

Universidade Federal da Grande Dourados – UFGD
Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais – FCBA
Programa de Pós-Graduação em
Biodiversidade e Meio Ambiente - PPGBMA

Biotransformação de resíduos agroindustriais por
cultivo em estado sólido de *Pycnoporus sanguineus* e
Thermoascus aurantiacus

Asser Botelho Santana

Dourados - MS
2024

Universidade Federal da Grande Dourados – UFGD
Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais – FCBA
Programa de Pós-Graduação em
Biodiversidade e Meio Ambiente - PPGBMA

Asser Botelho Santana

BIOTRANSFORMAÇÃO DE RESÍDUOS
AGROINDUSTRIAIS POR CULTIVO EM ESTADO
SÓLIDO DE *Pycnoporus sanguineus* E *Thermoascus*
aurantiacus

Dissertação apresentada à Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de MESTRE EM BIODIVERSIDADE E MEIO AMBIENTE.

Área de Concentração: Conservação dos Recursos Naturais

Orientador(a): Prof. Dr. Rodrigo Simões Ribeiro Leite

Dourados - MS

2024

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

S232b Santana, Asser Botelho

Biotransformação de resíduos agroindustriais por cultivo em estado sólido de *Pycnoporus sanguineus* e *Thermoascus aurantiacus* [recurso eletrônico] / Asser Botelho Santana. -- 2024.

Arquivo em formato pdf.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Simões Ribeiro Leite.

Dissertação (Mestrado em Biodiversidade e Meio Ambiente)-
Universidade Federal da Grande Dourados, 2023.

Disponível no Repositório Institucional da UFGD em:
<https://portal.ufgd.edu.br/setor/biblioteca/repositorio>

1. Incremento proteico. 2. Resíduos agroindustriais. 3. Fungos

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

©Direitos reservados. Permitido a reprodução parcial desde que citada a fonte.

“BIOTRANSFORMAÇÃO DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS POR CULTIVO EM ESTADO SÓLIDO DE *Pycnoporus sanguineus* E *Thermoascus aurantiacus*.”

POR

ASSER BOTELHO SANTANA

DISSERTAÇÃO APRESENTADA À UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS (UFGD), COMO PARTE DOS REQUISITOS EXIGIDOS PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM BIODIVERSIDADE E MEIO AMBIENTE -ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: “CONSERVAÇÃO DOS RECURSOS NATURAIS”.



Documento assinado digitalmente

RODRIGO SIMOES RIBEIRO LEITE

Data: 22/03/2024 16:00:08-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

**PROF. DR. RODRIGO SIMÕES RIBEIRO
LEITEORIENTADOR – UFGD**



Documento assinado digitalmente

ALESSANDRO MINILLO

Data: 19/03/2024 17:58:10-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

**PROF. DR. ALESSANDRO MINILLO
MEMBRO TITULAR – UEMS**



Documento assinado digitalmente

MARCELO FOSSA DA PAZ

Data: 07/03/2024 14:14:08-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

**PROF. DR. MARCELO FOSSA DA PAZ
MEMBRO TITULAR – UFGD**

Aprovado em 23 de fevereiro de 2024.

*“Consagre ao Senhor tudo o que você faz,
e os seus planos serão bem-sucedidos.”*

Provérbios 16:3

AGRADECIMENTOS

A soberano e supremo Deus, criador de toda ciência, sabedoria e redentor da minha salvação, por ter me concedido força e coragem para enfrentar os percalços da pós-graduação, que não foram poucos, mas que graças a Ele foram vencidos com êxito.

Agradeço aos meus pais e ao meu irmão por não terem medidos esforços nem energia ao darem todo apoio e incentivo nas horas difíceis, de desânimo, cansaço e sempre acreditarem que eu seria capaz de alcançar os meus sonhos. E também por entenderem o motivo de estar longe neste momento.

À família Ferreira, Pr. Josué, Tia Anágela, Calebe, Maria Isabel, André, Nattieles, Nelson e Ana Sofia pelas demonstrações de apoio e afeto. Por muitas vezes serem meu refúgio nos momentos de crises me dando assistência para continuar a jornada de aprendizagem.

Ao meu orientador Prof. Dr. Rodrigo Simões Ribeiro Leite pelos conselhos, paciência, dedicação e pelo tempo disponibilizado ao meu processo de formação. Dedico aqui meu respeito e gratidão ao trabalho de excelência realizado e por ser um exemplo de conduta e profissionalismo científico.

Aos meus amigos e colegas de laboratório em especial a Camylla, Caroline, João Ricardo, Henry, Guilherme e Luis pelo apoio prestado durante o meu mestrado, tornando todo o período da pesquisa mais leve e me ajudando nas dificuldades.

Ao Prof. Dr. Marcelo Fossa da Paz e a Dra. Gabriela Finoto Cavalheiro pelos conhecimentos e experiências compartilhados durante essa caminhada.

À UFGD pelo ambiente propício à evolução e crescimento, bem como a todas as pessoas que a tornam assim tão especial para quem a conhece.

Ao Programa de Pós-graduação em Biodiversidade e Meio Ambiente pela oportunidade e aos docentes por compartilhar seus conhecimentos e experiências.

Ao Laboratório de Enzimologia e Processos Fermentativos pelos momentos de trabalho, ensinamentos, companheirismo e descontração proporcionados.

À CAPES pelo suporte financeiro para a realização desta pesquisa.

A todos que, direta ou indiretamente, fizeram parte da minha vida até este momento.

RESUMO: Os resíduos agroindustriais são importantes fontes de recursos renováveis. Entretanto, o descarte de forma inapropriada desses resíduos podem causar sérios problemas ambientais. A biotransformação de resíduos agroindustriais pelo cultivo em estado sólido gera enzimas e produtos com alto valor nutricional. Esse trabalho teve por objetivo avaliar a produção de enzimas fibrolíticas (endoglucanase, β -glicosidase, xilanase e pectinase) por *P. sanguineus* e *T. aurantiacus* por CES (farelo de trigo e bagaço de cana-de-açúcar 50%:50%, 65% de umidade, 28 °C e 45 °C respectivamente) como também avaliar o perfil bromatológico e a digestibilidade do substrato após o cultivo. O fungo *P. sanguineus* demonstrou maior produção de xilanase e endoglucanase em 48 horas de cultivo, β -glicosidase em 120 horas e pectinase em 48 horas. As enzimas apresentaram valores próximos de pH ótimo variando de 3,5 a 5,5. As temperaturas ótimas abrangeram a faixa de 50 °C a 75 °C. As enzimas foram estáveis em uma ampla faixa de pH, e 70% das suas atividades originais foram mantidas quando incubadas por 1 hora a 65 °C. O fungo enriqueceu o substrato em proteínas (cerca de 14%) e carboidratos (10%). O teor de fibras e lipídeos foi reduzido em 20,74% e 0,16%, respectivamente. Para a digestibilidade, houve um aumento total de 5,63% ao 30º dia de cultivo. Para o fungo *T. aurantiacus* evidenciou-se maior produção de endoglucanase e β -glicosidase em 72 horas, xilanase em 144 horas e pectinase em 72 horas. Os valores de pH ótimo compreenderam a faixa 3,5 a 5,5. As temperaturas ótimas mantiveram-se de 60 °C a 80 °C. As enzimas foram estáveis em uma ampla faixa de pH, e 80% das suas atividades originais foram mantidas quando incubadas por 1 hora a 75 °C. Para a composição bromatológica, o fungo enriqueceu o substrato de crescimento em proteínas em 8,8% e carboidratos com 19,26%. O decaimento de fibras foi de 23,54%. O teor lipídico apresentou um acúmulo de 0,16% ao 5º dia de cultivo.

PALAVRAS-CHAVE: incremento proteico; resíduos agroindustriais; fungos filamentosos.

ABSTRACT: Agro-industrial waste is an important source of renewable resources. However, inappropriate disposal of this waste can cause serious environmental problems. The biotransformation of agro-industrial residues through solid state cultivation generates enzymes and products with high nutritional value. This work aimed to evaluate the production of fibrolytic enzymes (endoglucanase, β -glucosidase, xylanase and pectinase) by *P. sanguineus* and *T. aurantiacus* by CES (wheat bran and sugarcane bagasse 50%:50%, 65% humidity, 28 °C and 45 °C respectively) as well as evaluating the bromatological profile and digestibility of the substrate after cultivation. The fungus *P. sanguineus* demonstrated greater production of xylanase and endoglucanase in 48 hours of cultivation, β -glucosidase in 120 hours and pectinase in 48 hours. The enzymes presented values close to optimum pH, ranging from 3.5 to 5.5. The optimum temperatures ranged from 50 °C to 75 °C. The enzymes were stable over a wide pH range, and 70% of their original activities were maintained when incubated for 1 hour at 65 °C. The fungus enriched the substrate in proteins (about 14%) and carbohydrates (10%). The fiber and lipid content was reduced by 20.74% and 0.16%, respectively. For digestibility, there was a total increase of 5.63% on the 30th day of cultivation. For the fungus *T. aurantiacus*, there was greater production of endoglucanase and β -glucosidase in 72 hours, xylanase in 144 hours and pectinase in 72 hours. The optimum pH values ranged from 3.5 to 5.5. The optimum temperatures remained between 60 °C and 80 °C. The enzymes were stable over a wide pH range, and 80% of their original activities were maintained when incubated for 1 hour at 75 °C. For the bromatological composition, the fungus enriched the growth substrate in proteins by 8.8% and carbohydrates by 19.26%. Fiber decay was 23.54%. The lipid content showed an accumulation of 0.16% on the 5th day of cultivation.

KEYWORDS: protein increase; agro-industrial waste; filamentous fungi.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

CAPÍTULO II

Figura 1 – Produção de endoglucanase (A), β -glicosidase (B), xilanase (C) e pectinase (D) pelo fungo *P. sanguineus* em função do tempo de cultivo em farelo de trigo e bagaço de cana-de-açúcar (50%:50%) a 28 °C, contendo 65% de umidade (as barras de erro representam o desvio padrão médio da determinação em triplicata)..... 25

Figura 2 - Substrato de crescimento (farelo de trigo e bagaço de cana) miceliado por *P. sanguineus* a temperatura de 28 °C, umidade de 65% ao 30° dia de cultivo..... 26

Tabela 1 – Caracterização bioquímica de endoglucanase, β -glicosidase, xilanase e pectinase produzidas fungo *P. sanguineus* em farelo de trigo e bagaço de cana-de-açúcar (50%:50%) a 28 °C, contendo 65% de umidade..... 27

Tabela 2 – Análise dos constituintes bromatológicos do cultivo (farelo de trigo e bagaço de cana-de-açúcar) biotransformado por *P. sanguineus* a temperatura de 28 °C, umidade de 65% no 10°, 20° e 30° dia de cultivo, expressos em porcentagem..... 29

Figura 3 – Digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS%) de bagaço de cana-de-açúcar e farelo de trigo (50%:50%) biotransformados pelo fungo *P. sanguineus* em CES ao 30° dia a 28 °C, contendo 65% de umidade (as barras de erro representam o desvio padrão médio da determinação em triplicata)..... 32

CAPÍTULO III

Figura 1 – Produção de endoglucanase (A), β -glicosidase (B), xilanase (C) e pectinase (D) pelo fungo *T. aurantiacus* em função do tempo de cultivo em farelo de trigo e bagaço de cana-de-açúcar (50%:50%) a 45 °C, contendo 65% de umidade (as barras de erro representam o desvio padrão médio da determinação em triplicata)..... 49

Tabela 1 – Caracterização bioquímica de endoglucanase, β -glicosidase, xilanase e pectinase produzidas fungo *T. aurantiacus* em farelo de trigo e bagaço de cana-de-açúcar (50%:50%) a 45 °C, contendo 65% de umidade..... 50

Tabela 2 – Análise dos constituintes bromatológicos do cultivo (farelo de trigo e bagaço de cana-de-açúcar) biotransformado por *T. aurantiacus* a temperatura de 45°C, umidade de 65% no 5°, 10° e 15° dia de cultivo, expressos em porcentagem..... 53

Figura 2 – Digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS%) de bagaço de cana-de-açúcar e farelo de trigo (50%:50%) biotransformados pelo fungo *T. aurantiacus* em CES ao 30° dia a 28 °C, contendo 65% de umidade (as barras de erro representam o desvio padrão médio da determinação em triplicata)..... 55

SUMÁRIO

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO GERAL	13
2. OBJETIVOS.....	14
2.1. Objetivo geral	14
2.2. Objetivos específicos	14

CAPÍTULO II

PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ENZIMAS FIBROLÍTICAS POR CULTIVO EM ESTADO SÓLIDO PELO FUNGO FILAMENTOSO *Pycnoporus sanguineus* E APLICAÇÃO EM ALIMENTAÇÃO ANIMAL.....

ANIMAL.....	16
RESUMO	16
1. INTRODUÇÃO	18
2. MATERIAIS E MÉTODOS	19
2.1 Produção enzimática	19
2.1.1. Microrganismos	19
2.1.2. Produção de inóculo	19
2.1.3. Cultivo em estado sólido para produção de celulases, hemicelulase e pectinase.....	19
2.1.4. Extração de enzimas	20
2.1.5. Determinação da atividade enzimática	20
2.2. Caracterização enzimática.....	20
2.2.1. Efeito do pH e da temperatura na atividade de celulases, hemicelulase e pectinase.....	20
2.3. Bioconversão de resíduos agroindustriais por microrganismos.....	20
2.3.1. Preparo das amostras.....	20
2.3.2. Inoculação e crescimento micelial.....	21
2.4. Análises bromatológicas.....	21
2.4.1. Umidade e Sólidos Totais.....	21
2.4.2. Proteínas.....	21
2.4.3. Lipídeos.....	22
2.4.4. Fibra Bruta.....	22
2.4.5. Carboidratos.....	23
2.4.6. Cinzas.....	23

2.4.7. Digestibilidade <i>in vitro</i> da matéria seca (DIVMS).....	23
2.5. Análises Estatística.....	24
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	24
3.1. Produção enzimática de enzimas fibrolíticas.....	24
3.2. Caracterização bioquímica das enzimas produzidas.....	27
3.3. Análises bromatológicas.....	28
3.4. Digestibilidade <i>in vitro</i> da matéria seca.....	32
4. CONCLUSÕES.....	33
5. REFERÊNCIAS.....	33
CAPÍTULO III	
BIOTRANSFORMAÇÃO DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS POR CULTIVO EM ESTADO SÓLIDO DE <i>Thermoascus aurantiacus</i>: PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE ENZIMAS FIBROLÍTICAS E ANÁLISE BROMATOLÓGICA.....	
	40
RESUMO	40
1. INTRODUÇÃO	42
2. MATERIAIS E MÉTODOS	43
2.1 Produção enzimática	43
2.1.1. Microrganismos	43
2.1.2. Produção de inóculo	43
2.1.3. Cultivo em estado sólido para produção de celulases, hemicelulase e pectinase.....	43
2.1.4. Extração de enzimas	44
2.1.5. Determinação da atividade enzimática	44
2.2. Caracterização enzimática.....	44
2.2.1. Efeito do pH e da temperatura na atividade de celulases, hemicelulase e pectinase.....	44
2.3. Bioconversão de resíduos agroindustriais por microrganismos.....	44
2.3.1. Preparo das amostras.....	44
2.3.2. Inoculação e crescimento micelial.....	45
2.4. Análises bromatológicas.....	45
2.4.1. Umidade e Sólidos Totais.....	45
2.4.2. Proteínas.....	45
2.4.3. Lipídeos.....	46

2.4.4. Fibra Bruta.....	46
2.4.5. Carboidratos.....	47
2.4.6. Cinzas.....	47
2.4.7. Digestibilidade <i>in vitro</i> da matéria seca (DIVMS).....	47
2.5. Análises Estatística.....	48
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	48
3.1. Produção enzimática de enzimas fibrolíticas.....	48
3.2. Caracterização bioquímica das enzimas produzidas.....	50
3.3. Análises bromatológicas.....	52
3.4. Digestibilidade <i>in vitro</i> da matéria seca.....	55
4. CONCLUSÕES.....	56
5. REFERÊNCIAS.....	56

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO GERAL

O uso de fungos na produção de enzimas e suas aplicações biotecnológicas vem sendo pesquisados e explorados industrialmente de modo crescente. As enzimas são classificadas como proteínas catalisadoras de reações químicas, sendo fundamentais para a desorganização estrutural dos mais diversos tipos de polímeros orgânicos. As aplicabilidades industriais dos biocatalizadores podem ser vistas em diversos setores industriais, como: têxtil, farmacêutico, cosmético e alimentício, devido ao fato de executarem reações catalíticas seletivas.

Dentre as metodologias aplicadas para obtenção destas enzimas, o cultivo em estado sólido (CES) se destaca, sendo caracterizado pelo crescimento microbiano em uma matriz sólida, na ausência de água livre entre as partículas do substrato. Por utilizar resíduos agroindustriais como substrato, em sua grande maioria, atualmente é um dos principais métodos para produção de enzimas fibrolíticas com baixos custos operacionais, apresentando elevada eficiência e com baixos investimentos em tecnologia.

Com o intuito de melhorar a nutrição animal, o conjunto de enzimas responsáveis por degradar biomassa vegetal pode ser aplicado na pré-digestão dos alimentos fibrosos, disponibilizados aos animais ruminantes. A celulase, hemicelulase, pectinase e ligninase promovem a desorganização e quebra dos de seus respectivos substratos, presentes na parede celular vegetal. Dessa forma, as bactérias fermentadoras do rúmen obtêm maior facilidade de degradação e absorção do alimento pré-digerido.

Cultivos preliminares realizados pela equipe do Laboratório de Enzimologia e Processos Fermentativos – LEPFER/FCBA/UFGD, demonstraram considerável potencial para produção de enzimas fibrolíticas pelos fungos filamentosos *Pycnoporus sanguineus* e *Thermoascus aurantiacus* utilizando resíduos agroindustriais como substratos. Esses resultados estimularam o desenvolvimento do presente trabalho, tendo como principal objetivo avaliar as biotransformações realizadas por esses microrganismos.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Avaliar a biotransformação de resíduos agroindustriais por cultivo em estado sólido dos fungos *P. sanguineus* e *T. aurantiacus*.

