AVALIAÇÃO DE MATÉRIA SECA DIGESTÍVEL E
CARBOIDRATOS ESTRUTURAIS DISPONÍVEIS EM FORRAGENS
POR SISTEMAS MICROBIOLÓGICO E ENZIMÁTICO

JOSÉ ALMIRO DA PAIXÃO

Zootecnista

Orientador: PROF. DR. WILSON ROBERTO SOARES MATTOS

Dissertação apresentada à Escola
Superior de Agricultura "Luiz de
Queiroz" da Universidade de São
Paulo, para obtenção do título de
Mestre em Agronomia. Área de
Concentração: Nutrição Animal e
Pastagens.

P I R A C I C A B A
Estado de São Paulo - Brasil
Março - 1990

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Livros da
Divisão de Biblioteca e Documentação - PCAP/USP

Paixão, José Almiro da

P149a Avaliação de matéria seca digestível e carboidra-
tos estruturais disponíveis em forragens por sistemas
microbiológico e enzimático. Piracicaba, 1990.
129p.

Diss.(Mestre) - ESALQ
Bibliografia.

1. Carboidrato de forragem - Avaliação - Técnica
"in vitro" 2. Celulase - Cinética 3. Forragem - Com-
posição - Avaliação 4. Forragem - Matéria seca - Di-
gestibilidade 5. Matéria seca - Digestibilidade -
Técnica "in vitro" I. Escola Superior de Agricultura
Luiz de Queiroz, Piracicaba

CDD 636.0855

AVALIAÇÃO DE MATÉRIA SECA DIGESTÍVEL E
CARBOIDRATOS ESTRUTURAIS DISPONÍVEIS EM FORRAGENS
POR SISTEMAS MICROBIOLÓGICO E ENZIMÁTICO

JOSÉ ALMIRO DA PAIXÃO

Aprovada em: 28.03.90

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Wilson Roberto Soares Mattos ESALQ/USP
Prof. Dr. Luiz Eduardo Gutierrez ESALQ/USP
Prof. Dr. Max Lázaro Vieira Bose ESALQ/USP

PROF. DR. WILSON ROBERTO SOARES MATTOS

Orientador

Aos meus pais
José Aquilino da Paixão e Maria Josefa
dos Santos Paixão, pelo estímulo
e confiança na minha decisão profissional.

Às sobrinhas, Joyce e Marcelle,
pela esperança emplumada
em seus olhares.

À Tâmara Lages Pereira,
pelo carinho e estímulo proporcionados.

Aos laboratoristas, pelas contribuições
para o banco de informações na área
de Avaliação de Alimentos.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Wilson Roberto Soares Mattos, pela paciência, orientação e estímulo no decorrer do meu preparo científico.

Ao Prof. Dr. João Atílio Jorge, da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras, da U.S.P., Ribeirão Preto, pelo estímulo e decisivas contribuições no desenvolvimento do projeto.

À equipe da Seção de Avaliação de Forragens, do Instituto de Zootecnia, em especial ao Dr. Edgard Leoni Caielli e ao colega pós-graduando, Gilberto Braun, por terem gentilmente cedido as instalações do laboratório e facilitado a execução do projeto.

Ao Prof. Dr. Hilton Thadeu Zarate de Couto, do Departamento de Ciências Florestais/ESALQ, pela orientação e execução das análises estatísticas e contribuição na discussão dos dados.

Às pesquisadoras Maria Luíza Otero D'Almeida e Marisa Koga, do Agrupamento de Celulose e Papel, do I.P.T., pelas sugestões e discussão sobre os materiais de estudo e alguns procedimentos.

Ao Prof. Dr. Cássio Roberto Mello Godoi, do Departamento de Matemática e Estatística, e a pós-graduanda Tiemi Matsuo, pela orientação e execução de partes das análises estatísticas.

Às pesquisadoras, Terezinha Aparecida Martins Gomes de Castro (nível III) e Maria Aparecida Lara Porto Biancalana (nível I), da Seção de Bioquímica do Sêmem, Instituto de Zootecnia, pelas dosagens de proteínas.

Ao Pesquisador, Álvaro Rodrigues dos Santos, do Agrupamento de Minas e Geologia Aplicada, do I.P.T., pelas análises de difração de raios-X nas amostras comerciais de celulose.

Ao Prof. José Norberto Muniz, da Universidade Federal de Viçosa, pelos ensinamentos sobre Metodologia Científica e por ter me indicado para lecionar a referida disciplina na Faculdade de Agronomia de Ituverava/SP.

Ao Zootecnista, Leonardo Barreto Alves Pinheiro, pela valiosa contribuição e amizade durante a tomada dos dados.

À equipe da Seção de Introdução e Avaliação Agronômica de Forrageiras, do Instituto de Zootecnia, por terem cedido os materiais forrageiros disponíveis em seu campo de introdução.

Aos laboratórios, BIOBRÁS, NOVO INDUSTRI DO BRASIL e BIOCON DO BRASIL, por terem cedido seus materiais para o estudo.

Ao CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pela concessão de bolsa durante a fase de créditos e exame de qualificação.

À CAPES, Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal do Ensino Superior, pela concessão de bolsa durante o desenvolvimento do projeto.

À EMBRAPA/CNPGC, pela concessão de alguns materiais e ajuda na busca de literatura, e em especial, aos amigos, que estimularam o meu preparo científico.

Aos amigos, Elizabeth Ann Veasey, Rosangela B. Navarro, João Batista de Abreu, Paulo Robson e Elizabeth Arndt, Maria do Carmo Esteves, Sérgio Duarte, Lila Carlota Lopez, Mário Sato, Mário Inomoto, José Roberto Scarpellini e a todos que contribuíram decisivamente na continuidade do curso.

Aos funcionários da Biblioteca Central, em especial a Eliana e a Kátia, da Seção de Referência, pela ajuda no levantamento e apresentação do material bibliográfico.

