sup>th</sup> Animal Symposium*. Nottingham: Nottingham University Press, 1997. p 115-127.
- ANTAI, S. P.; CRAWFORD, D. L. Decomposition of softwood, hardwood and grass lignocelluloses by two *Streptomyces* strains. *Applied environmental microbiology*, v. 42, p. 378-380, 1981.
- 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.139-142, Nov. 1991.
- BAILEY, M. J.; BIELY, P.; PANTONEN, K. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. *Journal of biotechnology*, v. 23, p. 257-270. 1992
- BANCI, L. Structural 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.
- BHAT, C. Cellulases and related enzymes in biotechnology. *Biotechnology advances*, v. 18, p. 355-383, 2000.
- 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.
- COWAN, W. D. Animal feed. In: GODFREY, T. *Industrial enzymology*. London Macmillan Press, 2. ed. 1996. p. 360-371.
- CRAMPTON, 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.1041-1045, 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 environmental microbiology*, v. 45, n. 3, p. 898-904, Mar. 1983.
- \_\_\_\_\_. Production of useful modified lignin polymers by bioconversion of lignocellulose with *Streptomyces*. *Biotechnology advances*, v. 2, p. 217-232, 1984.
- FERGUSON, L. R. Role of plant polyphenols in genomic stability. *Mutation research*, v. 475, p. 89-111, 2001.
- GALANTE Y. M.; DE CONTI A.; MONTEVERDI, R. Application of *Trichoderma* enzymes in food and feed industries. In: HARMAN, G. F.; KUBICEK, C. P. *Trichoderma & Gliocladium. Enzymes, biological control and commercial applications*. London: Taylor & Francis, 1998. p. 327-342.
- GARCIA, B. L. *et al.* Induction of ferulic acid esterase and xylanase activities in *Streptomyces avermitilis* UAH30. *Fems microbiology letters*, v. 158, p. 95-99, 1997.
- GEORIS, J. *et al.* 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.
- GRAHAM, H. *et al.* Effect of enzymes supplementation on digestion of a barley/pollard based pig feed. *Nutrition report international*, p. 38, 1073-1079, 1998.
- JARONI, D. *et al.* 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. 1999.
- JUNG, H. G.; VOGEL, K. P. Influence of lignin in digestibility of forage cell wall material. *Journal of animal science*, v. 62, n. 6, p.1703-1712, Jun. 1986.
- KULKARNI, N.; SHENDYE, A.; RAO, M. Molecular and biotechnology aspects of xylanases. *Fems microbiology reviews*, v. 23, p. 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. *et al.* Effect of direct-fed fibrolytic enzymes on lactational performance of midlactation Holstein cows. In: *Proceedings of Western Section American Society Animal Science*, v. 46, p. 310, 1995.
- 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.
- MUTH, G.; BROLLE, D. F.; WOHLLEBEN, W. Genetics of *Streptomyces* In: DEMAIN, A. L.; DAVIES, J. *Manual of industrial microbiology and biotechnology*. 2. ed. Washington: ASM Press, 1999. p. 353.
- NASCIMENTO, R. P. *et al.* 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.
- PANDEY, A. *et al.* *Solid-state fermentation in biotechnology*. New Delhi: Asiatech Publishers, 2001.
- PASTI, M. B. *et al.* Lignin-solubilizing ability of actinomycetes isolated from termites (Termitidae) gut. *Applied environmental microbiology*, v. 56, n. 7, p. 2213-2218, Jul.1990.
- POMETTO III, A. L.; CRAWFORD, D. L. Effects of pH on lignin and cellulose degradation by *Streptomyces viridosporus*. *Applied environmental microbiology*, p. 246-250, Aug. 1986.

- QUINN, P. J. *et al.* *Clinical veterinary microbiology*. London: Mowsby-Year Book Europe Limited, 1994.
- RAMACHANDRA, M.; CRAWFORD, D. L.; HERTEL, G. Characterization of an extracellular lignin peroxidase of the lignocellulytic Actinomycete *Streptomyces viridosporus*. *Applied environmental microbiology*, v. 54, n. 12, p. 3057-3063, 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.
- ROSENBERGER, G. *Exame clínico dos bovinos*. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1983.
- SICHAK, P. S.; DOUNCE, A. L. Analysis of peroxidatic mode of action of catalase. *Archives of biochemistry biophysical*, v. 219, p. 286-295, 1986.
- 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: Cab. International, 1993. p. 146-193.
- 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.
- VAREL, V.; JUNGH, J. G. Influence of forage phenolics on ruminal fibrolitic bacteria and in vitro degradation. *Applied environmental microbiology*, p 275-280, Aug. 1986.
- ZHANG, Z. *et al.* A simple model for predicting the response of chicks to dietary enzyme supplementation. *Journal of animal science*, v. 74, p. 394-402, 1996.
- WARD, O. P. *Biotecnologia de la fermentacion*. Zaragoza: Acribia, 1989.
- 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.

Recebido para publicação em 17/10/2005  
Received for publication on 17 October 2005  
Recibido para publicación en 17/10/2005  
Aceito para publicação em 03/03/2006  
Accepted for publication on 03 March 2006  
Acepto para publicación en 03/03/2006