2.2. Objetivos Específicos

- Avaliar o efeito do tempo de CES na produção de enzimas fibrolíticas produzidas por *P. sanguineus* e *T. aurantiacus*;
- Avaliar o efeito de pH e temperatura sobre as enzimas fibrolíticas produzidas por *P. sanguineus* e *T. aurantiacus*;
- Avaliar as variações na composição bromatológica realizada por *P. sanguineus* e *T. aurantiacus*;
- Avaliar a digestibilidade *in vitro* dos resíduos agroindústrias biotransformados por *P. sanguineus* e *T. aurantiacus*.

CAPÍTULO II

Produção e caracterização de enzimas fibrolíticas por cultivo em estado sólido pelo fungo filamentoso *Pycnoporus sanguineus* e aplicação em alimentação animal

Asser Botelho Santana, Gabriela Finoto Cavalheiro, Luiz Henrique Bovi de Quadros, Geisa Alves da Silva, Thayná Cardoso Vieira, Caroline Pereira Moura Aranha, Gustavo Graciano Fonseca, Rafael Henrique de Tonissi e Buschinell de Goes,
Marcelo Fossa da Paz, Rodrigo Simões Ribeiro Leite

RESUMO

A atividade agroindustrial gera resíduos com possível impacto ambiental. O emprego de resíduos agroindustriais no cultivo em estado sólido de microrganismos é uma possibilidade de reaproveitamento desses subprodutos e possibilita a redução do custo de produção de enzimas. Este estudo visou avaliar a produção de enzimas fibrolíticas (endoglucanase, β -glicosidase, xilanase e pectinase) por *P. sanguineus* em CES, utilizando farelo de trigo e bagaço de cana-de-açúcar (50:50%) como substratos, como também visou avaliar o perfil bromatológico e a digestibilidade do substrato após o cultivo por 10, 20 e 30 dias. O fungo demonstrou maiores produções de xilanase e endoglucanase em 48 horas de cultivo ($14,30 \pm 0,98$ e $90,13 \pm 1,27$ U.g⁻¹), β -glicosidase em 120 horas ($8,30 \pm 0,44$ U.g⁻¹) e pectinase em 48 horas ($1105,93 \pm 47,26$ U.g⁻¹). As enzimas apresentaram valores próximos de pH ótimo variando de 3,5 a 5,5. As temperaturas ótimas abrangeram a faixa de 50 °C a 75 °C. As enzimas foram estáveis em uma ampla faixa de pH, e 70% das suas atividades originais foram mantidas quando incubadas por 1 hora a 65 °C. O fungo enriqueceu o substrato em proteínas (cerca de 14%) e carboidratos (10%). O teor de fibras e lipídeos foi reduzido em 20,74% e 0,16%, respectivamente. Para a digestibilidade, houve um aumento total de 5,63% ao 30º dia de cultivo. O fungo *P. sanguineus* demonstrou capacidade de produzir enzimas estruturalmente estáveis, além de aumentar o teor proteico e a digestibilidade do substrato, sendo promissor para a indústria de ração animal.

Palavras-chave: aumento proteico; fibra bruta, basidiomiceto; bagaço de cana-de-açúcar.

Production and characterization of fibrolytic enzymes by solid state cultivation by the filamentous fungus *Pycnoporus sanguineus* and application in animal feed

Asser Botelho Santana, Gabriela Finoto Cavalheiro, Luiz Henrique Bovi de Quadros, Geisa Alves da Silva, Thayná Cardoso Vieira, Caroline Pereira Moura Aranha, Gustavo Graciano Fonseca, Rafael Henrique de Tonissi e Buschinell de Goes,
Marcelo Fossa da Paz, Rodrigo Simões Ribeiro Leite

Abstract

Agro-industrial activity generates waste with possible environmental impact. The use of agro-industrial residues in the solid state cultivation of microorganisms is a possibility of reusing these by-products and makes it possible to reduce the cost of enzyme production. This study aimed to evaluate the production of fibrolytic enzymes (endoglucanase, β -glucosidase, xylanase and pectinase) by *P. sanguineus* in CES, using wheat bran and sugarcane bagasse (50:50%) as substrates, as well as aimed to evaluate the chemical profile and digestibility of the substrate after cultivation for 10, 20 and 30 days. The fungus demonstrated higher productions of xylanase and endoglucanase in 48 hours of cultivation (14.30 ± 0.98 and 90.13 ± 1.27 U.g⁻¹), β -glucosidase in 120 hours (8.30 ± 0.44 U.g⁻¹) and pectinase in 48 (1105.93 ± 47.26 U.g⁻¹). The enzymes presented values close to optimum pH, ranging from 3.5 to 5.5. The optimum temperatures ranged from 50 °C to 75 °C. The enzymes were stable over a wide pH range, and 70% of their original activities were maintained when incubated for 1 hour at 65 °C. The fungus enriched the substrate in proteins (about 14%) and carbohydrates (10%). The fiber and lipid content was reduced by 20.74% and 0.16%, respectively. For digestibility, there was a total increase of 5.63% on the 30th day of cultivation. The fungus *P. sanguineus* demonstrated the ability to produce structurally stable enzymes, in addition to increasing the protein content and digestibility of the substrate, being promising for the animal feed industry.

Key-words: protein increase; crude fiber, basidiomycete; sugar cane bagasse.

1. INTRODUÇÃO

Oriundos do processamento de biomassa vegetal, os resíduos agroindustriais possuem elevado potencial na aplicação de geração de diferentes produtos, como biopolímeros, fármacos, fertilizantes e outras moléculas de interesse comercial (YAFETTO, ODAMTTEN & WIAFE-KWAGYAN, 2023; SCARCELLA *et al.*, 2021). Contudo, o descarte de forma inapropriada desses subprodutos resulta em sérias implicações para o meio ambiente.

A valorização desses resíduos pelo cultivo de microrganismo em estado sólido (CES) representa uma alternativa de mitigar os impactos ambientais (NAIR, AGRAWAL & VERMA, 2022). A baixa disponibilidade de água livre no processo CES reduz os custos operacionais de produção e diminui as chances de contaminação como também se assemelha aos habitats naturais dos fungos filamentosos, o que favorece o crescimento e produção enzimática por esses microrganismos (BERENJAN e EHSAN, 2023; ŠELO *et al.*, 2021).

O uso da biomassa vegetal como substrato para produção de enzimas microbianas pode ser caracterizado como uma tecnologia economicamente sustentável, uma vez que diminuem o potencial poluidor desses subprodutos ao meio ambiente e seu emprego para essa finalidade fornece produtos de valor agregado. (DANESHVAR *et al.*, 2022, AL-MAQTARI, WALEED & MAHDI, 2019).

A biotransformação do substrato realizada por fungos filamentosos é um processo complexo e organizado. Os fungos alimentam-se de matéria vegetal orgânica, transformando-a em lipídeos, proteínas, fibras e minerais essenciais ao seu desenvolvimento, mediante a produção de enzimas hidrolíticas e oxidativas. Essas enzimas são essenciais para a desestruturação e degradação de substratos lignocelulósicos, constituintes da matéria vegetal (YAFETTO, ODAMTTEN & WIAFE-KWAGYAN, 2023).

O fungo basidiomiceto *Pycnoporus sanguineus*, pertence ao grupo de microrganismos responsáveis por causar a podridão branca. Esses fungos são classificados dessa forma porque degradam a lignina da madeira pela ação de enzimas lignolíticas expondo as fibras de celulose, podendo também apresentar a produção de xilanases, celulasas e pectinases (LI *et al.*, 2018). O microrganismo *P. sanguineus* é tipicamente encontrado e distribuído em regiões tropicais e subtropicais. (HERRERA; ULLOA, 1998; FENG *et al.*, 2021).

As aplicações biotecnológicas descritas para *P. sanguineus* são: atividade antimicrobiana devido ao seu pigmento cinabarina (BORDERES *et al.*, 2011), biorremediação (FENG *et al.*, 2021), produção de lacases (ORLIKOWSKA *et al.*, 2018), produção de enzimas aplicadas na obtenção de etanol de segunda geração (GONZÁLEZ-BAUTISTA *et al.*, 2019) e biodegradação de compostos orgânicos poluentes (WANG *et al.*, 2019).

Neste âmbito, o presente trabalho teve por objetivo avaliar a produção e a caracterização bioquímica de endoglucanase, β -glicosidase, xilanase e pectinase (enzimas fibrolíticas) produzidas por cultivo em estado sólido do fungo filamentoso *P. sanguineus* bem como o perfil bromatológico e a digestibilidade *in vitro* dos resíduos após o cultivo em estado sólido.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Produção enzimática

2.1.1. Microrganismos

Foi utilizado o fungo *P. sanguineus* mantido no Laboratório de Enzimologia e Processos Fermentativos (LEPFER/UFGD). O fungo foi isolado de troncos de árvore localizados em área de Cerrado da região de Dourados – MS (22°10'49.2"S - 54°56'57.4"W), e identificado pela Micoteca URM da Universidade Federal de Pernambuco – UFPE.

2.1.2. Produção de inóculo

O fungo foi cultivado em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL do meio *Ágar Sabouraud Dextrose*, mantido pelo período de 96 horas a 28 °C. A suspensão do fungo foi obtida pela raspagem suave da superfície do meio de cultura empregando 30 mL de solução nutriente (0,1% de sulfato de amônio, 0,1% sulfato de magnésio hepta-hidratado e 0,1% nitrato de amônia). A inoculação do fungo no substrato (resíduos agroindustriais) se deu pela transferência de 5 mL desta suspensão (COSTA *et al.*, 2019).

2.1.3. Cultivo em estado sólido para produção de celulases, hemicelulases e pectinases

O substrato para o cultivo foi composto (50%:50%) de farelo de trigo e bagaço de cana-de-açúcar. Os substratos utilizados foram previamente sanitizados, sendo posteriormente secos a 50 °C por 48 horas. A combinação de substratos (2,5 g de farelo de trigo e 2,5 g de bagaço de cana-de-açúcar) foi colocada em frascos Erlenmeyer de 250 mL e umedecidos com 4,5 mL de solução nutriente (descrita anteriormente), seguindo para esterilização em autoclave (20 min, 121 °C, 1 atm). Foram adicionados aos resíduos agroindustriais 5 mL da solução inóculo, perfazendo 5 mg de massa micelial seca/grama de substrato seco, em seguida os frascos foram mantidos a 28 °C. Deste modo, a umidade foi fixada em 65%, temperatura em 28 °C, amostras foram retiradas a cada 24 horas, totalizando 144 horas de cultivo. Todos os ensaios foram realizados em triplicata, e os valores descritos representaram as respectivas médias (COSTA *et al.*, 2019).

2.1.4. Extração de enzimas

O extrato enzimático foi obtido pela adição de 50 mL de água destilada nos frascos Erlenmeyer contendo o resíduo miceliado, seguido de maceração com auxílio de bastão de vidro por 10 min. Posteriormente, os frascos foram agitados por 1 hora a 150 rpm. As amostras foram filtradas em tecido de poliamida (nylon) e centrifugadas a $1500 \times g$ por 10 min a 10 °C. O sobrenadante foi usado para os ensaios subsequentes (COSTA *et al.*, 2019).

2.1.5. Determinação da atividade enzimática

As atividades da endoglucanase (carboximetilcelulase-CMCase), xilanase e pectinase foram quantificadas usando como substrato 3% de carboximetilcelulose (CMC - C5678; Sigma-Aldrich), 1% de xilana (Beechwood, Sigma-Aldrich) e 1% de pectina (Vetec), respectivamente. Os açúcares redutores liberados pela ação enzimática foram quantificados pelo método ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) (MILLER, 1959). A atividade de β -glucosidase foi mensurada com o substrato sintético p-NP- β -D-glucopiranosídeo 4 mM (Sigma-Aldrich) (PEREIRA *et al.*, 2015). Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μ mol de produto por minuto de reação.

2.2. Caracterização bioquímica

2.2.1. Efeito do pH e da temperatura na atividade de celulasas hemicelulasas e pectinases

O pH ótimo foi determinado pela quantificação da atividade enzimática a 50 °C em diferentes valores de pH (3,0-8,0) usando tampão McIlvaine (0,1M). A temperatura ótima foi determinada pela determinação da atividade das enzimas variando a temperatura de 30 a 70 °C no pH ideal para a atividade enzimática. A estabilidade do pH foi quantificada incubando as enzimas por 24 h em diferentes valores de pH a 25 °C usando os tampões McIlvaine 0,1 M (3,0-8,0), Tris-HCl 0,1 M (8-8,5) e glicina-NaOH 0,1 M (8,5-10,5). A termoestabilidade foi analisada incubando as enzimas por 1 hora em diferentes temperaturas de 30 a 80 °C. As atividades residuais foram mensuradas sob condições ótimas de cada enzima (COSTA *et al.*, 2016).

2.3. Bioconversão de resíduos agroindustriais por microrganismos

2.3.1. Preparo das amostras

Foram preparados sacos de polietileno resistentes a autoclavagem com as dimensões 15 cm \times 30 cm contendo farelo de trigo e bagaço de cana na proporção 10 g:10 g (50%:50%) 18 mL de solução nutriente (0,1% de sulfato de amônio, 0,1% sulfato de magnésio hepta-hidratado e

0,1% nitrato de amônia). Os sacos foram fechados com tampões de algodão, para possibilitar as trocas gasosas e foram esterilizados em autoclave a 121 °C por 20 min (PAZ *et al.*, 2013).

2.3.2. Inoculação e crescimento micelial

O microrganismo *P. sanguineus* foi cultivado em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL do meio *Ágar Sabouraud Dextrose*, mantido por um período de 96 horas a 28 °C. O inóculo foi obtido pela raspagem suave da superfície do meio de cultura empregando 30 mL de solução nutriente descrita anteriormente. A inoculação do fungo no substrato (resíduos agroindustriais) se deu pela transferência de 20 mL desta suspensão. Os cultivos foram mantidos a 28 °C, amostras foram retiradas ao 10º, 20º e 30º dia de cultivo e análises bromatológicas realizadas para avaliar as transformações decorrentes do crescimento fúngico (PAZ *et al.*, 2013).

2.4. Análises bromatológicas

2.4.1. Umidade e Sólidos Totais

Para determinação de umidade, cadinhos de alumínio com 6g das amostras quarteadas, foram postos em estufa com circulação de ar a 105 °C por 24 horas. Após esse período o conjunto cadinho + amostra seca foram posteriormente pesados. Os valores de umidade em base úmida e sólidos totais foram obtidos pelas equações:

Amostra

$$Eq.1 M_{am} = M_{am} + S_{seco}$$

Umidade em base úmida

$$Eq.2 U_{BU} (\%) = ((M_{am} - M_f) / M_{am}) \times 100$$

Onde: U_{BU} : umidade em base úmida; M_{am} : massa da amostra (g); M_f : massa da amostra depois de seca (g); $M_{\text{água}}$: quantidade de água retirada durante a secagem (g) e S_{seco} : matéria seca (ou sólido seco) contida na amostra (g).

Os valores de sólidos totais foram obtidos pela diferença entre a massa total da amostra úmida e a massa de água evaporada após a secagem em estufa (SANJINEZ-ARGANDOÑA *et al.*, 2017).

2.4.2. Proteínas

Os teores de proteínas foram obtidos segundo o método Kjeldahl, em três etapas Na 1ª etapa (Digestão) foi adicionado 7 mL de solução digestora (2 g de selenito de sódio, 4 g de

sulfato de cobre, 21,4 g de sulfato de sódio, 175 mL de água destilada e 200 mL de ácido sulfúrico) e digeriu-se 0,1 g da amostra em bloco digestor à 350 °C até coloração verde; Na 2ª etapa (Destilação) o tubo digestor foi conectado ao destilador de nitrogênio e adicionado 20 mL de NaOH 40% (80 g de NaOH e 200 mL de água destilada), em um Erlenmeyer de 125 mL foi adicionado 10 mL de solução receptora de ácido bórico 4,2 % (42 g de ácido bórico e 1000 mL de água destilada) + 3 gotas de solução indicadora (0,25 g de verde de bromocresol, 0,25 g de vermelho de metila e 250 mL de álcool etílico) e destilou-se a amostra até recolher 70 mL; A 3ª etapa (Titulação) a solução titulada foi acrescida a solução de ácido sulfúrico 0,1 N (3 mL de ácido sulfúrico e 1000 mL de água destilada) sob agitação até a obtenção de uma coloração lilás. Os valores do conteúdo de nitrogênio e proteico foram obtidos pelas equações:

$$Eq.3 N (\%) = ((V_{H_2SO_4} \times N_{H_2SO_4} \times 0,014 \times f) / M_{am}) \times 100$$

$$Eq.4 Proteínas (\%) = N (\%) \times F_p$$

Onde: **N**: teor de nitrogênio contido na amostra (%); **V_{H₂SO₄}**: volume de ácido sulfúrico gasto na titulação (mL); **N_{H₂SO₄}**: normalidade do H₂SO₄; **f**: fator dado para correção da solução de H₂SO₄ (1,0095) e **F_p**: fator usado para conversão das proteínas (6,25) (SANJINEZ-ARGANDOÑA *et al.*, 2017).

2.4.3. Lipídeos

Para quantificação do teor lipídico, 2,5 g das amostras secas foram colocadas em pequenos pacotes de papel e depositados nos tubos extratores. A extração contínua foi realizada por 6 horas a 50 °C com 200 mL de hexano. O *reboiler* foi retirado do tubo extrator e seco em estufa de circulação de ar a 105 °C por 2 horas, resfriado em dessecador e pesado. Os valores do teor lipídico foram obtidos pela equação:

$$Eq.5 Lipídeos (\%) = ((M_R - M_r) / M_{am\ seca}) \times (100 - U_{BU}(\%))$$

Onde: **M_R**: massa da *reboiler* com lipídeos (g); **M_r**: massa do *reboiler* (g); **M_{am}**: massa da amostra previamente seca (g) e **U_{BU}**: umidade da amostra em base úmida (%) (SANJINEZ-ARGANDOÑA *et al.*, 2017).