À Eliane, Milton e Adilson, pela contribuição na preparação do texto.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS	viii.
LISTA DE FIGURAS	ix.
RESUMO	xi.
SUMMARY	xv.
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Avaliação de Carboidratos Através de Enzimas .	3
2.2. Métodos de Estudo da Fração Potencialmente Di- gestível em Forragens	35
3. MATERIAL E MÉTODOS	49
3.1. Fase Pré-experimental	49
3.2. Material	54
3.3. Métodos	59
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	69
5. CONCLUSÕES	102
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	104
APÊNDICE	121

LISTA DE TABELAS

Tabela	Página
1 Substratos preferenciais das enzimas celulolíticas.	15
2 Celulólise por enzimas isoladas e/ou combinadas.	16
3 Métodos analíticos para atividade celulolítica..	20
4 Recentes propostas da metodologia enzimática para estudos da fração potencialmente digestível em forragens.	47
5 Índice de cristalinidade em celulosos comerciais.	51
6 Constante de Michaelis-Menten (K_m) e Constante de Inibição (K_i) para beta-glucosidase de <i>Trichoderma reesei</i> e de <i>Aspergillus niger</i>	89
7 Enzimas celulolíticas produzidas por <i>Trichoderma reesei</i> e <i>Aspergillus niger</i>	89
8 Modelos e equações definidas para estimativa de parede celular pelos sistemas analíticos, detergente e enzimático.	91
9 Modelos e equações definidas para estimativas de matéria seca digestível entre os sistemas microbiológico e enzimático.	95

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Estruturas macromoleculares da parede celular. .	7
2	Detalhes.	8
3	Diagrama macromolecular proposto para hidrólise da celulose.	14
4	Modelo aceito para hidrólise da celulose.	18
5	Uso alternativo de materiais lignocelulósicos em processos biotecnológicos.	35
6	Diluição enzimática como indicativo do potencial hidrolítico, em três sistemas enzimáticos obtidos a partir de <i>Trichoderma reesei</i> (E ₁ e E ₂) e de <i>Aspergillus niger</i> (E ₃).	50
7	Reta-padrão de glucose para dosagem de açúcares redutores (DNS).	63
8	Potencial hidrolítico em função de concentração enzimática e de tempo de reação, em três sistemas enzimáticos obtidos a partir de <i>Trichoderma reesei</i> (E ₁ e E ₂) e de <i>Aspergillus niger</i> (E ₃). ...	71
9	Efeito da temperatura, tampão e pH sobre o potencial hidrolítico, em três sistemas enzimáticos obtidos a partir de <i>Trichoderma reesei</i> (E ₁ e E ₂) e de <i>Aspergillus niger</i> (E ₃).	80

Figura	Página
10	Efeito da concentração molar de sódio sobre o potencial hidrolítico, em três sistemas enzimáticos obtidos a partir de <i>Trichoderma reesei</i> (E1 e E2) e de <i>Aspergillus niger</i> (E3).
	83
11	Identificação bioquímica de beta-endoglucanase e beta-glucosidase, em três sistemas enzimáticos obtidos a partir de <i>Trichoderma reesei</i> (E1 e E2) e de <i>Aspergillus niger</i> (E3).
	85

AVALIAÇÃO DE MATÉRIA SECA DIGESTÍVEL E CARBOIDRATOS ESTRUTURAIS DISPONÍVEIS EM FORRAGENS POR SISTEMAS MICROBIOLÓGICO E ENZIMÁTICO

Autor: JOSÉ ALMIRO DA PAIXÃO

Orientador: PROF. DR. WILSON ROBERTO SOARES MATTOS

RESUMO

Com o objetivo de estudar as técnicas microbiológica (Tilley & Terry) e enzimática para avaliação de forragens, procedeu-se inicialmente a um estudo do comportamento cinético de celulase de *Trichoderma reesei* e *Aspergillus niger* visando fixar as condições ótimas de hidrólise. Os referidos sistemas enzimáticos foram então aplicados às diferentes forragens, na tentativa de compatibilizar sistemas enzimáticos com os substratos forrageiros (forragens conservadas, gramíneas, leguminosas e resíduos agrícolas) que melhor se correlacionassem com o procedimento microbiológico.

O estudo foi conduzido em duas fases, a primeira com substratos puro (celulose em pó) e específico (carboximetilcelulose e salicina), em condições padronizadas foram analisados os açúcares redutores pelo DNS (ácido dinitrosalicílico) e o teor de solubilização como indicativo

da atividade enzimática. A relação enzima/substrato e o tempo de reação mostraram-se como fatores determinantes de atividade e o estudo revelou o potencial hidrolítico máximo nos distintos sistemas enzimáticos, maximizando os efeitos inibitórios e inativadores nos sítios moduladores dos respectivos componentes bioquímicos. Ainda foi determinado como outros fatores (pH, temperatura, tampão e concentração molar de sódio) atuam sobre o referido potencial.

Na segunda fase, os substratos forrageiros, com teores de parede celular variando de 50-90%, pelo sistema detergente neutro, foram submetidos a um estudo de correlação e regressão com o procedimento enzimático (insolubilização em HCl-pepsina). Foram aplicados três modelos de equações (linear, M1; logarítmico, M2 e quadrático, M3) para selecionar efeitos de tratamentos. Os resultados mostram coeficientes de determinação de 0,6821 (M3); 0,5317 (M1); 0,6340 (M1) e 0,8368 (M1) para forragens conservadas, gramíneas, leguminosas e resíduos agrícolas, respectivamente. A parede celular tomada como covariável nas avaliações de matéria seca digestível e carboidratos estruturais disponíveis revelou a heterogeneidade e especificidade dos materiais em estudo (parede celular e sistemas enzimáticos). O método alternativo de remoção de conteúdo celular foi adotado como pré-tratamento nas avaliações da técnica enzimática.