2.4.4. Fibra Bruta

Para determinação do teor de fibra bruta das amostras sacos extratores de Tecido-Não-Tecido (TNT) foram lavados em acetona (P.A.) por 5 min, sendo secos a 105 °C por 1 hora e 30 min. Cerca de 0,5 g das amostras foram colocados nos sacos extratores e lavadas em 3 L de H₂SO₄ a 1,5% (v/v) a 98 °C por 30 min e posteriormente em 3 L de NaOH a 1,5% (p/v).

Transcorrido o processo de lavagem, os sacos foram lavados em acetona (P.A.) em seguida foram postos para secagem completa em estufa com circulação de ar a 70 °C por 24 horas e pesados posteriormente. O teor de fibras das amostras foi calculado pela equação:

$$Eq.6 F_{Bruta} (\%) = ((M_{am} - M_f) / M_{am}) \times 100$$

Onde: **F_{Bruta}**: conteúdo de fibra bruta (%); **M_{am}**: massa da amostra (g) e **M_f**: massa da amostra após o processo de secagem (g) (SANJINEZ-ARGANDOÑA *et al.*, 2017).

2.4.5. Carboidratos

A obtenção dos valores referentes aos teores de carboidratos não-fibrosos deu-se pela equação:

$$Eq.7 Carboidratos (\%) = 100 - (\%Cin - \%Lip - \%Prot - \%FB)$$

Onde: **Cin**: porcentagem de cinzas da amostra; **Lip**: porcentagem de lipídeos da amostra; **Prot**: porcentagem de proteínas da amostra e **FB**: porcentagem de fibras brutas da amostra (SANJINEZ-ARGANDOÑA *et al.*, 2017).

2.4.6. Cinzas

O teor de cinzas contido nas amostras foi quantificado segundo a metodologia descrita por Sanjinez-Argandoña *et al.* (2017). Cerca 2 g de amostra referente a cada triplicata foi colocada em cadinhos de porcelana previamente secos. Em seguida foram postos para queima total em mufla a temperatura de 550 °C até a o material carbonizado atingir uma coloração esbranquiçada, indicando a queima total da matéria orgânica presente.

Os valores para o teor de cinzas foram obtidos pela equação:

$$Eq. 8 Cinzas (\%) = (M_c / M_{am}) \times 100$$

Onde: **M_c**: massa de cinzas (g) valor obtido pelo calcula da diferença entre a massa do cadinho com cinzas e a massa do cadinho vazio; **M_{am}**: massa da amostra posta para queima (g).

2.4.7. Digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS)

A metodologia aplicada para determinação da digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS) foi descrita por Tilley & Terry (1963) e alterada por Holden (1999), utilizando-se rúmen artificial (DAISY). Os substratos pesados (0,5 g) foram colocados em saquinhos de TNT (5,0 × 5,0 cm TNT 100 g/cm²) conforme indicação de Casali *et al.* (2009). Os saquinhos foram dispostos em jarros contendo 1,600 mL de solução tampão e 400 mL de inóculo ruminal. Os jarros foram incubados por 48 horas a 39 °C sob agitação contínua. Após a incubação, os

saquinhos foram submetidos a análise de fibra em detergente neutro (FDN), conforme Mertens (2002), com modificações, sendo elas o uso de autoclave e sem sulfito de sódio.

Os valores para o teor de cinzas foram obtidos pela equação:

$$Eq. 9 \text{ DIVMS (\%)} = 100 - [(W_3 - (W_1 \times F)) \times 100 / W_2]$$

Onde: **W1**: peso (g) da tara do saquinho (vazio); **W2**: peso (g) da amostra; **W3**: peso do conjunto saquinho + amostra após 48 fermentação ruminal (Daisy) e determinação FDN; **F**: peso do saquinho em branco (peso final (g) do saquinho em branco após decorrido todo o processo/W4) e **W4**: peso do saquinho em branco antes da incubação.

2.5. Análise Estatística

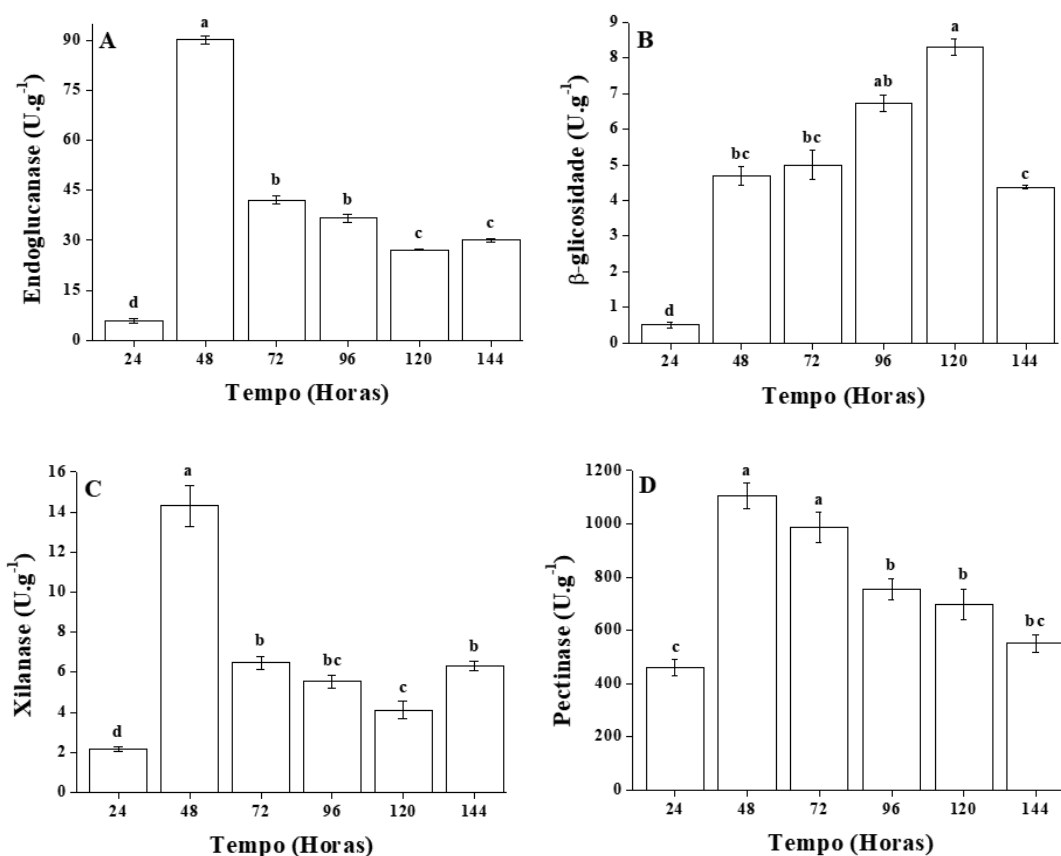
Todos os experimentos foram realizados em triplicata, e os resultados apresentados como a média de três ensaios independentes com seu padrão e desvios. As análises estatísticas dos dados incluíram uma ANOVA de uma via, seguido do teste de Tukey com 5% de significância.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Produção enzimática de enzimas fibrolíticas

As maiores produções de endoglucanase e xilanase foram obtidas com 48 horas de cultivo, cerca de 90,13 e 14,3 U.g⁻¹, respectivamente (Figura 1A e 1C). Para β-glicosidase a maior produção foi obtida com 120 horas, 8,30 U.g⁻¹ e para pectinase entre 48 horas, atingindo 1105,9 U.g⁻¹ de substrato (Figura 1B e 1D).

Figura 1 - Produção de Endoglucanase (A), β -glicosidase (B), Xilanase (C) e Pectinase (D) pelo fungo *P. sanguineus* em função do tempo de cultivo em farelo de trigo e bagaço de cana-de-açúcar (50%:50%) a 28 °C, contendo 65% de umidade (as barras de erro representam o desvio padrão médio da determinação em triplicata).



*Os valores seguidos pelas mesmas letras não diferem entre si, teste de Tukey ($p < 0,05$).

Abdullah *et al.*, (2018) ao trabalharem com o fungo *Aspergillus niger* em condições otimizadas de CES, encontraram a maior produção de pectinase, 390 U.g⁻¹, com 72 horas de cultivo. De modo semelhante, Rocha *et al.* (2020), relataram a produção de 38,2 U.g⁻¹ em 72 horas de CES o fungo *A. niger* em polpa de cajá.

A alta produção enzimática em curtos períodos de cultivo por fungos filamentosos é uma característica que favorece a aplicação de um biocatalizador em processos industriais, uma vez que diminui os custos operacionais do processo (FENG *et al.*, 2021; GAUNA *et al.*, 2018). Deste modo as características observadas na produção de pectinase por *P. sanguineus* obtidas no presente trabalho, contribuem para obtenção e aplicação dessa enzima em processos industriais, como: clarificação e diminuição da viscosidade de sucos, geleias e produtos de origem vegetal.

Os estudos para produção da pectinase por CES, em sua grande maioria utilizam de resíduos agrícolas oriundos da fruticultura. Este fato deve-se a capacidade das frutas armazenarem uma grande quantidade de pectina em sua casca (LIN *et al.*, 2022; SANTOS *et al.*,

2018). No entanto, diversos trabalho descrevem o farelo de trigo como excelente substrato para produção de enzimas fibrolíticas (GARCIA *et al.*, 2015; GARBIN *et al.*, 2021). O farelo de trigo é um substrato nutricionalmente rico, contendo cerca de 14% de proteínas, 27% de carboidratos, 5% de minerais, 6% de gordura e vitamina B, características que muito provavelmente promovem o desenvolvimento e a síntese enzimática por parte dos microrganismos (PANDEY *et al.*, 2000).

Os valores de produção para endoglucanase, β -glicosidase e xilanase foram próximos ou inferiores aos estudos encontrados na literatura.

Massarente *et al.* (2020), descreveram uma produção ótima de 22,2 U.g⁻¹ de endoglucanase em 72 horas para o fungo *Myceliophthora thermophila* M.7.7 por CES em uma combinação de bagaço de cana-de-açúcar e farelo de trigo. Costa *et al.*, (2019) observaram a produção de 36,4 U.g⁻¹ para endoglucanase e 617,8 U.g⁻¹ para xilanase por *Trichoderma piluliferum* e 301,8 U.g⁻¹ para endoglucanase e 53,0 U.g⁻¹ de xilanase para *Trichoderma viride*, quando utilizaram farelo de trigo como substrato. Garbin *et al.*. (2021), evidenciaram a produção de β -glicosidase (415,1 U.g⁻¹) por *Thermoascus crustaceus* quando cultivado em farelo de trigo. Garcia *et al.* (2015), observaram a produção de β -glicosidase 274 U.g⁻¹ pelo fungo *Lichtheimia ramosa* em farelo de trigo.

A produção de celulase e xilanase pelo fungo *P. sanguineus*, mesmo que em pequena quantidade, possibilitou o seu crescimento e miceliação da M.O. por todo o substrato de crescimento (farelo de trigo e bagaço de cana, Figura 2). Scarpa *et al.*, (2019), relatam a utilização do extrato enzimático produzido por *P. sanguineus* para hidrólise de biomassa vegetal, visando a produção de etanol de segunda geração, o que confirma a capacidade de degradação de biomassa vegetal pelo microrganismo.

Figura 2 – Substrato de crescimento (farelo de trigo e bagaço de cana) miceliado por *P. sanguineus* a 28 °C, contendo 65% de umidade ao 30º dia de cultivo.



Fonte: Autor.

3.2. Caracterização bioquímica das enzimas produzidas

Com relação ao pH ótimo, as enzimas endoglucanase, β -glicosidade, xilanase obtiveram valores aproximados ficando em 4,5; 4,0 e 5,5, respectivamente. A pectinase apresentou o pH ótimo mais ácido, tendo sua maior atividade em pH 3,5. Em relação as temperaturas ótimas de atividade, endoglucanase e β -glicosidade apresentaram maior atividade a 70 °C, e a xilanase na temperatura de 75 °C. Para pectinase, a temperatura ótima foi observada a 50 °C (Tabela 1).

Tabela 1 – Caracterização bioquímica de Endoglucanase, β -glicosidase, Xilanase e Pectinase produzidas pelo fungo *P. sanguineus* em farelo de trigo e bagaço de cana-de-açúcar (50%:50%) a 28 °C, contendo 65% de umidade

Enzimas	pH ótimo	Temperatura ótima (°C)	pH de estabilidade	Temperatura de estabilidade (°C)
Endoglucanase	4,5	70	3,5 - 9,0	30 - 60
β -glicosidase	4	70	3,0 - 7,0	30 - 65
Xilanase	5,5	75	3,0 - 8,0	30 - 65
Pectinase	3,5	50	6,0 - 9,0	30 - 65

As características relacionadas a estabilidade estrutural das enzimas produzidas por *P. sanguineus*, possuem semelhança com outras descritas na literatura. Massarente *et al.* (2020), para o fungo *Myceliophthora thermophila* M.7.7, relataram características de pH e temperatura ótima em relação a endoglucanases nas faixas de 5,5 e 70°C, respectivamente. Garbin *et al.* (2021), estudaram a β -glicosidase produzida pelo fungo termófilo *Thermoascus crustaceus* obtiveram valores semelhantes aos obtidos, pH 4,5 a 65 °C. Para xilanases de *Trichoderma koningii* e *Trichoderma pseudokoningii*, Sanguine *et al.* (2022), obtiveram valores de pH e temperatura ótimos em pH 4,5 a 50 °C e pH 4,5 a 55 °C, respectivamente. Omeje *et al.* (2023), ao caracterizarem a pectinase produzida por *Aspergillus aculeatus* observaram valores diferentes aos encontrados no presente trabalho, pH 5,5 a 40 °C.

As características de pH e temperatura ótimos estão relacionadas ao potencial catalítico de uma determinada enzima e são responsáveis por expressar em quais condições a enzima é capaz de formar a maior quantidade de produto, proveniente da quebra do substrato (LEONE, 2021). Dessa forma, a obtenção dos valores de temperatura e pH ótimos são fundamentais para se conhecer as possíveis aplicações industriais.

Com relação ao pH de estabilidade, β -glicosidase, xilanase e pectinase apresentaram uma faixa de estabilidade menor quando comparadas a endoglucanase, variando de 3,0-7,0; 3,0-8,0 e 6,0-9,0, respectivamente. Para a enzima endoglucanase foi recuperado cerca de 80% da sua atividade original quando encubada por 24 horas entre os valores de pH 3,5-9,0 (tabela 1).

Em relação a termoestabilidade das enzimas analisadas, endoglucanase e pectinase mantiveram 80% de sua atividade original até 60 e 65 °C, respectivamente. As enzimas β -glicosidase e xilanase apresentaram termoestabilidade semelhante, mantendo sua atividade original acima dos 80% após 1 hora a 65 °C (Tabela 1).

Trabalhos anteriores relatam enzimas com elevada estabilidade estrutural, as quais mantiveram suas propriedades catalíticas em temperaturas que variavam entre 50 e 65 °C (LI & PAPAGEORGIOU, 2019). Hong, Tamaki, & Kumagai (2007) avaliaram uma β -glicosidase produzida pelo fungo termófilo *Thermoascus aurantiacus* e obtiveram 70% de sua atividade original quando incubada em temperaturas de 30 a 60 °C. Yu *et al.* (2021), estudaram a produção e termoestabilidade de xilanase de *Chaetomium* sp. CQ31, recuperaram mais de 90% de sua atividade original, quando incubada por 1 h a 60 °C. Para esta mesma enzima produzida em farelo de trigo, Ping *et al.* (2018), evidenciaram em seu trabalho uma termoestabilidade acima de 70% quando incubada por 2 h de 30 °C a 80 °C. Desta forma, é possível afirmar que o fungo mesófilo *P. sanguineus* produz enzimas fibrolíticas com considerável estabilidade estrutural.

A estabilidade estrutural de uma proteína é conferida pela quantidade de interações eletrostáticas, hidrofóbicas e pontes dissulfeto em sua estrutura terciária, como também a interação com determinados íons metálicos (PATEL *et al.*, 2019).

O conjunto dessas características é imprescindível para enzimas aplicadas em processos industriais. Enzimas que apresentam reduzida estabilidade estrutural são inativadas facilmente e conseqüentemente não suportam as condições industriais (DADWAL, SHARMA & SATYANARAYANA, 2021).

3.3. Análises bromatológicas

A umidade adicionada ao começo do cultivo e o conteúdo de sólidos totais (matéria seca) mantiveram-se constantes em todos os dias de cultivo analisados, sendo suas médias semelhantes estatisticamente ao grupo controle para ambas as variáveis.

A concentração de proteínas foi aumentada em 14,67% após o final do crescimento fúngico. Ao 30º dia de cultivo, ocorreu o maior acúmulo proteico, alcançando 20,43% da concentração total da amostra. O referido ganho proteico foi consideravelmente elevado se comparado ao grupo controle, que inicialmente continha 5,76% de proteína (Tabela 2).

O aumento na concentração proteica por crescimento fúngico é amplamente relatado na literatura (principalmente para basidiomicetos). Stoffel *et al.*, (2019) constataram aumentos significativos nos níveis de proteína bruta, excedendo 6% na composição de farinhas obtidas a partir do micélio de diferentes basidiomicetos - *Pleurotus albidus*, *Auricularia fuscusuccinea* e *Agaricus blazei* - usando o CES em bagaço de uva.

El-Sayed *et al.* (1994), constataram um aumento de 22,6% na proteína bruta do crescimento de *Pleurotus ostreatus* em bagaço de cana-de-açúcar por CES durante um período de 14 dias a 28 °C. Esses resultados estão de acordo com os descritos por Carmo *et al.* (2021), ao trabalharem com a biotransformação por *P. ostreatus* de resíduos provenientes da indústria do sisal. Os autores obtiveram um produto final com 29,0% de proteína final. Sardar *et al.* (2017), registraram um aumento de mais de 20% no teor total de proteína bruta, ao cultivar o fungo *Pleurotus eryngii* em bagaço de cana-de-açúcar, por 35 dias. Assim, os resultados obtidos no presente trabalho corroboram a hipótese de que o emprego de fungos basidiomicetos em resíduos agroindustriais, especialmente por CES, resultam em incrementos significativos nos níveis proteicos.