O procedimento enzimático apresenta algumas vantagens em relação ao microbiológico, além de aferir

matéria seca digestível pode se detectar com certa especificidade os carboidratos estruturais disponíveis nos alimentos, assumindo-se o modelo de WALDO, 1972. Os resultados mostram coeficientes de determinação da ordem de 0,60 a 0,90 entre as técnicas avaliadas para os grupos de forragens e os sistemas celulolíticos do estudo, nas avaliações gravimétricas (matéria seca digestível). Sendo a E1 (de *Trichoderma reesei*) mais indicada para leguminosas e forragens conservadas e a E2 (de *Aspergillus niger*) recomendada para os grupos de gramíneas e resíduos agrícolas.

Os modelos de equações aplicados mostraram-se efetivos sem comprometer os objetivos do trabalho. Principalmente, na detecção de matéria seca digestível, o modelo quadrático ajustou-se melhor para as forragens conservadas, gramíneas e resíduos agrícolas. Por outro lado, o grupo de leguminosas apresentou equação com coeficiente de determinação $\approx 0,90$ nos três modelos estudados. Numa análise global, o modelo logarítmico apresentou melhores ajustes, corroborando com as análises do referido teste no estudo de parede celular. A análise da covariável parede celular não foi procedente para as leguminosas, onde conseguiu-se maior coeficiente de determinação para as técnicas avaliadas.

Os modelos escolhidos para explicar os dados de matéria seca digestível, em geral também se aplicavam para carboidratos estruturais disponíveis. A questão de especificidade enzima-substrato pode ser melhor evidenciada ao se estudar correlações e modelos entre os procedimentos

gravimétricos e colorimétricos, considerando a técnica enzimática. Neste caso, o sistema celulolítico (de *Aspergillus niger*) parece ser mais específico para os substratos em estudo e o modelo quadrático mostrou-se melhor, o que já havia sido sugerido no grupo de leguminosas, nas análises de correlação e regressão com a técnica microbiológica.

EVALUATION OF DIGESTIBLE DRY MATTER AND AVAILABLE
STRUCTURAL CARBOHYDRATES IN FORAGES BY SYSTEMS
MICROBIOLOGICAL AND ENZYMATIC

Author: JOSÉ ALMIRO DA PAIXÃO

Adviser: PROF. DR. WILSON ROBERTO SOARES MATTOS

SUMMARY

With the objectives of studying the microbiological (Tilley & Terry) and enzymatic techniques for forage evaluation, a study of the cellulase kinetics behaviour of *Trichoderma reesei* and *Aspergillus niger* was conducted, in order to establish the best conditions for hydrolysis. These enzymatic systems were applied to the different forages trying to compatibilize the enzymatic systems with the forages substrates (preserved forages, grasses, legumes and agriculture by-products) that correlate best with the microbiological procedure.

The study was conducted in two phases. The first with pure (powder cellulose) and specific (carboxymethylcellulose and salicin) substrates, in standardized conditions, analysing the reducing sugars by DNS (dinitro-salicylic acid) and the solubilization content as indicative

of the enzymatic activity. The relation enzyme/substrate and the time for the reaction appeared as determinant factors of activity. The study showed the maximum hidrolytic potential in the different enzymatic systems, maximizing the inhibiting and inactivating effects in the modulators sites in its respective biochemical components. The other factors that acted upon the referred potential (pH, temperature, buffer and sodium molar concentration) were also determined.

On the second phase, the forages substrates with cellular wall contents varying from 50 to 90%, by the neutral detergent system, were submitted to a study of correlation and regression with the enzymatic procedure (insolubilization in HCl-pepsin). The equation models (linear, M1; logarithmic, M2 and quadratic, M3) were used to select the effects of treatments. The results show determination coefficients of 0,6821 (M3); 0,5317 (M1); 0,6340 (M1) and 0,8368 (M1) for the preserved forages, grasses, legumes and agriculture by-products, respectively. The cellular wall taken as covariate in the evaluations of digestible dry matter and available structural carbohydrates, showed heterogeneity and specificity of the materials studied (cellular wall and enzymatic systems). The alternative procedure to remove cell content was adapted as a pre-treatment in the gravimetric and colorimetric evaluations on the enzymatic technique.

The enzymatic procedure presents some advantages over the microbiological one, as besides checking

the digestible dry matter, it can detect with a certain specificity the available structural carbohydrates of food, according to the model proposed by WALDO, 1972. The results show determination coefficients ranging from 0,60 to 0,90 on the gravimetric evaluations (digestible dry matter) for the forage groups and the enzymatic systems studied. The enzymatic systems of *Trichoderma reesei*, E1 were the most indicated for legumes and preserved forages and the systems of *Aspergillus niger*, E2 were most appropriated for grasses and agriculture by-products.

The equation models used in the present studies were effective without compromising the work's objectives. The quadratic model was functional at the adjustment of the digestible dry matter, mainly for preserved forages, grasses and agriculture by-products. On the other hand, the legume's group presented an equation with determination coefficient around 0,90 in the three models studied. In general, the logarithmic model showed better adjustment, corroborating with the analyses in the same test for the cellular wall study. The analysis of the cellular wall covariate was not effective for legumes, where a better substitution among the techniques evaluated was achieved.

The models chosen to explain the digestible dry matter data, in general, were also applied to the available structural carbohydrates. The specificity of enzyme-substrate can be better shown by studying correlations and models among the gravimetric and colorimetric procedures,

considering the enzymatic technique. In these cases the enzymatic systems of *Aspergillus niger* seem to be more specific for the substrate studied. Also, the quadratic model presented better results, which had already been suggested in the legume's group, by the correlation and regression analyses with the microbiological technique.

1. INTRODUÇÃO

A importância dos substratos lignocelulósicos em processos biotecnológicos está associada a reciclagem de fontes de carbono no processo de obtenção de produtos de interesse alimentício e industrial. A heterogeneidade dos referidos substratos têm dificultado o estudo do potencial de uso. As propostas mais recentes envolvem sistemas químicos convencionais de hidrólise e as técnicas de marcadores isotópicos ou não. A enzimologia da degradação destes materiais tem recebido grande atenção ultimamente, com a vantagem do enfoque molecular com os referidos substratos.

A utilização da biomassa celulósica pelo ecossistema ruminal é complexa e o entendimento de fatores estruturais e físico-químicos dos substratos lignocelulósicos constituem assunto de bastante especulação. Torna-se interessante conhecer de forma rápida e direta as forragens e alimentos que suportam basicamente a produção de ruminantes, que depende da disponibilidade biológica e da eficiência de utilização dos nutrientes consumidos.

Os experimentos convencionais de digestão e alimentação são bastante precisos em avaliar as forragens, entretanto, são demorados, caros e trabalhosos. Muitos pro-

cedimentos laboratoriais (químicos, biológicos e mistos) têm sido propostos para substituí-los, avaliando-as indiretamente. Recentemente, o infravermelho e a técnica biológica (enzimática) têm-se demonstrado procedimentos satisfatórios para tais propósitos, com a vantagem adicional de independem completamente do animal.

O objetivo do presente estudo foi de avaliar as técnicas biológicas *in vitro* (microbiológica e enzimática) para algumas forragens. O trabalho foi conduzido em duas fases, na primeira foi direcionado para os fatores que interferem sobre a cinética dos sistemas celulolíticos, visando otimizar as condições de hidrólise. Enquanto, na segunda fase, os grupos de forragens foram submetidos às diferentes técnicas, tentando compatibilizar fontes de substratos e enzimas que melhor se correlacionassem com a técnica microbiológica.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Avaliação de Carboidratos Através de Enzimas

a) Caracterização e propriedades químicas

Os carboidratos podem ser classificados por número de átomos de carbono por molécula, ou ainda, com base no número de moléculas de açúcares simples presentes no polímero. Desta forma, têm-se os monossacarídeos (1), os oligossacarídeos (2-10) e os polissacarídeos, com mais de dez (10) unidades simples de açúcares (CHURCH & POND, 1986).

Quimicamente, os carboidratos são classificados como polihidroxiáldeídos e polihidroxicetonas de acordo com a posição do carbono anomérico (CHOH) na cadeia carbônica, respectivamente no C₁ e no C₂. A reação da carbonila em aldoses e cetoses com a hidroxila forma, respectivamente, os grupamentos hemiacetais e hemicetais, tornando o carbono da carbonila mais um centro de assimetria. As formas estáveis aldo e cetopiranosídicas e furonasídicas são assim determinadas devido as fórmulas conformacionais que assumem após as reações descritas (CHURCH & POND, 1986; LEHNINGER, 1988).

O número de centros assimétricos define, na maioria dos monossacarídeos, o número de estereoisômeros, ou

seja, as formas opticamente ativas, com exceção da diidroxicetona. Podem assim, desviar, no polarímetro, o plano da luz polarizada para direita (dextrorrotatório) ou para a esquerda (levorotatório). As formas D e L referem-se à configuração do carbono quiral mais distante da carbonila, podendo-se detectar os epímeros das respectivas aldoses e cetoses. A maioria dos açúcares simples assume a forma D, enquanto a forma L pode ser obtida sinteticamente, ao contrário do que ocorre com os aminoácidos naturais (LEHNINGER, 1988).

A importância dos estereoisômeros está relacionada com uma propriedade facilmente demonstrável, o poder de redução. Os polissacarídeos assumem formas susceptíveis à oxidação, produzindo substâncias com alto poder oxidativo, onde seus grupos carbonilas, em presença de agentes redutores, recebem elétrons, com certa equivalência entre a concentração de açúcares e a quantidade de reagente reduzido. Admitem-se, entretanto, interferências dos componentes individuais do reagente e das condições de hidrólise com os substratos teste (MILLER, 1959; MARSDEN *et alii*, 1982b; MULLINGS & PARISH, 1984).

Alguns métodos mais apurados como cromatografia líquida de alta pressão (MARSDEN *et alii*, 1982b; FOX *et alii*, 1984), camada delgada (CHIRICO & BROWN JR, 1985) ou os recentes métodos físicos de separação por peso molecular são propostos para que se conheça melhor a natureza bioquímica dos carboidratos. As formas mais complexas, como por exemplo a cristalinidade da celulose, pode ser determinada por

hidrólise ácida ou difratometria de raios X (WEIMER & WESTON, 1985).

b) Carboidratos - fonte básica de energia renovável

Os carboidratos servem basicamente como combustível celular para os tecidos vegetais e animais. No tecido vegetal, ocorrem na forma de monossacarídeos, de amido como polissacarídeo de reserva, e de celulose, hemicelulose e derivados como polissacarídeos estruturais, os quais representam, mais ou menos, 80% da biomassa renovável. No tecido animal, ocorrem basicamente na forma de glicogênio, como polissacarídeo de reserva (LEHNINGER, 1988).

Os vegetais sintetizam em média, o equivalente a 50 kg de celulose por dia, por pessoa, a partir do processo fotossintético, utilizando o CO_2 derivado da oxidação aeróbica e anaeróbica e do sistema respiratório dos animais superiores (LEHNINGER, 1988). Os produtos da fotossíntese servem basicamente à sobrevivência dos animais, principalmente, ao se considerar que os carboidratos representam, mais ou menos, 50% da matéria seca em forragens e 80% nas sementes, grãos e cereais (CHURCH & POND, 1986).

A reciclagem da biomassa celulósica através de processos fermentativos ou enzimáticos, garante a produção de $8,5 \times 10^7$ l de CO_2 por ano. Se houvesse algum bloqueio no processo, a terra perderia suas reservas de dióxido de carbono em 20 anos, o que evidencia a importância desse processo no suprimento de alimentos (VAN SOEST, 1982).

Nutricionalmente, os carboidratos podem ser caracterizados por sua disponibilidade. A parede celular dos vegetais é composta basicamente por carboidratos estruturais, anidroaçúcares polimerizados e outras substâncias de menor importância nutricional, tais como lignina, cutina, pectina e ceras. Internamente, a célula vegetal contém, ainda, lipídeos, proteínas, açúcares simples e amido como constituintes de alta disponibilidade (VAN SOEST, 1982).