O aumento na concentração de proteínas observado ao longo do cultivo, pode estar relacionado diretamente com o crescimento micelial do próprio fungo. As proteínas desempenham papel fundamental na estrutura celular, sendo essenciais para a síntese de novas células, enzimas e outras moléculas biologicamente importantes. Portanto, a síntese de proteínas pelo fungo a partir dos nutrientes presentes no substrato contribui diretamente para o seu crescimento (JOHNS *et al.*, 2021; SARDAR *et al.*, 2017). Essa hipótese pode ser sustentada considerando o elevado crescimento micelial do fungo *P. sanguineus* no substrato utilizado (farelo de trigo e bagaço de cana – Figura 2).

Em processos de cultivo de fungos para obtenção de cogumelos comestíveis, a biotransformação de nutrientes do substrato em proteínas é um processo crítico para maximizar o rendimento e a qualidade do produto final. Os microrganismos têm a capacidade de ajustar suas vias metabólicas de acordo com a disponibilidade de nutrientes, otimizando assim a utilização dos recursos disponíveis para o seu crescimento (XU *et al.*, 2023; SARDAR *et al.*, 2017).

Tabela 2 – Análise dos constituintes bromatológicos do cultivo (farelo de trigo e bagaço de cana-de-açúcar) biotransformado por *P. sanguineus* a temperatura de 28 °C, umidade de 65% no 10º, 20º e 30º dia de cultivo, expressos em porcentagem.

	Controle	10º Dia	20º Dia	30º Dia
Umidade (%)	68,29 a ± 2,34	70,10 a ± 1,24	71,45 a ± 1,07	72,74 a ± 0,63
Sólidos totais (%)	31,70 a ± 2,34	29,89 a ± 1,27	28,54 a ± 1,04	27,25 a ± 0,62
Proteínas (%)	5,76 d ± 0,40	14,72 c ± 0,10	17,76 b ± 0,37	20,43 a ± 0,76
Lipídeos (%)	0,39 b ± 0,01	0,27 ab ± 0,06	0,23 a ± 0,07	0,23 a ± 0,02
Fibra Bruta (%)	59,78 c ± 0,82	47,85 b ± 0,48	42,07 a ± 1,63	39,04 a ± 0,62
Carboidratos (%)	27,11 b ± 0,06	35,27 a ± 0,06	38,65 a ± 2,42	39,17 a ± 1,51
Cinzas (%)	2,78 a ± 0,23	4,1 a ± 0,85	3,22 a ± 0,46	3,16 a ± 0,42

*Os valores seguidos pelas mesmas letras não diferem entre si, teste de Tukey (p<0,05).

Com relação ao conteúdo de fibras brutas, foi observado uma redução superior a 20%, indicando uma possível ação sinérgica das enzimas fibrolíticas produzidas por *P. sanguineus* na hidrólise da biomassa vegetal (Tabela 2). Em todos os dias de cultivo avaliados, observou-se uma redução nos níveis de fibra bruta em relação ao grupo de controle, que apresentou um teor inicial de 59,78%. Entre os dias de cultivo analisados, o 30º dia registrou a redução mais acentuada, cerca de 39%, seguido pelo 20º dia com 42,07% de fibra bruta, valores esses estatisticamente equivalentes (Tabela 2).

A concentração de lipídeos também foi reduzida pelo crescimento do fungo sobre o substrato. Os valores referentes ao perfil lipídico mais baixos foram registrados no 20º e 30º dia de cultivo, ambos com 0,23% de lipídeos, que diferiu estatisticamente do grupo controle, contendo inicialmente 0,39% de teor lipídico. Isso indica o consumo de lipídios por parte do fungo *P. sanguineus* em suas atividades metabólicas.

No decorrer do processo de cultivo foi constatado o aumento total de 12,06% no teor de carboidratos (Tabela 2). No décimo dia de cultivo a concentração de carboidratos atingiu 35,27%, evoluindo para 38,65% no vigésimo e alcançando 39,17% no trigésimo dia. Importante destacar que esses valores são semelhantes estatisticamente entre si, mas se diferenciam significativamente do grupo controle, que totalizou apenas 27,11% (Tabela 2).

O aumento no teor de carboidratos provavelmente está relacionado com a ação das enzimas produzidas pelo microrganismo, sobre o conteúdo de fibras brutas. Assim, a hidrólise dos polissacarídeos constituintes da biomassa vegetal resultou na liberação de carboidratos solúveis na composição do meio.

A ação das enzimas fibrolíticas na hidrólise de celulose, hemicelulose e pectina resulta na liberação de açúcares fermentescíveis. Esses açúcares são utilizados pelos microrganismos em suas atividades metabólicas. Os açúcares fermentescíveis, também conhecidos como carboidratos solúveis, incluem glicose, frutose, galactose e frutanas. A disponibilização desses açúcares a partir da degradação de constituintes da biomassa vegetal é fundamental para o crescimento microbiológico em processos de biotransformação (LI *et al.*, 2020).

Os teores de cinzas obtidos neste trabalho (Tabela 2) não apresentaram diferença estatística entre os substratos miceliados e o grupo controle. O teor de cinzas está relacionado com a quantidade de resíduos inorgânicos remanescentes, após a combustão da matéria orgânica (SANJINEZ-ARGANDOÑA *et al.*, 2017).

Ao analisarem o teor de cinzas da biomassa vinhaça de cana-de-açúcar miceliada por *Aspergillus* sp. V2. após 4 dias de cultivo, Rulli *et al.* (2021), notaram um incremento de 15,8%.

Faria *et al.* (2022) alcançaram um aumento médio de 3,5% no teor de cinzas para farelo de soja, bagaço de cana e torta de nabo forrageiro quando miceliados por *P. ostreatus* e *P. sajor-caju*.

A adição de matérias-primas com elevados índices de cinzas na formulação de dietas de animais ruminantes podem causar sérios danos a formação óssea e articular dos animais em formação (SOONG, RAZAMIN e ROSSHAIRY, 2016). Contudo, os animais ruminantes dependem em sua totalidade de fontes externas para ingestão da fração mineral, uma vez que as concentrações desses componentes não são suficientes para uma máxima resposta animal (MENDONÇA JÚNIOR *et al.*, 2011). Desta forma, o aporte de matérias com quantias balanceadas de cinzas é de suma importância para o desenvolvimento fisiológico e metabólico adequado dos animais.

O incremento médio de 15% no teor proteico e o decréscimo médio de 20% para fibra bruta no substrato miceliado por *P. sanguineus* evidenciam a potencialidade da aplicação desse microrganismo para o enriquecimento nutricional de resíduos agroindustriais para alimentação animal.

Com a incorporação de materiais miceliados na alimentação de animais ruminantes, é possível aprimorar a eficiência na conversão dos alimentos, regular a função intestinal e promover o bem-estar e a saúde animal. No âmbito econômico, a inclusão de materiais miceliados pode resultar em redução de custos no gerenciamento da dieta animal, visto que esses recursos são fontes econômicas e sustentáveis de proteínas, ácidos graxos, carboidratos e vitaminas, podendo compor até 21% da dieta dos ruminantes sem prejudicar a saúde dos animais (MORADZADEH-SOMARIN *et al.*, 2021; STRONG *et al.*, 2022).

Segundo Mahmood, Bahrololoum e Koohzadi (2019) o cultivo de *Pleurotus florida* e *P. ostreatus* no bagaço de cana-de-açúcar enriqueceu seu valor nutricional para alimentação animal. O cultivo de fungos como *Aspergillus oryzae*, *Rhizopus oryzae*, *Mucor indicus*, *Trichoderma reesei* e *Neurospora intermedia* em resíduos agrícolas contribui para elevar o conteúdo proteico e diminuir os compostos antinutricionais desses substratos (SUN *et al.*, 2021; KARIMI *et al.*, 2019).

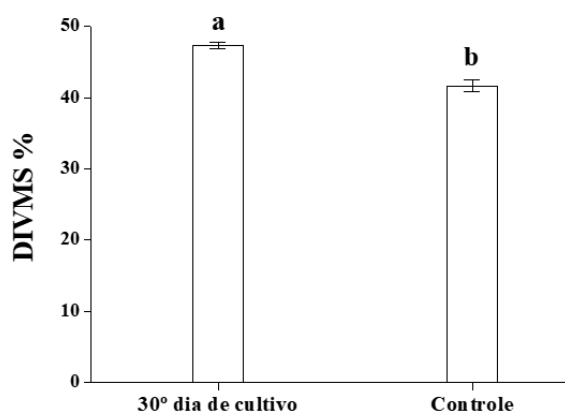
Na nutrição de animais ruminantes, alimentos com alta concentração de proteína desempenham papel crucial. A fração proteica na dieta fornece os aminoácidos essenciais a microbiota ruminal. Além disso, esses aminoácidos desempenham papel fundamental no crescimento, desenvolvimento e reprodução dos animais ruminantes. As proteínas são vitais para o desenvolvimento de músculos, órgãos e glândulas mamárias, influenciando diretamente a produção de carne e leite. Dietas ricas em proteínas melhoram o ganho de peso, a qualidade da

carne e a produção de leite, enquanto também promovem a saúde digestiva e fortalecem o sistema imunológico (SALAMI *et al.*, 2019; BERCHIELLI, PIRES, e OLIVEIRA, 2006).

3.4 Digestibilidade *in vitro* da matéria seca

Observa-se para a DIVMS um acréscimo de 5,63% quando comparado ao início do cultivo. O grupo controle apresentou inicialmente uma média de 41,67% de DIVMS sendo esta variável elevada a 47,30% ao 30º dia de cultivo, ficando estes tratamentos estatisticamente diferentes entre si (Figura 3).

Figura 3 – Digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS%) de bagaço de cana-de-açúcar e farelo de trigo (50%:50%) biotransformados pelo fungo *P. sanguineus* em CES ao 30º dia a 28 °C, contendo 65% de umidade (as barras de erro representam o desvio padrão médio da determinação em triplicata).



*Os valores seguidos pelas mesmas letras não diferem entre si, teste de Tukey ($p < 0,05$).

Faria *et al.* (2022), ao avaliarem a biotransformação de resíduos agroindústrias por CES dos fungos *Pleurotus ostreatus* e *Pleurotus sajor-caju* destinados a alimentação de animais ruminantes, avaliaram incrementos médios na digestibilidade em farelo de soja, bagaço de cana e torta de nabo forrageiro em 3,7%, 1,79% e 2,23% respectivamente.

As modificações nos valores médios da DIVMS de uma matéria-prima são fortemente ligadas ao seu conteúdo de carboidratos estruturais. A hidrólise deste polímero ocorre somente em ambientes aeróbicos mediante processos oxidativos, e na presença de fungos filamentosos, esse processo é realizado por enzimas fibrolíticas. Assim, a digestibilidade de um material lignocelulósico é inversamente proporcional a fração desses polissacarídeos (OKANO *et al.*, 2006).

Quando relacionada a alimentação de animais ruminantes, a fermentação pelos microrganismos ruminais ocorre somente em ambiente anaeróbio, ou seja, o conteúdo de polissacarídeos estruturais antes da ingestão pelo animal é fator determinante para a

digestibilidade e aproveitamento dos nutrientes da dieta oferecida. Deste modo, a aplicação de meios que degradem o conteúdo os carboidratos fibrosos antes da fermentação ruminal é uma alternativa sustentável e econômica (FARIA *et al.*, 2022; OKANO *et al.*, 2006).

A hidrólise dos carboidratos estruturais realizada pelas enzimas fibrolíticas produzidas pelo fungo *P. sanguineus*, evidenciada pelo decaimento nos valores do teor de fibra bruta após o cultivo do fungo ao 30º dia (Tabela 2), fundamentam os ganhos observados para DIVMS. As biotransformações em decorrência da ação das enzimas fibrolíticas sobre o conteúdo fibroso das amostras, propicia um ganho na digestibilidade dos resíduos agroindústrias, tornando-os uma fonte sustentável para alimentação animal.

4. CONCLUSÕES

Conforme os resultados obtidos no presente trabalho, pode-se concluir que o fungo basidiomiceto *P. sanguineus*, quando cultivado em farelo de trigo e bagaço de cana-de-açúcar produz enzimas fibrolíticas em reduzido tempo de cultivo, especialmente enzimas pectinolíticas.

As enzimas produzidas apresentaram elevada estabilidade estrutural, o que favorece a aplicação desses biocatalizadores em processos industriais.

As análises bromatológicas e da DIVMS permitem inferir que o fungo *P. sanguineus* melhora significativamente a composição nutricional e a biodisponibilidade de nutrientes essenciais do resíduo agroindustrial. A habilidade do fungo em enriquecer a composição bromatológica e elevar a digestibilidade do material vegetal tem implicações promissoras para sua utilização na alimentação animal.

5. REFERÊNCIAS

ABDULLAH, R.; FAROOQ, I.; KALEEM, A.; IQTEDAR, M.; & IFTIKHAR, T. Pectinase production from *Aspergillus niger* IBT-7 using solid state fermentation. **Bangladesh Journal of Botany**, v. 47, n. 3, p. 473-478, 2018

AL-MAQTARI, Q.A.; WALEED, A.A.; MAHDI, A.A. Enzimas microbianas produzidas por fermentação e suas aplicações na indústria alimentícia-Uma revisão. **Revista Internacional de Inovações e Pesquisas Agrícolas**, v. 8, n. 1, 2019.

BERCHIELLI, T.T.; PIRES, A.V.; & OLIVEIRA, S.G. **Nutrição de Ruminantes**. 1ª. ed. Jaboticabal: Funep, 2006. 255-269, p.

BERENJIAN, A.; EHSAN, M. **Special Issue "Novel Processes for Development of Fermentation-Based Products"**. Multidisciplinary Digital Publishing Institute. 2021.

Disponível em: < https://www.mdpi.com/si/processes/fermentation_processes>. Acesso em julho de 2023.

BORDERES, J.; COSTA, A.; GUEDES, A.; & TAVARES, L.B.B. Antioxidant Activity of the Extracts from *Pycnoporus sanguineus* Mycelium. **BRAZILIAN ARCHIVES OF BIOLOGY AND TECHNOLOGY**. v. 54, n. 6, p. 1167-1174, 2011.

CARMO, C.O.; SILVA, R.M.; RODRIGUES, M.S.; & SOARES, A.C.F. Bioconversion of sisal agro-industrial waste into high protein oyster mushrooms. **Bioresource Technology Reports**. v. 14, 100657, 2021.

COSTA, A.C.; CAVALHEIRO, G.F.; QUEIROZ, E.R.V.; GANDRA, J.R.; BUSCHINELLI, R.H.D.T. PAZ, M.F.; LEITE, R.S.R. Catalytic properties of xylanases produced by *Trichoderma piluliferum* and *Trichoderma viride* and their application as additives in bovine feeding. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 19, 101161, 2019.

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

DADWAL, A.; SHARMA, S.; & SATYANARAYANA, T. Thermostable cellulose saccharifying microbial enzymes: Characteristics, recent advances and biotechnological applications. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 188, 226-244 p. 2021.

DANESHVAR, E.; WICKER, R.J.; SHOW, P.L.; BHATNAGAR, A. Biologically mediated carbon capture and utilization by microalgae for sustainable biofixation of CO₂ and biomass valorisation – A review. **Chemical Engineering Journal**, v. 427, p. 130884, 2022.

EL-SAYED, S.A.; ZAKI, M.T.; EL-KHAIR, A.W.A. Bioconversion of sugarcane bagasse into a protein-rich product by white rot fungus. **Resources, Conversation and Recycling**. v. 12, p. 195-200, 1994.

FENG, M.; ZHOU, J.; YU, X.; WANG, H.; GOU, Y.; & MAO, W. Bioremediation of triphenyl phosphate by *Pycnoporus sanguineus*: Metabolic pathway, proteomic mechanism and biotoxicity assessment. **Journal of Hazardous Materials**. v. 417, 125983, 2021.

GARBIN, A.P.; GARCIA, N.F.L.; CAVALHEIRO, G.F.; SILVESTRE, M.A.; RODRIGUES, A.; PAZ, M.F.; FONSECA, G.G.; LEITE, RODRIGO S.R. β -glucosidase from thermophilic fungus *thermoascus crustaceus*: production and industrial potential. **Anais da academia brasileira de ciências**, 2021.

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

GAUNA, A.; LARRAN, A.S.; PEROTTI, V.E.; FELDMAN, S.R.; & PERMINGEAT, H.R. Fungal pretreatments improve the efficiency of saccharification of *Panicum prionitis* Ness biomass. **Biofuels**. v. 12, p. 415-421, 2018.

GONZÁLEZ-BAUTISTA, E., ALARCÓN-GUTIERREZ, E., DUPUY, N., GAIME-PERRAUD, I., ZIARELLI, F., FARNET-DA-SILVA, A.M. Influence of yeast extract enrichment and *Pycnoporus sanguineus* inoculum on the dephenolisation of sugar-cane bagasse for production of second-generation ethanol. **Fuel**, v. 260, 2019.

HERRERA, T., ULLOA, M. El reino de los hongos: Micología básica y aplicada. **Universidad nacional autónoma de México: Fondo de Cultura Económica**. Ed. 2, p.552, 1998.

HOLDEN, L.A. Comparison of methods of in vitro dry matter digestibility for ten feeds. **Journal of dairy science**, v. 82, n. 8, p. 1791-1794, 1999.

HONG, J.; TAMAKI, H.; & KUMAGAI, H. Cloning and functional expression of thermostable β -glucosidase gene from *Thermoascus aurantiacus*. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 73, p. 1331-1339, 2007.

JOHNS, L.E.; GOLDMAN, G.H.; RIES, L.N.A.; & BROWN, N.A. Nutrient sensing and acquisition in fungi: mechanisms promoting pathogenesis in plant and human hosts. **Fungal Biology Reviews**. v. 36, p. 1-14, 2021.

KARIMI, S.; SOOFIANI, N.M.; LUNDH, T.; MAHBOUBI, A.; KIESSLING, A.; & TAHERZADEH, M.J. Evaluation of Filamentous Fungal Biomass Cultivated on Vinasse as an Alternative Nutrient Source of Fish Feed: Protein, Lipid, and Mineral Composition. **Fermentation**. v. 5, p. 99, 2019.

LEONE, F.A. **Fundamentos da Cinética Enzimática**. 1^a ed. Curitiba: Appris, 255-261 p. 2021.

LI, A.; PAN, Y.; HU, S.; CHENG, Y.; WANG, Y.; WU, K.; ZHANG, S.; & YANG, S. Diversity of phenanthrene and benz[a]anthracene metabolic pathways in white rot fungus *Pycnoporus sanguineus* 14. **International Biodeterioration & Biodegradation**. v. 134, p. 25-30, 2018.

LI, D.C.; & PAPAGEORGIOU, A.C. Cellulases from thermophilic fungi: recent insights and biotechnological potential. **Fungi in extreme environments: ecological role and biotechnological significance**, p. 395-417, 2019

LI, F.; KE, W.; DING, Z.; BAI, J.; ZHANG, Y.; XU, D.; LI, Z.; & GUO, X. Pretreatment of *Pennisetum sinense* silages with ferulic acid esterase-producing lactic acid bacteria and cellulase at two dry matter contents: Fermentation characteristics, carbohydrates composition and enzymatic saccharification. **Bioresource Technology**. v. 295, 122261, 2020.

LIN, D.; MA, Y.; QUI, W.; LOY, A.D.; CHEN, H.; & ZHANG, Q. The structure, properties and potential probiotic properties of starch-pectin blend: A review. **Food Hydrocolloids**, v. 129, 107644, 2022.

MAHMOOD, M.K.M.; BAHROLOLOUM, S.; & KOOHZADI, F. Investigating the possibility of producing animal feed from sugarcane bagasse using oyster mushrooms: a case in rural entrepreneurship. **Journal of Global Entrepreneurship Research**, v. 9, p. 1-8, 2019.

MASSARENTE, V.S.; ZANONI, J.A.; GOMES, E.; BONILLA-RODRIGUEZ, G.O. Biochemical characterization of endoglucanases produced by *Myceliophthora thermophila* M.7.7 in solid-state culture. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 27, 101684, 2020.

- MERTENS, D.R. Gravimetric determination of amylase-treated neutral detergent fiber in feeds with refluxing in beakers or crucibles: collaborative study. **Journal of AOAC international**, v. 85, n. 6, p. 1217-1240, 2002.
- MENDONÇA JÚNIOR, A.F.; BRAGA, A.P.; RODRIGUES, A.P.M.S.; SALES, L. E.M.; & MESQUITA, H.C. Minerais: importância de uso na dieta de ruminantes. **Agropecuária Científica no Semiárido**, v. 7, n. 1, p. 01-13, 2011.
- MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.
- MORADZADEH-SOMARIN, Z.; SEIFDAVAT, J.; YALCHI, T.; ABDI-BENEMAR, H.; SEYEDSHARIF, R.; ELGHANDOUR, M.M.M.Y.; & SALEM, A.Z.M. Valorization of dietary edible mushrooms waste: chemical and physical properties, nutrient digestibility, microbial protein synthesis and nitrogen balance in sheep. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. v. 101, p. 5574-5582, 2021.
- FARIA, P.M.; MUZZI, R.M.; GOES, R.H.T.B.; & GRESSLER, M.G.M. Bioconversão de coprodutos agroindustriais utilizando fungos *Pleurotus ostreatus* e *Pleurotus sajor-caju* para alimentação de ruminantes. **Revista Acadêmica Ciência Animal**, v. 20, 2022.
- NAIR, L.G.; AGRAWAL, K.; & VERMA, P. An overview of sustainable approaches for bioenergy production from agro-industrial wastes. **Energy Nexus**. v. 6, 100086, 2022.
- OMEJE, K.O.; NNOLIM, N.E.; EZEMA, B.O.; OZIOKO, J.N.; OSSAI, E.C.; & EZE, S. O.O. Valorization of agro-industrial residues for pectinase production by *Aspergillus aculeatus*: Application in cashew fruit juice clarification. **Cleaner and Circular Bioeconomy**, v. 4, p. 100038, 2023.
- ORLIKOWSKA, M.; ROSTRO-ALANIS, M.J.; BUJACZ, A.; HERNÁNDEZ-LUNA, C.; RUBIO, R.; PARRA, R.; & BUJACZ, G. Structural studies of two thermostable laccases from the white-rot fungus *Pycnoporus sanguineus*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 107, p. 1629-1640, 2018.
- OKANO, K.; IIDA, Y.; SAMSURI, M.; PRASETYA, B.; USAGAWA, T.; & WATANABE, T. Comparison of in vitro digestibility and chemical composition among sugarcane bagasses treated by four white-rot fungi. **Animal Science Journal**, v. 77, n. 3, p. 308-313, 2006.
- PANDEY, A.; SOCCOL, C.R.; MITCHELL, D. New developments in solid state fermentation: I- bioprocesses and products. **Process Biochemistry**, v. 35, n. 10, p. 1153-1169, 2000.
- PATEL, A.K.; SINGHANIA, R.R.; SIM, S.J.; & PANDEY, A. Thermostable cellulases: Current status and perspectives. **Bioresource Technology**, v. 279, 385-392 p. 2019.
- PAZ, M.F.; DEMENJOUR, P.L.M.M.; POLEIS, J.C.; & CARDOSO, R.S.R.L. Cultivation of edible mushroom Hiboukitake in caja bagasse by in Jun-Cao technique. **Journal of Biotechnology**, v. 4, n. 2, p. 146-152, 2013.
- PEREIRA, J.C.; MARQUES, N.P.; RODRIGUES, A.; OLIVEIRA, T.B.; BOSCOLO, M.; SILVA, R.; MARTINS, D.A.B. *Thermophilic fungi* as new sources for production of cellulases and xylanases with potential use in sugarcane bagasse saccharification. **Journal of applied microbiology**, v. 118, n. 4, p. 928-939, 2015.

PING, L.; WANG, M.; YUAN, X.; CUI, F.; HUANG, D.; SUN, W.; & WANG, H. Production and characterization of a novel acidophilic and thermostable xylanase from *Thermoascus aurantiacus*. **International journal of biological macromolecules**, v. 109, p. 1270-1279, 2018.

ROCHA, J.C.; ARAÚJO, J.S.; PAIVA, W.K.V.; RIBEIRO, E.S.S.; PADILHA, C.E.A.; ASSIS, C.F.; SANTOS, E.S.; MACÊDO, G.R.; & JÚNIOR, F.C.S. Yellow mombin pulp residue valorization for pectinases production by *Aspergillus niger* IOC 4003 and its application in juice clarification. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 30, 101876, 2020.

RULLI, M.M.; VILLEGAS, L.B.; BARCIA, C.S.; & COLIN, V.L. Bioconversion of sugarcane vinasse into fungal biomass protein and its potential use in fish farming. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 9, ed. 5, 106136, 2021.

SALAMI, S.A.; LUCIANO, G.; O'GRADY, M.N.; BIONDI, L.; NEWBOLD, C.J.; KERRY, J.P.; & PRIOLO, A. Sustainability of feeding plant by-products: A review of the implications for ruminant meat production. **Animal Feed Science and Technology**, v. 251, p. 37-55, 2019.

SANGUINE, I.S.; CAVALHEIRO, G.F.; GARCIA, N.F.L.; SANTOS, M.V.; GANDRA, J.R.; GOES, R.H.T.B.; PAZ, M.F.; FONSECA, G.G.; & LEITE, R.S.R. Xylanases of *Trichoderma koningii* and *Trichoderma pseudokoningii*: Production, characterization and application as additives in the digestibility of forage for cattle. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 44, 102482. 2022.

SANJINEZ-ARGANDOÑA, E.J.; MALDONADE, I.R.; BREDA, C.A.; JUSTI, P.N.; ALVES, A.V.; & SILVA, T.G.D. Roteiro de aulas práticas da disciplina de Análise de Alimentos. 1º ed. Dourados, MS: Ed. UFGD, 2017. (Coleção Cadernos Acadêmicos).

SANTOS, P.S.; SOLIDADE, L.S.; SOUZA, J.G.B.; LIMA, G.S.; BRAGA Jr, A.C.R.; ASSIS, F.G.V.; & LEAL, P.L. Fermentação em estado sólido em resíduos agroindustriais para a produção de enzimas: uma revisão sistemática. **The journal of Engineering and Exact Sciences**, v. 04, n. 02, 2018.

SARDAR, H.; ALI, M.A.; ANJUM, M.A.; HUSSAIN, F.N.S.; NAZ, S.; & KARIMI, S.M. Agro-industrial residues influence mineral elements accumulation and nutritional composition of king oyster mushroom (*Pleurotus eryngii*). **Scientia Horticulturae**, v. 225, p. 327-334, 2017.

SCARCELLA, A.S.A.; PASIN, T.M.; OLIVEIRA, T.B.; LUCAS, R.C.; FERREIRA-NOZAWA, M.S.; FREITAS, E.N.; VICI, A.C.; BUCKERIDGE, M.S.; MICHELIN, M.; & POLIZELI, M.L.T.M. Saccharification of different sugarcane bagasse varieties by enzymatic cocktails produced by *Mycothermus thermophilus* and *Trichoderma reesei* RP698 cultures in agro-industrial residues. **Energy**, v. 226, 120360, 2021.

SCARPA, J.C.P.; MARQUES, N.P.; MONTEIRO, D.A.; MARTINS, G.M. PAULA, A.V.; BOSCOLO, M.; SILVA, R.; GOMES, E.; BOCCHINI, D.A. Saccharification of pretreated sugarcane bagasse using enzymes solution from *Pycnoporus sanguineus* MCA 16 and cellulosic ethanol production. **Industrial Crops and Products**, v.141, 2019.

ŠELO, G.; PLANINIC, M.; TISMA, M.; TOMAS, S.; KOCEVA KOMLENIC, D.; BUCIK-KOJIC, A. Uma revisão abrangente sobre a valorização de resíduos industriais agroalimentares por fermentação em estado sólido. **Alimentos**, v. 10, n. 5, p. 927, 2021.

STOFFEL, F.; SANTANA, W.O.; GREGOLON, J.G.N.; KIST, T.B.L.; FONTANA, R.C.; & CAMASSOLA, M. Production of edible mycoprotein using agroindustrial wastes: Influence on nutritional, chemical and biological properties. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 58, 102227, 2019.

STRONG, P.J.; SELF, R.; ALLIKIAN, K.; SZEWCZYK, E.; SPEIGHT, R.; O'HARA, I.; & HARRISON, M.D. Filamentous fungi for future functional food and feed. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 76, p. 102729, 2022.

SUN, X.; TIFFANY, D.G.; URRIOLOA, P.E.; SHURSON, G.G.; & HU, B. Nutrition upgrading of corn-ethanol co-product by fungal fermentation: Amino acids enrichment and anti-nutritional factors degradation. **Food and Bioproducts Processing**, v. 130, p. 1-13, 2021.

TILLEY, J.M.A.; & TERRY, R.A. A two-stage technique for the in vitro digestion of forage crops. **Grass and forage science**, v. 18, n. 2, p. 104-111, 1963.

WANG, M.; YIN, H.; PEENG, H.; FENG, M.; LU, G.; & DANG, Z. Degradation of 2,2',4,4'-tetrabromodiphenyl ether by *Pycnoporus sanguineus* in the presence of copper ions. **Journal of Environmental Sciences**, v. 83, p. 133-143, 2019.

XU, S.; LI, F.; GAO, J.; ZHOU, X.Y.; LI, M.; LI, L.; HUI, C.; ZHANG, S.; LIU, K.; KONG, W.; LI, Y.; & LI, C. Low GHG emissions and less nitrogen use in mushroom-based protein production from chitin-containing waste and cottonseed hull with two phase SSF. **Industrial Crops and Products**, v. 201, 116970, 2023.

YAFETTO, L.; ODAMTTEN, G.T.; & WIAFE-KWAGYAN, M. Valorization of agro-industrial wastes into animal feed through microbial fermentation: A review of the global and Ghanaian case. **Heliyon**, v. 9, ed. 4, e14814, 2023.

YU, J.; LIU, X.; GUAN, L.; JIANG, Z.; YAN, Q.; & YANG, S. High-level expression and enzymatic properties of a novel thermostable xylanase with high arabinoxylan degradation ability from *Chaetomium* sp. suitable for beer mashing. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 168, p. 223-232, 2021.

ZHOU, J.M. The effect of different C/N ratios on the composting of pig manure and edible fungus residue with rice bran. **Compost Science & Utilization**, v. 25, n. 2, p. 120-129, 2017.

CAPÍTULO III

Biotransformação de resíduos agroindustriais por cultivo em estado sólido de *Thermoascus aurantiacus*: Produção e caracterização bioquímica de enzimas fibrolíticas e análise bromatológica

Asser Botelho Santana, Gabriela Finoto Cavalheiro, Luiz Henrique Bovi de Quadros, Caroline Pereira Moura Aranha, Marcelo Fossa da Paz, Rodrigo Simões Ribeiro Leite

RESUMO

Os resíduos agroindustriais são fontes sustentáveis para produção de diversos bens e serviços de alto valor agregado, contudo, a gestão inadequada desses resíduos pode resultar em danos ao meio ambiente. O cultivo em estado sólido de fungos filamentosos mostra-se uma opção sustentável para biotransformação desses rejeitos. Este trabalho teve por objetivo analisar a produção e a caracterização bioquímica de endoglucanase, β -glicosidase, xilanase e pectinase (enzimas fibrolíticas) produzidas por *Thermoascus aurantiacus* empregando farelo de trigo e bagaço de cana-de-açúcar (50:50%) como substratos, bem como o perfil bromatológico e a digestibilidade do substrato após o cultivo por 5, 10 e 15 dias. As maiores produções de endoglucanase, β -glicosidase e pectinase foram em 72 horas ($181,40 \text{ U.g}^{-1} \pm 0,74$, $73,09 \text{ U.g}^{-1} \pm 2,01$ e $168,39 \text{ U.g}^{-1} \pm 1,27$), xilanase em 144 horas ($2027,77 \text{ U.g}^{-1} \pm 47,69$). As enzimas exibiram valores próximos de pH ótimo variando de 3,5 a 5,5. As temperaturas ótimas abrangeram a faixa de 60 °C a 80 °C. As enzimas foram estáveis em uma ampla faixa de pH, e 80% das suas atividades originais foram mantidas quando incubadas por 1 hora a 70°C. O fungo enriqueceu o substrato com proteínas (8,8%) e carboidratos (19,26%). O decaimento de fibras foi de 23,54%. O teor lipídico apresentou um acúmulo de 0,16% ao 5º dia de cultivo, seguido de um decaimento de 0,19% ao 10º dia. Para a digestibilidade, houve um aumento total de 3,18% ao 15º dia de cultivo. O fungo termófilo *T. aurantiacus* produziu enzimas fibrolíticas estruturalmente estáveis e em reduzido tempo de cultivo, além de elevar o teor proteico e digestibilidade do substrato, demonstrando características favoráveis para aplicações na alimentação animal.

Palavras-chave: termoestabilidade; ascomiceto; bagaço de cana-de-açúcar; farelo de trigo.

Biotransformation of agro-industrial residues by solid state cultivation of *Thermoascus aurantiacus*: Production and biochemical characterization of fibrolytic enzymes and bromatological analysis

Asser Botelho Santana, Gabriela Finoto Cavalheiro, Luiz Henrique Bovi de Quadros, Caroline Pereira Moura Aranha, Marcelo Fossa da Paz, Rodrigo Simões Ribeiro Leite

Abstract

Agro-industrial waste is a sustainable source for the production of various goods and services with high added value, however, inadequate management of this waste can result in damage to the environment. The solid-state cultivation of filamentous fungi proves to be a sustainable option for biotransforming these wastes. This work aimed to analyze the production and biochemical characterization of endoglucanase, β -glucosidase, xylanase and pectinase (fibrolytic enzymes) produced by *Thermoascus aurantiacus* using wheat bran and sugarcane bagasse (50:50%) as substrates, as well as the bromatological profile and digestibility of the substrate after cultivation for 5, 10 and 15 days. The highest productions of endoglucanase, β -glucosidase and pectinase were in 72 hours (181.40 U.g⁻¹±0.74, 73.09 U.g⁻¹±2.01 and 168.39 U.g⁻¹±1.27), xylanase in 144 hours (2027.77 U.g⁻¹±47.69). The enzymes exhibited values close to optimum pH ranging from 3.5 to 5.5. The optimum temperatures ranged from 60 °C to 80 °C. The enzymes were stable over a wide pH range, and 80% of their original activities were maintained when incubated for 1 hour at 70°C. The fungus enriched the substrate with proteins (8.8%) and carbohydrates (19.26%). Fiber decay was 23.54%. The lipid content showed an accumulation of 0.16% on the 5th day of cultivation, followed by a decline of 0.19% on the 10th day. For digestibility, there was a total increase of 3.18% on the 15th day of cultivation. The thermophilic fungus *T. aurantiacus* produced structurally stable fibrolytic enzymes in a reduced cultivation time, in addition to increasing the protein content and digestibility of the substrate, demonstrating favorable characteristics for applications in animal feed.

Key-words: thermostability; ascomycete; sugarcane bagasse; wheat bran.

1. INTRODUÇÃO

Os resíduos agroindustriais são alternativas de matérias primas renováveis e sustentáveis para produção de fármacos, biopolímeros, pigmentos, compostos bioativos, enzimas, biocombustíveis e para utilização na nutrição e alimentação animal (YAFETTO, ODAMTTEN & WIAFE-KWAGYAN, 2023). Entretanto, o manejo inadequado desses materiais pode ocasionar distúrbios no meio ambiente, afetando a biodiversidade e seu equilíbrio ecológico (NAIR, AGRAWAL e VERMA, 2022; MISHRA *et al.*, 2023).