A parede celular é constituída por camadas que se desenvolvem em diferentes estágios de crescimento. A célula madura apresenta paredes primária e secundária, com camadas externa (S1), intermediária (S2) e interna (S3). Uma lamela intermediária, rica em pectato de cálcio, une duas paredes primárias, e geralmente é formada na fase de crescimento, antes de se formar a parede secundária. Após o período de divisão celular, a parede secundária se espessa com a polimerização de celulose e hemicelulose. Sendo que a formação de lignina se inicia na fase de envelhecimento celular (ALBERTS *et alii*, 1983). (Detalhes nas Figuras 1, 2).

Figura 1 - Estruturas macromoleculares da parede celular.
 Fonte: COUGHLAN, 1985 (adaptado de ESAU, 1977).

2.1. Formação de parede secundária na célula vegetal.

2.2. Arranjos moleculares na parede celular.

2.3. Microfibrilas (formas cristalina e amorfa da celulose; ENARI, 1983).

2.4. Estrutura linear da molécula de celulose.

DISPOSIÇÃO DAS PONTES DE HIDROGÊNIO NAS
MOLÉCULAS DE CELULOSE

2.5. Disposição de pontes de hidrogênio na molécula de celulose.

A unidade básica da estrutura da parede celular é a microfibrila, composta por aproximadamente 20 micelas. As micelas contêm em média 100 cadeias moleculares de celulose. A organização das microfibrilas segue um arranjo pouco ordenado na parede primária, sendo frequentemente transversal ao eixo celular e longitudinal aos vértices celulares. Com o envelhecimento celular ocorre a formação das camadas da parede secundária, que conferem rigidez à célula, e ainda promove um arranjo definido nas microfibrilas. Na camada externa (S1), as microfibrilas dispõem-se em duas espirais opostas com ângulo aberto em relação ao eixo celular. Na camada intermediária (S2), observa-se uma espiral de ângulo agudo com o eixo celular e anéis concêntricos, e na camada interna (S3), as microfibrilas ordenam-se em helicóides suaves (ESAU, 1977; CUTTER, 1978).

A celulose é um homopolissacarídeo linear de aproximadamente 10.000 unidades monoméricas de D-glucose, unidas por ligações do tipo beta 1,4 formando celooligômeros de diferentes pesos moleculares e graus de polimerização (15-14.000). Ocorre nas formas cristalina e amorfa, organizada em microfibrilas nas diferentes camadas da parede celular, ou entrelaçada com hemicelulose e lignina na matriz da parede celular (VAN SOEST, 1982).

A hemicelulose é um heteropolissacarídeo constituído por monômeros-D de glucose, xilose, arabinose, manose e galactose; xiloglucano é a molécula predominante na hemicelulose-A e a arabinoglucano na hemicelulose-B, ambas

com ramificações principais do tipo beta e terminais do tipo alfa, com as demais unidades monoméricas (VAN SOEST, 1982; DEKKER, 1985).

A lignina é um polímero de alto peso molecular, que está intimamente associado aos carboidratos estruturais da parede celular. Pode limitar a disponibilidade dos carboidratos em até 1,4 vezes o seu peso molecular e confere rigidez à estrutura tridimensional da parede celular. Quimicamente é definida como um polihidroxifenilpropano, com certa resistência à hidrólise. Nas forragens, aparece na sua forma verdadeira, com composição variável em ácido coumárico, ferúlico e sinápico, como constituintes básicos (VAN SOEST, 1982; CRAWFORD & CRAWFORD, 1984).

O conceito de disponibilidade está relacionado a forma como a lignina se associa à estrutura dos polissacarídeos, com a formação de regiões cristalinas, e com os arranjos ordenados nas cadeias moleculares de celulose na microfibrila. A complexidade dos substratos lignocelulósicos exige critérios metodológicos na avaliação dos carboidratos estruturais, principalmente quando se pretende conhecer seu potencial de uso industrial. Os substratos lignocelulósicos compreendem 95% da biomassa terrestre. A celulose e a lignina representam, aproximadamente, 40% e 25% respectivamente destes (CRAWFORD & CRAWFORD, 1984), sendo a celulose a biomolécula extracelular mais abundante, enquanto que a intracelular é a proteína (LEHNINGER, 1988).

c) Hidrólise enzimática da celulose, hemicelulose e derivados

c.1) Teoria hidrolítica

A celulose, hemicelulose e seus derivados podem ser utilizados como fonte de carbono e energia por microrganismos aeróbicos e anaeróbicos. A maioria dos estudos que visa esclarecer o mecanismo da decomposição destes polímeros é baseada, principalmente, em *Trichoderma reesei* e *Aspergillus niger*, por possuírem os sistemas celulolíticos mais ativos e de mais fácil obtenção. O mecanismo de síntese das enzimas celulolíticas dessas espécies segue a teoria da indução e repressão proposta por JACOB & MONOD (1961), que é regulado geneticamente, porém com possibilidades de manipulações sobre suas características básicas. As relações entre indução, repressão e síntese, ainda não estão bem estabelecidas, principalmente pela multiplicidade dos sistemas citados na literatura (ENARI, 1983; COUGHLAN, 1985).

A complexidade deste mecanismo é função do(s) substrato(s) envolvidos e de suas diferentes formas de uso. Há proposições sugerindo substratos ideais, entretanto, estes devem ser estabelecidos em função dos objetivos de uso dos sistemas multienzimáticos. Existem, basicamente, três enzimas envolvidas no processo hidrolítico (ENARI, 1983; COUGHLAN, 1985).

- Endoglucanase (1.4 - beta-D-glucano 4 glucanohidrolase, EC 3.2.1.4), que hidrolisa aleatoriamente ligações glicosídicas, produzindo terminais redutores.

- Celobiohidrolase (1,4 - beta - D - glucano celobiohidrolase, EC 3.2.1.91), que atua sobre celulose nativa produzindo celobiose com terminais não-redutores.
- Beta-glucosidase (beta - D - glicosídeo glicohidrolase, EC 3.2.1.21), que hidrolisa celobiose e celooligossacarídeos de pequeno peso molecular (3-4).

O mecanismo de sacarificação enzimática da celulose nativa, a nível macromolecular, proposto atualmente, é caracterizado inicialmente pela amorfogênese (Figura 3). Vários fatores têm sido propostos como desencadeadores do processo, ou seja, tornam o material mais susceptível a hidrólise enzimática, porém os mesmos ainda não estão bem estabelecidos (COUGHLAN, 1985). A amorfogênese pode ser desencadeada por meio enzimático dependente de peróxido de hidrogênio e ferro (GRIFFIN *et alii*, 1984) ou por um fator de desfibrilamento ou formadores de fibra curta (HALLIWELL & GRIFFIN, 1973). O desfibrilamento e a erosão sobre os cristais de celulose são causados pelo rompimento de pontes de hidrogênio, o que é confirmado por técnicas microscópicas, sem que haja alteração da estrutura original da fibra e com produção de pequenas quantidades de açúcares solúveis. CHANZY *et alii*, (1983) atribuíram esta atividade à celobiohidrolase.

Figura 3 - Diagrama macromolecular proposto para hidrólise da celulose. Fonte: COUGHLAN, 1985.

Tanto a amorfogênese quanto a sacarificação podem assumir formas diferentes de acordo com os substratos e os microrganismos envolvidos. Apesar de confirmada a atividade hidrolítica, o fator gerador do processo não é aceito como sendo enzimático, por ter baixo peso molecular, apresentar estabilidade a altas temperaturas, liofilização e a extração com metanol. Contrapondo-se, ainda, atua sinergicamente com endo e exoglucanase no processo de sacarificação (GRIFFIN *et alii*, 1984).

Um modelo para explicar o mecanismo foi proposto por REESE *et alii* (1950), porém não esclarece totalmente o processo, principalmente por aceitar-se a existência de um fator não hidrolítico capaz de ativar a sequência de reação hidrolítica. Assim, pode-se pelo menos distinguir os microrganismos capazes de desenvolverem-se em substratos cristalinos (geradores de C₁) e aqueles que são capazes de crescerem em celulosas modificadas, geradores de C_x ENARI (1983); COUGHLAN (1985). (Detalhes na Tabela 1).

Tabela 1 - Substratos preferenciais das enzimas celulolíticas.

COMPONENTES BIOQUÍMICOS	CELULOSE CRISTALINA	CARBOXIMETIL CELULOSE	CELULOSE AMORFA	CELOOLIGOS SACARÍDEOS	CELOBIOSI
Endoglucanase	-	+	+	+	-
Celobiohidrolase	+	-	+	+	-
Beta-glucosidase	-	-	-	+	+

Fonte: ENARI, 1983.

O modelo aceito propõe uma forte sinergia (Tabela 2) entre endoglucanase e celobiohidrolase para substratos altamente ordenados, entretanto, para substratos amorfos pode ocorrer forte sinergia entre endoglucanase e celobiase (ENARI, 1983; COUGHLAN, 1985). As endoglucanases atuam aleatoriamente sobre as regiões amorfas da celulose, abrindo extremidades para o ataque de celobiohidrolase, formando celooligossacarídeos de diferentes pesos moleculares. Posteriormente, a beta-glucosidase aumenta a eficiência de hidrólise, removendo os produtos inibitórios de endoglucanase e de celobiohidrolase (MARSDEN *et alii*, 1982a; ENARI, 1983; COUGHLAN, 1985).

Tabela 2 - Celulólise por enzimas isoladas e/ou combinadas.

COMPONENTES BIOQUÍMICOS	SOLUBILIZAÇÃO (ALGODÃO)	
	<i>F. solani</i>	<i>T. koningii</i>
Celobiohidrolase (CBH)	2	1
Endoglucanase (EG)	1	1
Beta-glucosidase (BG)	1	0
CBH + EG	58	53
CBH + BG	18	20
CBH + EG + BG	71	72
Cultura Original	71	71

Fonte: ENARI, 1983.

Para hemicelulose, a proposição hidrolítica segue, um mecanismo semelhante, independente da maior ou menor participação de arabinose e xilose na molécula. Observa-se a participação sinérgica de endo 1,4 beta-D-xilanase

(EC 3.2.1.8) e exo-1,4 beta-D-xilosidase (EC 3.2.1.37). O fator não hidrolítico não tem sido observado para os sistemas hemicelulolíticos, entretanto, sabe-se que hemicelulase está sempre presente nos sistemas celulolíticos de microrganismos mesofílicos e termofílicos (DURAND *et alii*, 1984; DEKKER, 1985).

c.2) Alostéria

As enzimas alostéricas apresentam sítios catalíticos e moduladores; os catalíticos são específicos para substratos, enquanto que os alostéricos são específicos para moduladores. Neste caso, o comportamento cinético difere do proposto por MICHAELLIS-MENTEN, pelo fato de que, um modulador positivo é o próprio substrato, ativa o processo, enquanto que um negativo vem a ser o produto final (LEHNINGER, 1988).

Na visão mais recente da celulólise, (Figura 4) enquadram-se como fatores-regulatórios, a própria atividade de C₁, a endoglucanase, a celobiohidrolase ou um fator não-enzimático, funcionando como marcapasso do processo. Na condição de saturação, pode-se atingir a maximização dos moduladores negativos (sítios ativos), enquanto os moduladores positivos podem ser minimizados. O modulador negativo mais evidente é a glucose, que desacelera a reação continuamente, e em associação aos outros fatores diminui a velocidade da reação até o limite potencial do substrato e do sistema enzimático (ENARI, 1983; COUGHLAN, 1985).

Figura 4 - Modelo aceito para hidrólise da celulose (RYU & MANDELS, 1980; MARSDEN et alii, 1982a).