O cultivo em estado sólido (CES) utiliza resíduos agroindustriais possibilitando a biotransformação desses subprodutos em produtos com alto valor agregado e com baixo impacto ambiental (MISHRA *et al.*, 2023). Essa técnica de cultivo traz vantagens como maior concentração do produto de interesse, menor risco de contaminação por bactérias e economia para a indústria (BERENJAN e EHSAN, 2023).

Esse sistema de cultivo fornece condições ambientais perfeitas para o desenvolvimento de fungos filamentosos, propiciando a biotransformação dos substratos para obtenção de energia para seu desenvolvimento. Com elevada taxa de biodegradação, os resíduos agroindustriais são utilizados em CES resultando em uma redução de até 50% nos custos de bioprocessos, sendo matérias-primas de alta disponibilidade (VANDENBERGHE *et al.*, 2020).

A biotransformação da biomassa vegetal necessita da ação de diferentes complexos enzimáticos e com múltiplas especificidades para desorganizar a parede celular vegetal de forma eficiente (BOYCE e WALSH, 2015). Deste modo, as enzimas fibrolíticas, como: celulasas, hemicelulasas, pectinases e ligninases, agem de forma sinérgica em seus respectivos polímeros com a função de desconstrução efetiva deste material (OBENG *et al.*, 2017).

O fungo termófilo *Thermoascus aurantiacus* possui a capacidade de crescer em ambientes com temperaturas entre 40 °C a 60 °C, tais como: pilhas de compostagem, material vegetal em decomposição e solo enriquecido com matéria orgânica. Esta espécie é relatada como uma notável produtora de enzimas lignocelulósicas com elevada estabilidade estrutural (DADWAL, SHARMA e SATYANARAYANA, 2021).

Seus complexos enzimáticos foram amplamente estudados para aplicações em processos biotecnológicos como: produção de xilooligossacarídeos para crescimento de bactérias probióticas (NASCIMENTO *et al.*, 2022), aumento da qualidade de pães e derivados (OLIVEIRA *et al.*, 2014), pré-tratamento de bagaço de cana-de-açúcar para produção de bioetanol (PANG *et al.*, 2016).

Neste sentido, o presente trabalho teve por objetivo analisar a produção e a caracterização bioquímica de endoglucanase, β -glicosidase, xilanase e pectinase (enzimas fibrolíticas)

produzidas por cultivo em estado sólido do fungo filamentosso *T. aurantiacus* e as biotransformações nutricionais dos resíduos ao longo do crescimento fúngico.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Produção enzimática

2.1.1. Microrganismos

Foi utilizado o fungo *T. aurantiacus* pertencente a micoteca do Laboratório de Enzimologia e Processos Fermentativos (LEPFER/UFGD), isolado de serapilheira de um fragmento de Mata Atlântica Semidecidual (Mata do Azulão) localizado em Dourados, Mato Grosso do Sul, Brasil sendo identificado pelo Laboratório de Ecologia e Sistemática Fúngica do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista, IB/UNESP Rio Claro, Estado de São Paulo, Brasil.

2.1.2. Produção de inóculo

O fungo foi cultivado em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL do meio *Ágar Sabouraud Dextrose*, mantido pelo período de 96 horas a 45 °C. A suspensão do fungo foi obtida pela raspagem suave da superfície do meio de cultura empregando 30 mL de solução nutriente (0,1% de sulfato de amônio, 0,1% sulfato de magnésio hepta-hidratado e 0,1% nitrato de amônia). A inoculação do fungo no substrato (resíduos agroindustriais) se deu pela transferência de 5 mL desta suspensão (COSTA *et al.*, 2019).

2.1.3. Cultivo em estado sólido para produção de celulasas, hemicelulasas e pectinases

O substrato para o cultivo foi composto (50%:50%) de farelo de trigo e bagaço de cana-de-açúcar. Os substratos utilizados foram previamente sanitizados, sendo posteriormente secos a 50 °C por 48 horas. A combinação de substratos (2,5 g de farelo de trigo e 2,5 g de bagaço de cana-de-açúcar) foi colocada em frascos Erlenmeyer de 250 mL e umedecidos com 4,5 mL de solução nutriente (descrita anteriormente), seguindo para esterilização em autoclave (20 min, 121 °C, 1 atm). Foram adicionados aos resíduos agroindustriais 5 mL da solução inóculo, em seguida os frascos foram mantidos a 45 °C. Deste modo, a umidade foi fixada em 65%, temperatura em 45 °C, amostras foram retiradas a cada 24 horas, totalizando 168 horas de cultivo. Todos os ensaios foram realizados em triplicata, e os valores descritos representaram as respectivas médias (COSTA *et al.*, 2019).

2.1.4. Extração de enzimas

O extrato enzimático foi obtido pela adição de 50 mL de água destilada nos frascos Erlenmeyer contendo o resíduo miceliado, seguido de maceração por 10 min. Posteriormente, os frascos foram agitados por 1 hora a 150 rpm. As amostras foram filtradas em tecido de poliamida (nylon) e centrifugadas a $1500 \times g$ por 10 min. O sobrenadante foi usado para os ensaios subsequentes (COSTA *et al.*, 2019).

2.1.5. Determinação da atividade enzimática

As atividades de endoglucanase (carboximetilcelulase-CMCase), xilanase e pectinase foram quantificadas usando como substrato 3% de carboximetilcelulose (CMC - C5678; Sigma-Aldrich), 1% de xilana (Beechwood, Sigma-Aldrich) e 1% de pectina (Vtec), respectivamente. Os açúcares redutores liberados pela ação enzimática foram quantificados pelo método ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) (MILLER, 1959). A atividade de β -glicosidase foi mensurada com o substrato sintético p-NP- β -D-glucopiranosídeo 4 mM (Sigma-Aldrich) (PEREIRA *et al.*, 2015). Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μ mol de produto por minuto de reação.

2.2. Caracterização bioquímica

2.2.1. Efeito do pH e da temperatura na atividade de celulasas hemicelulasas e pectinases

O pH ótimo foi determinado pela quantificação da atividade enzimática a 50 °C em diferentes valores de pH (3,0-8,0) usando tampão McIlvaine (0,1M). A temperatura ótima foi determinada pela atividade das enzimas variando a temperatura de 30 a 90 °C no pH ideal para a atividade enzimática. A estabilidade do pH foi quantificada incubando as enzimas por 24 h em diferentes valores de pH a 25 °C usando os tampões McIlvaine 0,1 M (3,0-8,0), Tris-HCl 0,1 M (8-8,5) e glicina-NaOH 0,1 M (8,5-10,5). A termoestabilidade foi analisada incubando as enzimas por 1 hora em diferentes temperaturas de 30 a 80 °C. As atividades residuais foram mensuradas sob condições ótimas de cada enzima (COSTA *et al.*, 2016).

2.3. Bioconversão de resíduos agroindustriais por microrganismos

2.3.1. Preparo das amostras

Foram preparados sacos de polietileno resistentes a autoclavagem com as dimensões 15 cm \times 30 cm contendo farelo de trigo e bagaço de cana-de-açúcar na proporção 10 g:10 g (50%:50%) 18 mL de solução nutriente (0,1% de sulfato de amônio, 0,1% sulfato de magnésio

hepta-hidratado e 0,1% nitrato de amônia). Os sacos foram fechados com tampões de algodão, para possibilitar as trocas gasosas e foram esterilizados em autoclave a 121 °C por 20 min (PAZ *et al.*, 2013).

2.3.2. Inoculação e crescimento micelial

O microrganismo *T. aurantiacus* foi cultivado em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL do meio *Ágar Sabouraud Dextrose*, mantido por um período de 48 horas a 45 °C. O inóculo foi obtido pela raspagem suave da superfície do meio de cultura empregando 30 mL de solução nutriente descrita anteriormente. A inoculação do fungo no substrato (resíduos agroindustriais) se deu pela transferência de 20 mL desta suspensão. Os cultivos foram mantidos a 45 °C, amostras foram retiradas ao 5º, 10º, e 15º dia de cultivo e análises bromatológicas realizadas para avaliar as transformações decorrentes do crescimento fúngico.

2.4. Análises Bromatológicas

2.4.1. Umidade e Sólidos Totais

Para determinação de umidade, cadinhos de alumínio com 6g das amostras quarteadas, foram postos em estufa com circulação de ar a 105 °C por 24 horas. Após esse período o conjunto cadinho + amostra seca foram posteriormente pesados. Os valores de umidade em base úmida e sólidos totais foram obtidos pelas equações:

Amostra

$$Eq.1 M_{am} = M_{am} + S_{seco}$$

Umidade em base úmida

$$Eq.2 U_{BU} (\%) = ((M_{am} - M_f) / M_{am}) * 100$$

Onde: U_{BU} : umidade em base úmida; M_{am} : massa da amostra (g); M_f : massa da amostra depois de seca (g); $M_{água}$: quantidade de água retirada durante a secagem (g) e S_{seco} : matéria seca (ou sólido seco) contida na amostra (g).

Os valores de sólidos totais foram obtidos pela diferença entre a massa total da amostra úmida e a massa de água evaporada após a secagem em estufa (SANJINEZ-ARGANDOÑA *et al.*, 2017).

2.4.2. Proteínas

Os teores de proteínas foram obtidos segundo o método Kjeldahl, em três etapas Na 1ª etapa (Digestão) foi adicionado 7 mL de solução digestora (2 g de selenito de sódio, 4 g de

sulfato de cobre, 21,4 g de sulfato de sódio, 175 mL de água destilada e 200 mL de ácido sulfúrico) e digeriu-se 0,1 g da amostra em bloco digestor à 350 °C até coloração verde; Na 2ª etapa (Destilação) o tubo digestor foi conectado ao destilador de nitrogênio e adicionado 20 mL de NaOH 40% (80 g de NaOH e 200 mL de água destilada), em um Erlenmeyer de 125 mL foi adicionado 10 mL de solução receptora de ácido bórico 4,2 % (42 g de ácido bórico e 1000 mL de água destilada) + 3 gotas de solução indicadora (0,25 g de verde de bromocresol, 0,25 g de vermelho de metila e 250 mL de álcool etílico) e destilou-se a amostra até recolher 70 ml; A 3ª etapa (Titulação) a solução titulada foi acrescida a solução de ácido sulfúrico 0,1 N (3 mL de ácido sulfúrico e 1000 mL de água destilada) sob agitação até a obtenção de uma coloração lilás. Os valores do conteúdo de nitrogênio e proteico foram obtidos pelas equações:

$$Eq.3 N (\%) = ((V_{H_2SO_4} * N_{H_2SO_4} * 0,014 * f) / M_{am}) * 100$$

$$Eq.4 Proteínas (\%) = N (\%) * F_p$$

Onde: **N**: teor de nitrogênio contido na amostra (%); **V_{H₂SO₄}**: volume de ácido sulfúrico gasto na titulação (mL); **N_{H₂SO₄}**: normalidade do H₂SO₄; **f**: fator dado para correção da solução de H₂SO₄ (1,0095) e **F_p**: fator usado para conversão das proteínas (6,25) (SANJINEZ-ARGANDOÑA *et al.*, 2017).

2.4.3. Lipídeos

Para quantificação do teor lipídico, 2,5 g das amostras secas foram colocadas em pequenos pacotes de papel e depositados nos tubos extratores. A extração contínua foi realizada por 6 horas a 50 °C com 200 mL de hexano. O *reboiler* foi retirado do tubo extrator e seco em estufa de circulação de ar a 105 °C por 2 horas, resfriado em dessecador e pesado. Os valores do teor lipídico foram obtidos pela equação:

$$Eq.5 Lipídeos (\%) = ((M_R - M_r) / M_{am\ seca}) * (100 - U_{BU}(\%))$$

Onde: **M_R**: massa da *reboiler* com lipídeos (g); **M_r**: massa do *reboiler* (g); **M_{am}**: massa da amostra previamente seca (g) e **U_{BU}**: umidade da amostra em base úmida (%) (SANJINEZ-ARGANDOÑA *et al.*, 2017).

2.4.4. Fibra Bruta

Para determinação do teor de fibra bruta das amostras sacos extratores de Tecido-Não-Tecido (TNT) foram lavados em acetona (P.A.) por 5 min, sendo secos a 105 °C por 1 hora e 30 min. Cerca de 0,5 g das amostras foram colocados nos sacos extratores e lavadas em 3 L de H₂SO₄ a 1,5% (v/v) a 98 °C por 30 min e posteriormente em 3 L de NaOH a 1,5% (p/v).

Transcorrido o processo de lavagem, os sacos foram lavados em acetona (P.A.) em seguida foram postos para secagem completa em estufa com circulação de ar a 70 °C por 24 horas e pesados posteriormente. O teor de fibras das amostras foi calculado pela equação:

$$Eq.6 F_{Bruta} (\%) = ((M_{am} - M_f) / M_{am}) * 100$$

Onde: **F_{Bruta}**: conteúdo de fibra bruta (%); **M_{am}**: massa da amostra (g) e **M_f**: massa da amostra após o processo de secagem (g) (SANJINEZ-ARGANDOÑA *et al.*, 2017).

2.4.5. Carboidratos

A obtenção dos valores referentes aos teores de carboidratos não-fibrosos deu-se pela equação:

$$Eq.7 Carboidratos (\%) = 100 - (\%Cin - \%Lip - \%Prot - \%FB)$$

Onde: **Cin**: porcentagem de cinzas da amostra; **Lip**: porcentagem de lipídeos da amostra; **Prot**: porcentagem de proteínas da amostra e **FB**: porcentagem de fibras brutas da amostra (SANJINEZ-ARGANDOÑA *et al.*, 2017).

2.4.6. Cinzas

O teor de cinzas contido nas amostras foi quantificado segundo a metodologia descrita por Sanjinez-Argandoña *et al.* (2017). Cerca 2 g de amostra referente a cada triplicata foi colocada em cadinhos de porcelana previamente secos. Em seguida foram postos para queima total em mufla a temperatura de 550 °C até o material carbonizado atingir uma coloração esbranquiçada, indicando a queima total da matéria orgânica presente.

$$Eq. 8 Cinzas (\%) = (M_c / M_{am}) * 100$$

Onde: **M_c**: massa de cinzas (g) valor obtido pelo calcula da diferença entre a massa do cadinho com cinzas e a massa do cadinho vazio; **M_{am}**: massa da amostra posta para queima (g).

2.4.7. Digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS)

A metodologia aplicada para determinação da digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS) foi descrita por Tilley & Terry (1963) e alterada por Holden (1999), utilizando-se rúmen artificial (DAISY). Os substratos pesados (0,5 g) foram colocados em saquinhos de TNT (5,0 × 5,0 cm TNT 100 g/cm²) conforme indicação de Casali *et al.* (2009). Os saquinhos foram dispostos em jarros contendo 1,600 mL de solução tampão e 400 mL de inóculo ruminal. Os jarros foram incubados por 48 horas a 39 °C sob agitação contínua. Após a incubação, os

saquinhos foram submetidos a análise de fibra em detergente neutro (FDN), conforme Mertens (2002), com modificações, sendo elas o uso de autoclave e sem sulfito de sódio.

Os valores para o teor de cinzas foram obtidos pela equação:

$$Eq. 9 \text{ DIVMS (\%)} = 100 - [(W_3 - (W_1 \times F)) \times 100 / W_2]$$

Onde: **W1**: peso (g) da tara do saquinho (vazio); **W2**: peso (g) da amostra; **W3**: peso do conjunto saquinho + amostra após 48 fermentação ruminal (Daisy) e determinação FDN; **F**: peso do saquinho em branco (peso final (g) do saquinho em branco após decorrido todo o processo/W4) e **W4**: peso do saquinho em branco antes da incubação.

2.5. Análise Estatística

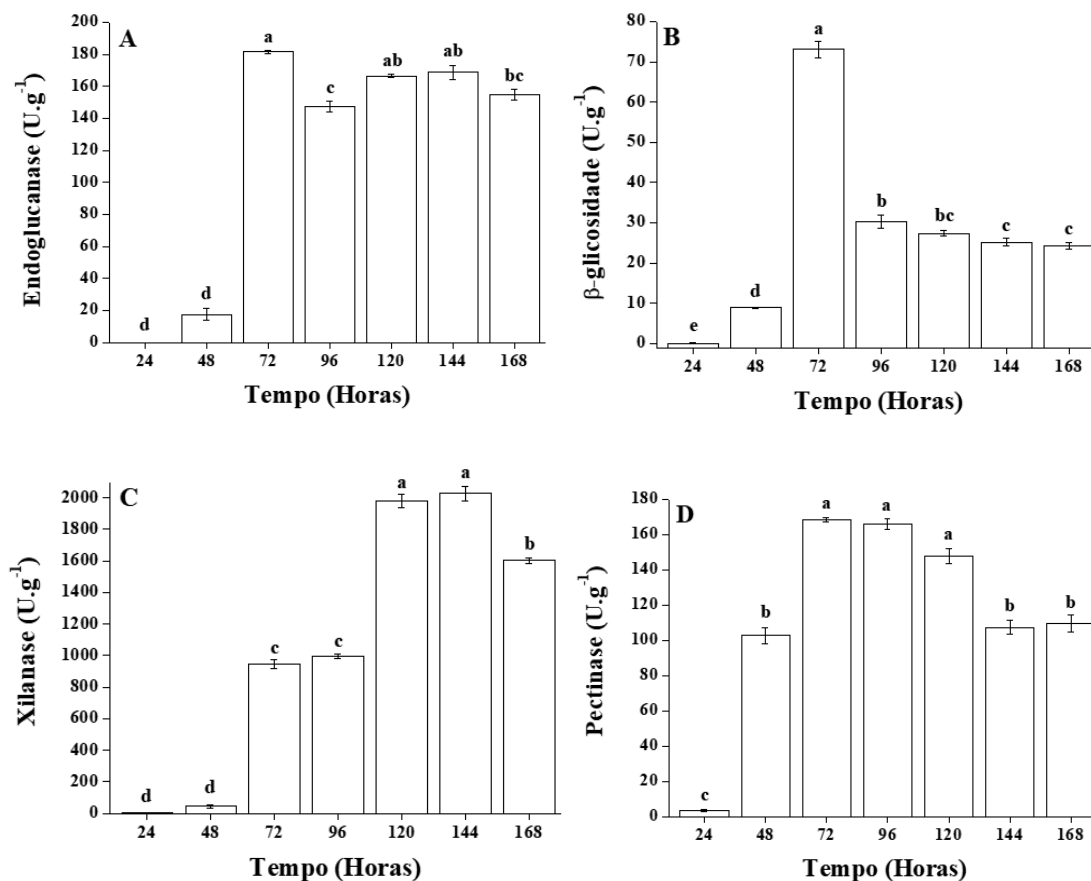
Todos os experimentos foram realizados em triplicata, e os resultados apresentados como a média de três ensaios independentes com seu padrão e desvios. As análises estatísticas dos dados incluíram uma ANOVA de uma via, seguido do teste de Tukey com 5% de significância.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Produção enzimática de enzimas fibrolíticas

As maiores produções de endoglucanase, β -glicosidase e pectinase foram observadas as 72 horas de cultivo, cerca de 181,40 U.g⁻¹, 73,09 U.g⁻¹ e 168,39 U.g⁻¹ respectivamente (Figura 1A, 1B e 1D). A maior produção de xilanase, 2027,77 U.g⁻¹, foi alcançada em 144 horas (Figura 1C).