As enzimas alostéricas podem ser homotrópicas, se somente o seu substrato específico funcionar como modulador, e heterotrópicas se outros compostos além do substrato específico puderem ocupar espaço nos respectivos sítios alostéricos, associando-se a qualquer dos sítios-moduladores (LEHNINGER, 1988).

O fato dos sistemas celulotíticos e hemicelulolíticos apresentarem inúmeros sítios alostéricos, aliados à eficiência dos processos de separação e purificação dos

componentes destes sistemas, que não é máxima, tem dificultado a interpretação dos resultados. As medidas de atividade podem dar indicação do comportamento cinético, entretanto, é necessário reconhecer se todos os sítios catalíticos estão saturados. Torna-se interessante descrever o mecanismo sem interferências de fatores como excesso de substrato e/ou enzima, acessibilidade e tamanho médio de partícula do substrato e da enzima (GOEL & RAMACHANDRAN, 1983; WEIMER & WESTON, 1985).

c.3) Métodos analíticos e atividade

Basicamente nos estudos enzimáticos, a condição de linearidade da atividade, expressa em quantidade de produto/minuto em relação à concentração de substrato, é garantida pelas transformações permitidas pela lei de Lineweaver-Burk (LEHNINGER, 1988). As enzimas alostéricas não se enquadram neste procedimento, e ainda, tem-se dificuldade em trabalhar com condições de pureza de substratos e de enzimas. Recomendando-se portanto uma combinação de métodos para garantir a avaliação.

A atividade celulolítica pode ser expressa de diferentes formas (Tabela 3). A quantificação de açúcares reduzidos é, em geral, a medida mais indicada para os complexos substratos. Outros tipos de avaliações, no entanto, têm fornecido altas correlações (COUGHLAN, 1985). O método clássico de dosagens de açúcares redutores pelo (DNS) ácido dinitrosalicílico (MILLER, 1959) para hidrolisados lignoce-

lulósicos tem sido mais indicado, pela sua simplicidade e reprodutibilidade. MANDELS *et alii*, (1976) demonstraram que pode haver interferências de substratos, enzimas e condições de ensaio nas avaliações colorimétricas de açúcares redutores, e estas avaliações são comparáveis ao procedimento gravimétrico.

Tabela 3 - Métodos analíticos para atividade celulolítica.

COMPONENTES BIOQUÍMICOS	SUBSTRATOS	PROPRIEDADE E/OU PRODUTO MEDIDO
CELULASE TOTAL C1+Cx AVICELASE FPASE	Algodão	Açúcares redutores
	Avicel	Perda de peso (Solub.)
	Papel de filtro	Decréscimo em turbidez e força tensora
	Solka-floc	Liberação de marcadores
	Agar-celulose	Clarificação do agar
	Celulose-marcada	
ENDOGLUCANASE (CMCASE)	Carboximetilcelulose	Açúcares redutores
	Hidroxietilcelulose	Decréscimo em viscosidade
	Celooligossacarídeos	Clarificação do agar
	CMC-Agar	
EXOCELOBIO- HIDROLASE (CBH)	Celulose amorfa	Açúcares redutores
	Celooligossacarídeos	Celobiose
	Celulose cristalina	
β -GLUCOSIDASE	Celobiose	Açúcares redutores
	Salicina	p-Nitrofenol
	p-Nitrofenil- β -gluco- sídeo	

MARSDEN *et alii* (1982b) propuseram que os resultados com o DNS, por agrupar terminais reduzidos de diferentes oligossacarídeos, podem apresentar discrepâncias da ordem de 25% em comparação aos obtidos por cromatografia líquida de alta pressão (H.P.L.C.). Entretanto, o DNS sofre menos interferências de condições de ensaio, tais como potencial hidrogeniônico, tampões, volume de amostra e temperatura, decorrentes basicamente das diferenças de reatividade de monômeros simples e celobiose. As diferenças observadas entre os métodos DNS e o H.P.L.C. foram atribuídas basicamente a subestimativa, dada pelo DNS, de oligossacarídeos oriundos da atividade hemicelulolítica; relacionando-se numa reta padrão de glucose, substratos como o bagaço, que apresentam quantidades elevadas de xilose e arabinose e diferentes graus de polimerização (FOX *et alii*, 1984).

Comparações dos métodos Somogyi & Nelson e o da glucose-oxidase, têm revelado que o primeiro sofre bastante interferências das condições diferenciadas de ensaio. Ao se traçar curvas de sacarificação, principalmente com períodos longos, o método de Somogyi & Nelson mostra resultados discrepantes com o DNS (BREUIL & SADDLER, 1985a). Por outro lado o glucose-oxidase não mostra-se muito preciso para o estudo de substratos e tratamentos que visam avaliar susceptibilidade a diferentes sistemas enzimáticos; a referida susceptibilidade deve-se principalmente às conformações estruturais lignocelulósicas (BREUIL & SADDLER, 1985b).

A velocidade de reação em condições padronizadas define as unidades internacionais UI (s), sendo que, a atividade molecular pode ser expressa em função do produto ou do substrato. A atividade específica, entretanto, define melhor a relação entre o produto e a enzima (MANDELS *et alii*, 1976; ENARI, 1983; COUGHLAN, 1985).

A separação de celooligossacarídeos pode ser obtida por H.P.L.C. (MARSDEN *et alii*, 1982b; DEKKER, 1985) e cromatografia de camada delgada (CHIRICO & BROWN JR., 1985), dando uma melhor orientação do mecanismo de sacarificação. Para melhor compreender a ação do proposto componente C₁, tem-se submetido materiais com alto índice de cristalinidade à soluções enzimáticas, entretanto, não se consegue distinguir metodologicamente os monômeros solúveis de regiões cristalinas. Têm-se sugerido aferir paralelamente o índice de cristalinidade no resíduo (WEIMER & WESTON, 1985) e/ou a técnica de ressonância magnética (BARTON, 1988).

A condição de linearidade pode ser estabelecida com a beta-glucosidase, pela especificidade com substratos tais como: celobiose, p-nitrofenil-beta-D- -glicosídeo e salicina, através de diferentes métodos como o da *glucose oxidase* e o *Somogyi & Nelson*, sem problemas na interpretação (PEIJI, 1987).