Figura 1 - Produção de Endoglucanase (A), β -glicosidase (B), Xilanase (C) e Pectinase (D) pelo fungo *T. aurantiacus* em função do tempo de cultivo em farelo de trigo e bagaço de cana-de-açúcar (50%:50%) a 45 °C, contendo 65% de umidade (as barras de erro representam o desvio padrão médio da determinação em triplicata).



*Os valores seguidos pelas mesmas letras não diferem entre si, teste de Tukey (p<0,05).

Massarente *et al.* (2020) encontraram uma produção máxima 22,2 U.g⁻¹ de endoglucanase com 72 horas de cultivo do fungo termófilo *Myceliophthora thermophila* em CES utilizando uma combinação de bagaço de cana-de-açúcar e farelo de trigo como substrato. Costa *et al.* (2019) verificaram que o fungo *Trichoderma piluliferum* produziu 36,4 U.g⁻¹ de endoglucanase e 617,8 U.g⁻¹ de xilanase, enquanto que *Trichoderma viride* alcançou uma produção de 301,8 U.g⁻¹ de endoglucanase e 53,0 U.g⁻¹ de xilanase, utilizando farelo de trigo como substrato.

Rosa-Garzon *et al.* (2022) observaram maior produção enzimática pelo fungo *Myceliophthora thermophila* em farelo de trigo, sendo 3262,6 U.g⁻¹ em 24 horas pra endoglucanase, 178,4 U.g⁻¹ em 72 horas para β -glicosidase, 4105 U.g⁻¹ em 24 horas pra xilanase e 309,9 U.g⁻¹ em 48 horas para pectinase.

A qualidade e a composição dos resíduos agroindustriais utilizados no CES influenciam diretamente a produção enzimática do microrganismo (VANDENBERGHE *et al.*, 2020). O

farelo de trigo em sua composição química apresenta uma alta quantidade de amido, proteína, pectina, açúcares, sais minerais, aminoácidos e outros (ROSA-GARZON *et al.*, 2022). Fornecendo ao microrganismo elementos essenciais ao seu metabolismo, quando empregado no CES, resulta em elevadas produções enzimáticas, fato este que o torna o resíduo amplamente empregado para produção de enzimas fibrolíticas (LIN *et al.*, 2022; SANTOS *et al.*, 2018).

Considerando a aplicação de enzimas em processos industriais, a produção de enzimas microbianas em reduzido espaço de tempo, é uma característica apreciada. Isso se deve ao fato de que a otimização do processo de produção enzimática resulta na diminuição dos gastos operacionais, o que por consequência, contribui para o aumento da rentabilidade e da eficácia do processo biotecnológico ao qual é direcionado (FENG *et al.*, 2021; GAUNA *et al.*, 2018). Essa característica pode ser detectada para as enzimas avaliadas no presente trabalho, que apresentaram suas máximas produções entre 72 e 120 horas de cultivo, o que favorece o emprego desses biocatalizadores em processos industriais.

3.2. Caracterização bioquímica das enzimas produzidas

Com relação a atividade ótima, endoglucanase, β -glicosidase e xilanase apresentaram maior potencial catalítico em pH 5,5; 4,5 e 5, respectivamente. A enzima pectinase demonstrou o pH ótimo mais ácido, tendo seu pico de atividade em pH 3,5 (Tabela 1). Quanto às características de temperatura ótima, β -glicosidase e xilanase demonstraram sua máxima atividade a 75 °C. A pectinase, atingiu sua temperatura ótima a 60 °C, e a endoglucanase apresentou atividade ótima na temperatura mais elevada, 80 °C (Tabela 1).

Tabela 1 – Caracterização bioquímica de Endoglucanase, β -glicosidase, Xilanase e Pectinase produzidas pelo fungo *T. aurantiacus* em farelo de trigo e bagaço de cana-de-açúcar (50%:50%) a 45 °C, contendo 65% de umidade

Enzimas	pH ótimo	Temperatura ótima (°C)	pH de Estabilidade	Temperatura de Estabilidade (°C)
Endoglucanase	5,5	80	3,0 - 9,5	30 - 65
β -glicosidases	4,5	75	4,0 - 8,0	30 - 70
Xilanases	5	75	3,0 - 11,0	30 - 75
Pectinases	3,5	60	4,5 - 7,0	30 - 45

As enzimas produzidas por *T. aurantiacus* avaliadas no presente estudo demonstram características bioquímicas similares com as descritas na literatura. Almeida *et al.* (2022), estudaram a xilanase do fungo *Humicola brevis* var. *thermoidea* destacaram uma atividade ótima

para pH e temperatura de 5,5 e 70 °C. Omeje *et al.* (2023), relataram maior atividade catalítica da pectinase produzida por *Aspergillus aculeatus* em pH 5,5 a 40 °C.

A determinação de pH e temperatura ótima na catálise enzimática, é fundamental para o emprego de enzimas em processos industriais, que atue no processo de forma eficiente (LEONE, 2021).

Com relação ao pH de estabilidade, endoglucanase e β -glicosidase conservaram 80% da sua atividade inicial no intervalo de 3,0 a 9,5 e 4,0 a 8,0, respectivamente. Xilanase e pectinase mantiveram acima de 80% de atividade catalítica na faixa de pH 3,0 a 11,0 e 4,5 a 7,0, respectivamente (Tabela 1). Em relação a termoestabilidade, endoglucanase e β -glicosidase conservaram 80% da sua atividade inicial entre 30 a 65 °C e 30 a 70 °C, respectivamente (Tabela 1). Para xilanase e pectinase, a termoestabilidade foi mantida entre 30 a 75 °C e 30 a 45 °C, respectivamente, restando mais de 80% da atividade inicial.

Nisar *et al.* (2022) estudaram endoglucanase e β -glicosidase de *Thermomyces dupontii*, ambas as enzimas apresentaram 75% da atividade inicial na faixa de pH 4 a 6, para a temperatura de estabilidade, endoglucanase e β -glicosidase retiveram acima de 70% da atividade inicial quando incubadas em temperaturas que variaram de 40 a 80 °C.

Sanguine *et al.* (2022) relataram que as xilanases de *Trichoderma koningii* e *Trichoderma pseudokoningii* conservaram acima de 75% da sua atividade inicial, quando incubadas de pH 3,0 a 9,5 por 24 horas. Em relação a temperatura de estabilidade, os autores evidenciaram que a xilanase de *T. koningii* manteve sua estabilidade durante 1 hora a 45 °C, enquanto a enzima de *T. pseudokoningii* permaneceu estável até 50 °C, restando cerca de 83% de sua atividade catalítica após o tratamento térmico de 1 hora.

Ezeh *et al.* (2023) observaram que a pectinase produzida por *Yarrowia phangngaensis* mantiveram 70% da atividade original quando incubadas na faixa de pH de 4 a 6, perdendo grande parte de sua atividade acima de pH 7. Para a temperatura de estabilidade, a pectinase conservou sua estabilidade em um intervalo de temperatura entre 20 e 50 °C, preservando mais de 90% de sua atividade inicial. No entanto, a 60 °C, ocorreu uma redução de aproximadamente 40% em sua atividade inicial.

A estabilidade estrutural de uma enzima é essencial para sua aplicação em processos industriais. Enzimas estáveis são mais confiáveis e adequadas para processos industriais, reduzindo custos e permitindo aplicações em larga escala na obtenção de produtos químicos, biocombustíveis, tratamento de resíduos e alimentos (DADWAL, SHARMA & SATYANARAYANA, 2021).

Deste modo, as características observadas para as enzimas produzidas pelo *T. aurantiacus*, indicam potencial para aplicações biotecnológicas em diferentes processos industriais.

3.3. Análises bromatológicas

Os conteúdos de umidade e sólidos totais (matéria seca) observados no começo do cultivo, mantiveram-se contantes ao longo de todo o cultivo. Os valores para umidade e sólidos totais permaneceram em cerca de 68% e 31% respectivamente, sendo estes valores estatisticamente similares ao grupo controle em ambas as variáveis analisadas (Tabela 2).

Nos estágios finais de cultivo foi possível observar um aumento total de 8,8% no teor de proteínas, sendo observado no decorrer do processo de cultivo um crescente aumento de proteínas e o acúmulo máximo foi alcançado no 15º dia de cultivo, com um total de 14,56%, diferenciando-se estatisticamente do grupo controle que apresentou um valor de 5,76% de proteínas (Tabela 2).

Devido o potencial de secretar enzimas fibrolíticas, os fungos filamentosos possuem a capacidade de decompor resíduos agroindustriais heterogêneos, originando matérias com diferentes quantidades proteicas. Ao estudarem a metabolização de vinhaça de cana-de-açúcar por *Aspergillus* sp., destinado a alimentações de peixes, Rulli *et al.* (2021) observaram que após 4 dias de cultivo houve um aumento de 2,9% no teor proteico quando comparado ao grupo controle. Sardar *et al.* (2017) evidenciaram um acréscimo acima de 20% no teor de proteínas pelo CES do fungo *Pleurotus eryngii* em bagaço de cana de açúcar. Paynor, David e Valentino (2016) destacaram que o cultivo de *Cladosporium cladosporioides* sobre sabugo de milho, por um período de 20 dias, resultou em um aumento de 3,23% no teor de proteína bruta.

A diferença na produção de proteína por fungos filamentosos está na grande diversidade de parâmetros em que esses microrganismos são cultivados. Dentre variáveis que condicionam a produção de proteínas fúngicas, é possível destacar: complexidade do substrato, temperatura e tempo do cultivo. Deste modo, os níveis de proteína presentes serão influenciados não somente pelas características intrínsecas do microrganismo, mas também pelas propriedades do substrato e pelas condições de cultivo (LINDER, 2019; XU *et al.*, 2023; RULLI *et al.*, 2021).

O acréscimo no conteúdo proteico está associado ao processo de crescimento fúngico sobre o substrato. As proteínas desempenham um papel essencial na estrutura e funcionalidade das células fúngicas, sendo cruciais para a síntese de novas células, enzimas e outras moléculas de importância biológica. A síntese de proteínas a partir dos nutrientes presentes no substrato

contribui diretamente para o crescimento e reprodução fúngica (SARDAR *et al.*, 2019; LINDER, 2019).

Quando relacionada a nutrição de animais ruminantes, o incremento de matérias-primas com alto valor proteico, contribuem com o processo de fermentação ruminal das fibras alimentares por parte dos microrganismos do rúmen, além de favorecer o crescimento e desenvolvimento fisiológico animal. O emprego de rações com elevadas concentrações de proteína resultam em ganho de peso, aumento na produção do leite e melhora nas características organolépticas da carne e leite (SALAMI *et al.*, 2019; BERCHIELLI, PIRES e OLIVEIRA, 2006).

Tabela 2 – Análise dos constituintes bromatológicos do cultivo (farelo de trigo e bagaço de cana-de-açúcar) biotransformado por *T. aurantiacus* a temperatura de 45 °C, umidade de 65% no 5°, 10° e 15° dia de cultivo, expressos em porcentagem.

	Controle	5° Dia	10° Dia	15° Dia
Umidade (%)	68,29 a ± 2,34	68,20 a ± 0,53	68,64 a ± 0,59	68,07 a ± 1,16
Sólidos totais (%)	31,70 a ± 2,34	31,79 a ± 0,51	31,69 a ± 0,62	31,93 a ± 1,17
Proteínas (%)	5,76 c ± 0,40	10,01 b ± 0,78	11,21 b ± 0,10	14,56 a ± 0,36
Lipídeos (%)	0,39b ± 0,01	0,55a ± 0,15	0,36c ± 0,06	0,35c ± 0,03
Fibra Bruta (%)	59,78 c ± 0,82	47,70 b ± 0,82	38,33 a ± 0,31	36,24 a ± 0,51
Carboidratos (%)	27,11 c ± 0,06	36,28 b ± 2,08	46,28 a ± 0,45	46,37 a ± 0,58
Cinzas (%)	2,78 b ± 0,23	3,31 ab ± 0,08	3,93 a ± 0,12	3,97 a ± 0,50

*Os valores seguidos pelas mesmas letras não diferem entre si, teste de Tukey (p<0,05).

O teor de fibra bruta foi reduzido em 23,54%, quando comparado com o início do cultivo, evidenciando a ação conjunta das enzimas fibrolíticas produzidas pelo fungo *T. aurantiacus* sobre o substrato (Tabela 2). No 5°, 10° e 15° dia de cultivo, observou-se a diminuição nos teores de fibra, com valores de 47,70%, 38,33% e 36,24%, respectivamente. As análises estatísticas revelaram que não houve diferença no teor de fibra bruta entre 0 10° e 15° dia de cultivo, mas ambos são significativamente distintos do 5° dia. No entanto, todos os pontos analisados ao longo do cultivo mostraram diferença estatística em relação ao grupo controle.

Com relação ao teor lipídico, observou-se um acúmulo substancial de 0,16% no 5° dia de cultivo. No entanto, à medida que o tempo de cultivo avançou, ocorreu uma diminuição média nos valores do teor lipídico, em cerca de 0,04%, no 5° e 10° dias de cultivo, em comparação com o grupo controle, que inicialmente apresentava um valor de 0,39% para essa variável. Importante ressaltar que todos os períodos de cultivo analisados exibiram diferença estatística em relação ao grupo controle (Tabela 2).

Dessa forma, observa-se uma tendência à bioacumulação de lipídios pelo microrganismo, bem como a utilização desses lipídios para o crescimento fúngico. Essa tendência é evidenciada

pela diminuição do teor lipídico do quinto para o décimo dia de cultivo, resultando em uma diferença total de 0,19% entre os pontos amostrados.

Com relação ao teor de carboidratos foi observado um aumento total de 19,26%. No 5º dia de cultivo, a concentração de carboidratos atingiu 36,28%, e manteve-se por volta de 46% para o 10º e 15º dia de cultivo (Tabela 2). Importante notar que esses valores diferiram de maneira significativa do percentual registrado no grupo controle, que totalizou apenas 27,11%.

A elevação observada nos teores de carboidratos pode ser vinculada a ação simultânea das enzimas fibrolíticas sintetizadas pelo fungo *T. aurantiacus*, sobre os polissacarídeos constituintes do substrato. Esses carboidratos são descritos como: glicose, frutose, galactose, frutanas e sacarose (MATOS FILHO; CARVALHO, 2020; LI *et al.*, 2020)

A presença de carboidratos solúveis, incrementa o valor nutricional da biomassa fúngica, pois representam uma excelente fonte de carbono e energia em formulações de rações (RULLI *et al.*, 2021).

Os valores de cinzas aumentaram cerca de 1,19%, comparado ao início do processo de cultivo. O grupo controle não diferenciou-se do 5º dia de cultivo, entretanto, foi diferente estatisticamente do 10º e 15º dia de cultivo apresentando 3,93% e 3,97%, respectivamente (Tabela 2). A fração de cinzas está associada a concentração de resíduos inorgânicos ou resíduo mineral fixo (sódio, potássio, magnésio, cálcio, ferro, fósforo, cobre, cloretos, alumínio, zinco, manganês e outros compostos minerais) restantes após a queima total da matéria orgânica (SANJINEZ-ARGANDOÑA *et al.*, 2017).

Rulli *et al.*, (2021) observaram um aumento de 15,8% para os teores de cinzas na biomassa de *Aspergillus* sp. após 4 dias de cultivo sobre vinhaça de cana-de-açúcar. O incremento de matérias-primas com alto teor de cinzas na alimentação animal deve ser observada com cautela, pois o excesso de minerais pode gerar alterações na formação óssea e articular nos animais (SOONG, RAZAMIN e ROSSHAIKY, 2016).

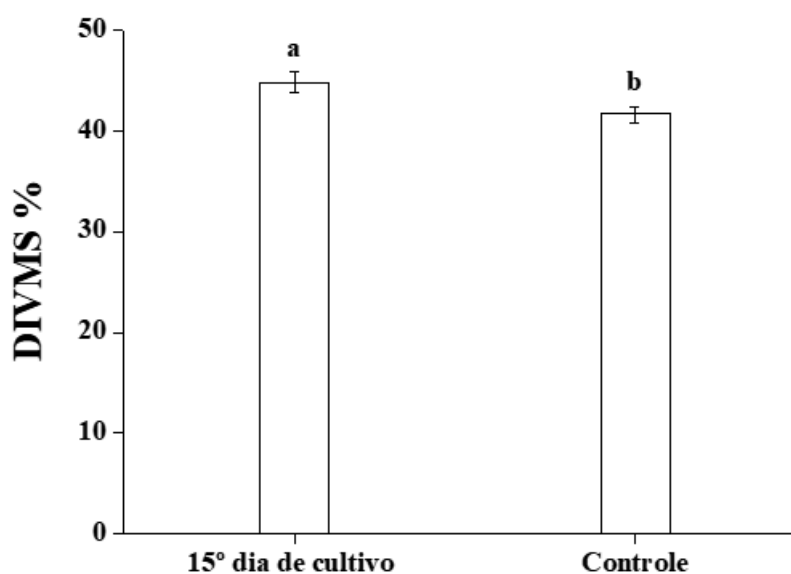
O aporte de alimentos biotransformados por fungos filamentosos na alimentação de animais ruminantes pode ser realizado em até 21% do conteúdo total. A incorporação desses materiais na dieta animal melhora a eficiência da conversão alimentar, equilibra as funções gastrointestinais e proporciona o bem-estar dos animais (MORADZADEH-SOMARIN *et al.*, 2021; STRONG *et al.*, 2022).

As características observadas no presente trabalho como o acréscimo de 8,8% no teor de proteínas, redução de 23,54% da fibra bruta e aumento de 19,26% nos níveis de carboidratos solúveis, habilitam o emprego do substrato miceliado por *T. aurantiacus* como alternativa na alimentação animal, por agregar valor nutricional em materiais de baixo custo.

3.4 Digestibilidade *in vitro* da matéria seca

Para os resultados de DIVMS, nota-se que o fungo *T. aurantiacus* promoveu um aumento de 3,18% na digestibilidade ao 15º dia de cultivo. O grupo controle obteve a média de 41,67% de DIVMS sendo esta variável elevada a 44,85% ao 15º dia de cultivo, ficando estes tratamentos estatisticamente diferentes entre si.

Figura 2 – Digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS%) de bagaço de cana-de-açúcar e farelo de trigo (50%:50%) biotransformados pelo fungo *T. aurantiacus* em CES ao 15º dia a 45 °C, contendo 65% de umidade (as barras de erro representam o desvio padrão médio da determinação em triplicata).



*Os valores seguidos pelas mesmas letras não diferem entre si, teste de Tukey ($p < 0,05$).

No sistema produtivo de animais ruminantes, cerca de 40 a 90% do aporte nutricional é suplementado através de alimentos volumosos. A absorção de nutrientes e energia contida nos alimentos é condicionada a sua degradação enzimática pelas bactérias fermentadoras presentes no rúmen. Contudo, a transformação da biomassa fibrosa com o intuito da produção de leite e carne é pouco eficiente (BERCHIELLI, PIRES e OLIVEIRA, 2006; FAGUNDES *et al.*, 2008).

Assim, os alimentos volumosos miceliados por fungos filamentosos apresentam vantagens para a alimentação animal uma vez que as enzimas fibrolíticas secretadas por esses microrganismos atuam na degradação dos polissacarídeos estruturais, elevando ao aumento da digestibilidade e maior aproveitamento nutricional dos alimentos (FARIA *et al.*, 2022; OKANO *et al.*, 2006).

Faria *et al.* (2022), ao analisarem o CES dos fungos *Pleurotus ostreatus* e *Pleurotus sajor-caju* sobre coprodutos agroindustriais atribuídos a alimentação de animais ruminantes, observaram um acréscimo de 3,7%, 1,79% e 2,23% para farelo de soja, bagaço de cana-de-açúcar e torta de nabo forrageiro respectivamente.

A hidrólise dos carboidratos estruturais, promovida pelas enzimas fibrolíticas secretadas pelo fungo *T. aurantiacus*, é observada pelo decréscimo dos índices de fibra bruta após o período de 15º dias de cultivo (Tabela 2) e conseqüentemente o aumento da DIVMS. As alterações bromatológicas resultantes da ação catalítica das enzimas fibrolíticas sobre a matriz fibrosa das amostras induzem um aumento no emprego dos resíduos agroindustriais, tornando-os uma fonte viável e sustentável para a nutrição animal.

4. CONCLUSÕES

Mediante os resultados alcançados no presente trabalho, pode-se concluir que o fungo ascomiceto *T. aurantiacus* produz enzimas fibrolíticas com reduzido tempo de cultivo, utilizando farelo de trigo e bagaço de cana-de-açúcar como substrato, com destaque para enzimas xilanolíticas.

As enzimas produzidas apresentaram alta estabilidade estrutural, o que favorece a utilização desses biocatalizadores em processos industriais.

O crescimento do fungo *T. aurantiacus* sobre o substrato enriqueceu nutricionalmente os resíduos agroindustriais utilizados no presente trabalho, com destaque para o aumento no teor proteico, redução de fibras e aumento de carboidratos e da DIVMS o que estimula o emprego desse microrganismo em processos de biotransformação, visando a elaboração de ração para animais ruminantes.

5. REFERÊNCIAS

ALMEIDA, A.P.; VARGAS, I.P.; MERCIANO, C.L.; ZANOELO, F.F.; GIANNESI, G.C.; POLIZELI, M.L.T.M.; JORGE, J.A.; FURRIEL, R.P.M.; RULLER, R.; & MASUI, D.C. Investigation of biochemical and biotechnological potential of a thermo-halo-alkali-tolerant endo-xylanase (GH11) from *Humicola brevis* var. *thermoidea* for lignocellulosic valorization of sugarcane biomass. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 44, 102424, 2022.

BERCHIELLI, T.T.; PIRES, A.V.; & OLIVEIRA, S.G. **Nutrição de Ruminantes**. 1ª. ed. Jaboticabal: Funep, 2006. 255-269, p.

BERENJIAN, A.; EHSAN, M. **Special Issue "Novel Processes for Development of Fermentation-Based Products"**. Multidisciplinary Digital Publishing Institute. 2021. Disponível em: < https://www.mdpi.com/si/processes/fermentation_processes>. Acesso em julho de 2023.

BOYCE, A.; WALSH, G. Characterisation of a novel thermostable endoglucanase from *Alicyclobacillus vulcanalis* of potential application in bioethanol production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, n. 18, p. 7515-7525, 2015.

COSTA, A.C.; CAVALHEIRO, G.F.; QUEIROZ, E.R.V.; GANDRA, J.R.; BUSCHINELLI, R.H.D.T. PAZ, M.F.; LEITE, R.S.R. Catalytic properties of xylanases produced by *Trichoderma piluliferum* and *Trichoderma viride* and their application as additives in bovine feeding. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 19, p. 101161, 2019.

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

DADWAL, A.; SHARMA, S.; & SATYANARAYANA, T. Thermostable cellulose saccharifying microbial enzymes: Characteristics, recent advances and biotechnological applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 188, 226-244 p. 2021.

EZEH, N.O.; NWAGU, T.N.T.; AMADI, O.C.; OKOLO, B.; MONEKE, A.; & AGU, R. Extracellular pectinase production from a novel *Yarrowia phangngaensis* XB3 grown on banana waste and its application in fruit juice clarification. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 47, 102614, 2023.

FAGUNDES, N.S.; CAIRES, C.M.; FAGUNDES, N.M.; & BENEDETTI, E. ENZIMAS NA ALIMENTAÇÃO DE RUMINANTES. **Revista Eletrônica Nutritime**, v.5, n° 1, p. 489-494, 2008.

FARIA, P.M.; MUZZI, R.M.; GOES, R.H.T.B.; & GRESSLER, M.G.M. Bioconversão de coprodutos agroindustriais utilizando fungos *Pleurotus ostreatus* e *Pleurotus sajor-caju* para alimentação de ruminantes. **Revista Acadêmica Ciência Animal**, v. 20, 2022.

FENG, M.; ZHOU, J.; YU, X.; WANG, H.; GOU, Y.; & MAO, W. Bioremediation of triphenyl phosphate by *Pycnoporus sanguineus*: Metabolic pathway, proteomic mechanism and biotoxicity assessment. **Journal of Hazardous Materials**, v. 417, 125983, 2021.

GARBIN, A.P.; GARCIA, N.F.L.; CAVALHEIRO, G.F.; SILVESTRE, M.A.; RODRIGUES, A.; PAZ, M.F.; FONSECA, G.G.; LEITE, RODRIGO S.R. β -glucosidase from thermophilic fungus *thermoascus crustaceus*: production and industrial potential. **Anais da academia brasileira de ciências**, 2021.

GAUNA, A.; LARRAN, A.S.; PEROTTI, V.E.; FELDMAN, S.R.; & PERMINGEAT, H.R. Fungal pretreatments improve the efficiency of saccharification of *Panicum prionitis* Ness biomass. **Biofuels**, v. 12, p. 415-421, 2018.

LEONE, F.A. **Fundamentos da Cinética Enzimática**. 1ª ed. Curitiba: Appris, 255-261 p. 2021.

LI, F.; KE, W.; DING, Z.; BAI, J.; ZHANG, Y.; XU, D.; LI, Z.; & GUO, X. Pretreatment of *Pennisetum sinense* silages with ferulic acid esterase-producing lactic acid bacteria and cellulase at two dry matter contents: Fermentation characteristics, carbohydrates composition and enzymatic saccharification. **Bioresource Technology**, v. 295, 122261, 2020.

LIN, D.; MA, Y.; QUI, W.; LOY, A.D.; CHEN, H.; & ZHANG, Q. The structure, properties and potential probiotic properties of starch-pectin blend: A review. **Food Hydrocolloids**, v. 129, 107644, 2022.

- LINDER, D. Making the case for edible microorganisms as an integral part of a more sustainable and resilient food production system. **Food security**, v. 11, n. 2, p. 265-278, 2019.
- MASSARENTE, V.S.; ZANONI, J.A.; GOMES, E.; BONILLA-RODRIGUEZ, G.O. Biochemical characterization of endoglucanases produced by *Myceliophthora thermophila* M.7.7 in solid-state culture. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 27, 101684, 2020.
- MATOS FILHO, H.A.; & CARVALHO, R.D.C.M. Análise de carboidratos solúveis em plantas de arroz. **Científic@-Multidisciplinary Journal**, v. 7, n. 1, p. 1-8, 2020.
- MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.
- MISHRA, B.; MOHANTA, Y.K.; REDDY, C.N.; REDDY, S.D.M.; MANDAL, S.K.; YADAVALLI, R.; & SARMA, H. **Circular Economy**, v. 2, n. 3, 100050, 2023.
- MORADZADEH-SOMARIN, Z.; SEIFDAVAT, J.; YALCHI, T.; ABDI-BENEMAR, H.; SEYEDSHARIF, R.; ELGHANDOUR, M.M.M.Y.; & SALEM, A.Z.M. Valorization of dietary edible mushrooms waste: chemical and physical properties, nutrient digestibility, microbial protein synthesis and nitrogen balance in sheep. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 101, p. 5574-5582, 2021.
- NAIR, L.G.; AGRAWAL, K.; & VERMA, P. An overview of sustainable approaches for bioenergy production from agro-industrial wastes. **Energy Nexus**, v. 6, 100086, 2022.
- NASCIMENTO, C.E.O.; SIMÕES, L.C.O.; PEREIRA, J.C.; SILVA, R.R.; LIMA, E.A.; ALMEIDA, G.C.; PENNA, A.L.B.; BOSCOLO, M.; GOMES, E.; & SILVA, R. Application of a recombinant GH10 endoxylanase from *Thermoascus aurantiacus* for xylooligosaccharide production from sugarcane bagasse and probiotic bacterial growth. **Journal of Biotechnology**, v. 347, 1-8 p. 2022.
- NISAR, K.; ABDULLAHL, R.; KALEEM, A.; IQTEDAR, M.; AFTAB, M.; & SALEEM, F. Purification, characterization and thermodynamic analysis of cellulases produced from *Thermomyces dupontii* and its industrial applications. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 29, ed. 12, 103483, 2022.
- OBENG, E.M.; ADAM, S.NN.; BUDIMAN, C.; ONGKUDON, C.M.; MAAS, R.; JOSE, J. Lignocellulases: a review of emerging and developing enzymes, systems, and practices. **Bioresources and Bioprocessing**, v. 4, n. 1, p. 16, 2017.
- OLIVEIRA, D.S.; TELIS-ROMERO, J.; DA-SILVA, R.; & FRANCO, C.M.L. Effect of a *Thermoascus aurantiacus* thermostable enzyme cocktail on wheat bread quality. **Food Chemistry**, v. 143, 139-146 p. 2014.
- OKANO, K.; IIDA, Y.; SAMSURI, M.; PRASETYA, B.; USAGAWA, T.; & WATANABE, T. Comparison of in vitro digestibility and chemical composition among sugarcane bagasses treated by four white-rot fungi. **Animal Science Journal**, v. 77, n. 3, p. 308-313, 2006.
- OMEJE, K.O.; NNOLIM, N.E.; EZEMA, B.O.; OZIOKO, J.N.; OSSAI, E.C.; & EZE, S. O.O. Valorization of agro-industrial residues for pectinase production by *Aspergillus aculeatus*:

Application in cashew fruit juice clarification. **Cleaner and Circular Bioeconomy**, v. 4, p. 100038, 2023.

PANG, Z.W.; LU, W.; ZHANG, H.; LIANG, Z.W.; LIANG, J.J.; DU, L.W.; DUAN, C.J.; & FENG, J.X. Butanol production employing fed-batch fermentation by *Clostridium acetobutylicum* GX01 using alkali-pretreated sugarcane bagasse hydrolysed by enzymes from *Thermoascus aurantiacus* QS 7-2-4. **Bioresource Technology**, v. 212, 82-91 p. 2016.

PAYNOR, K.A.; DAVID, E.S.; VALENTINO, M.J.G. Endophytic fungi associated with bamboo as possible sources of single cell protein using corn cob as a substrate. **Mycosphere**, v. 7, n. 2, p. 139-147, 2016.

PAZ, M.F.; DEMENJOUR, P.L.M.M.; POLEIS, J.C.; & CARDOSO, R.S.R.L. Cultivation of edible mushroom Hiboukitake in caja bagasse by in Jun-Cao technique. **Journal of Biotechnology**, v. 4, n. 2, p. 146-152, 2013.

PEREIRA, J.C.; MARQUES, N.P.; RODRIGUES, A.; OLIVEIRA, T.B.; BOSCOLO, M.; SILVA, R.; MARTINS, D.A.B. Thermophilic fungi as new sources for production of cellulases and xylanases with potential use in sugarcane bagasse saccharification. **Journal of applied microbiology**, v. 118, n. 4, p. 928-939, 2015.

ROSA-GARZON. N.G.; LAURE, H.J.; ROSA, J.C.; & CABRAL, H. Valorization of agricultural residues using *Myceliophthora thermophila* as a platform for the production of lignocellulolytic enzymes for cellulose saccharification. **Biomass and Bioenergy**, v. 106452, 2022.

RULLI, M.M.; VILLEGAS, L.B.; BARCIA, C.S.; & COLIN, V.L. Bioconversion of sugarcane vinasse into fungal biomass protein and its potential use in fish farming. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 9, ed. 5, 106136, 2021.

SALAMI, S.A.; LUCIANO, G.; O'GRADY, M.N.; BIONDI, L.; NEWBOLD, C.J.; KERRY, J.P.; & PRIOLO, A. Sustainability of feeding plant by-products: A review of the implications for ruminant meat production. **Animal Feed Science and Technology**, v. 251, p. 37-55, 2019.

SANGUINE, I.S.; CAVALHEIRO, G.F.; GARCIA, N.F.L.; SANTOS, M.V.; GANDRA, J.R.; GOES, R.H.T.B.; PAZ, M.F.; FONSECA, G.G.; & LEITE, R.S.R. Xylanases of *Trichoderma koningii* and *Trichoderma pseudokoningii*: Production, characterization and application as additives in the digestibility of forage for cattle. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**. v. 44, 102482. 2022.

SANJINEZ-ARGANDOÑA, E.J.; MALDONADE, I.R.; BRENDA, C.A.; JUSTI, P.N.; ALVES, A.V.; & SILVA, T.G.D. Roteiro de aulas práticas da disciplina de Análise de Alimentos. 1º ed. Dourados, MS: Ed. UFGD, 2017. (Coleção Cadernos Acadêmicos).

SANTOS. P.S.; SOLIDADE, L.S.; SOUZA, J.G.B.; LIMA, G.S.; BRAGA Jr, A.C.R.; ASSIS, F.G.V.; & LEAL, P.L. Fermentação em estado sólido em resíduos agroindustriais para a produção de enzimas: uma revisão sistemática. **The journal of Engineering and Exact Sciences**, v. 04, n. 02, 2018.

SARDAR, H.; ALI, M.A.; ANJUM, M.A.; HUSSAIN, F.N.S.; NAZ, S.; & KARIMI, S.M. Agro-industrial residues influence mineral elements accumulation and nutritional composition of king oyster mushroom (*Pleurotus eryngii*). **Scientia Horticulturae**, v. 225, p. 327-334, 2017.

SOONG, C.J.; RAZAMIN, R.; & ROSSHAIKY, A.R. Nutrients requirements and composition in a grouper fish feed formulation. **The European Proceedings of Social & Behavioural Sciences EpSBS**, v. 14, p. 60-66, 2016.

STRONG, P.J.; SELF, R.; ALLIKIAN, K.; SZEWCZYK, E.; SPEIGHT, R.; O'HARA, I.; & HARRISON, M.D. Filamentous fungi for future functional food and feed. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 76, p. 102729, 2022.

VANDENBERGHE, L.P.; PANDEY, A.; CARVALHO, J.C.; LETTI, L.A.; WOICIECHOWSKI, A.L.; KARP, S.G.; MARTÍNEZ-BURGOS, W.J.; PENHA, R.O.; HERRMANN, L.W.; RODRIGUES, A.O.; SOCCOL, C.R. Solid-state fermentation technology and innovation for the production of agricultural and animal feed bioproducts. **Systems Microbiology and Biomanufacturing**, p. 1-24. 2020.

XU, S.; LI, F.; GAO, J.; ZHOU, X.Y.; LI, M.; LI, L.; HUI, C.; ZHANG, S.; LIU, K.; KONG, W.; LI, Y.; & LI, C. Low GHG emissions and less nitrogen use in mushroom-based protein production from chitin-containing waste and cottonseed hull with two phase SSF. **Industrial Crops and Products**, v. 201, 116970, 2023.

YAFETTO, L.; ODAMTTEN, G.T.; & WIAFE-KWAGYAN, M. Valorization of agro-industrial wastes into animal feed through microbial fermentation: A review of the global and Ghanaian case. **Heliyon**, v. 9, ed. 4, e14814, 2023.