As diferentes vias de produção de glucose (celobiose, celooligossacarídeos) sugerem a complexidade dos substratos e do processo hidrolítico no mecanismo de sacarificação parcial, demonstrando ser importante na avaliação de

microrganismos capazes de utilizar celulose nativa (RYU & MANDELS, 1980; MARSDEN *et alii*, 1982b).

d) Fatores determinantes da disponibilidade dos substratos lignocelulósicos

As carboidrases fúngicas demonstram certo potencial em detectar estruturas disponíveis da celulose, hemicelulose e derivados. Como estruturas disponíveis, distingue-se aquelas que, mesmo sofrendo interferências de diferentes fatores, conseguem produzir monômeros utilizáveis em algum processo bioquímico ou nutricional. Entre os fatores que interferem na disponibilidade, destacam-se:

d.1) Lignificação

O processo de lignificação nos materiais fibrosos, é ainda de pouca compreensão. Está envolvida uma polimerização entre os ácidos coumárico, ferúlico e sinápico nas forrageiras. A condensação de terpenóides e fenólicos com grupos acetatos e ligações glicosídicas, pode explicar a ligação covalente com a hemicelulose, e provavelmente, com a celulose, reduzindo a disponibilidade da parede celular em sistemas anaeróbicos e aeróbicos (VAN SOEST, 1982; CRAWFORD & CRAWFORD, 1984; BORGMEYER & CRAWFORD, 1985; LIN *et alii*, 1985).

Grande parte dos hidrolisados de lignina obtidos em sistemas anaeróbicos são encontrados na forma de CH_4 e CO_2 , ao se utilizar técnicas isotópicas com ^{14}C -lig-

nina (BORGMEYER & CRAWFORD, 1985; COLBERG & YOUNG, 1985). Em sistemas aeróbicos por mediação da D-glucose-oxidase (beta-D-glucose-oxigênio-oxiredutase, EC 1.1.3.4) e peroxidase (peróxido de hidrogênio oxiredutase, EC 1.11.1.7) pode se obter compostos fenólicos solúveis e D-glucose, evidenciando uma ação coordenada com sistemas celulolíticos de *Trichoderma reesei* e *Phanerochaete chrysosporium* (LOBARZEWSKI & PASZCZYNSKI, 1985; KELLEY & REDDY, 1986).

A lignólise é uma atividade mediada pelas enzimas, peroxidase e oxigenase, de peso molecular 42000 e que não mostram estereoespecificidade. A despolimerização da lignina em alfa-C e beta-C, segue o mecanismo clássico de indução e repressão (TIEN & KIRK, 1983; FAISON & KIRK, 1985). A dependência extracelular de H_2O_2 e O_2^- nas formas ativas parece ser o fator alostérico para a ligninase (TIEN & KIRK, 1983; CRAWFORD & CRAWFORD, 1984), pelo menos com *Phanerochaete chrysosporium*.

O processo envolvendo transformações bioquímicas de substratos lignocelulósicos, até então, tem recebido atenção apenas pelas técnicas convencionais, tais como, recuperação de frações indisponíveis, métodos isotópicos com ^{14}C -lignocelulose e análises de hidrolisados. A enzimologia deste processo tem recebido inúmeros tratamentos metodológicos nos últimos anos (CRAWFORD & CRAWFORD, 1984).

Os sistemas multienzimáticos celulolíticos e lignolíticos são estudados através de técnicas de mutagênese e DNA-recombinante, visando obter microrganismos superprodu-

tores destas enzimas. Entretanto, o fator alostérico nestes sistemas pode sofrer defeitos genéticos principalmente pela técnica mutagênica (CRAWFORD & CRAWFORD, 1984; LEHNINGER, 1988).

d.2) Cristalinidade e amorfismo

A estabilidade dos substratos lignocelulósicos é determinada pelas pontes de hidrogênio e forças de Van der Waals inclusive na estrutura linear cristalina, onde formam-se microfibrilas ordenadas, com maiores índices de polimerização (10-15000). A semelhança molecular de celulose nos diferentes materiais (algodão, madeira e forragens) garante certas suposições para estudos comparativos, porém diferem basicamente em hemicelulose e lignina (COUGHLAN, 1985; LIN *et alii*, 1985; ROLZ *et alii*, 1986).

O fator alostérico para o sistema celulolítico pode ser evidenciado no componente C₁, ultimamente identificado como celobiohidrolase I e II (CHANZY *et alii*, 1983; ALURRALDE & ELLENRIEDER, 1984; VAN TILBEURGH *et alii*, 1985); endoglucanase (RYU & MANDELS, 1980; MARSDEN *et alii*, 1982a) e como agente não enzimático, desfibrilador e despolimerizador (HALLIWELL & GRIFFIN, 1973). Há certa tendência de especificidade e afinidade deste componente por substratos cristalinos (ALURRALDE & ELLENRIEDER, 1984; VAN TILBEURGH *et alii*, 1985).

Diferenças estruturais em substratos cristalinos e amorfos podem ser refletidas na reatividade destes

materiais até 24 h; entretanto, a relação enzima/substrato interage com tempo nos distintos substratos (GUSAKOV *et alii*, 1985; ROLZ *et alii*, 1986). Efetivamente, substratos cristalinos são menos reativos que substratos amorfos, principalmente, pela variação normal em grau de polimerização e de substituição destes últimos (LIN *et alii*, 1985; POULSEN & PETTERSEN, 1985).

A proposição de que o componente C₁ tem uma participação na redução do tamanho médio de partículas, aumentando a acessibilidade aos demais componentes do sistema celulolítico, corrobora com a interação observada entre cristalinidade e tamanho de partículas. Há entretanto, um limite para ambos os fatores interferirem sobre a atividade enzimática. Dificilmente, consegue-se amostras celulósicas puramente amorfas ou cristalinas, porém, a celulose residual tende a apresentar um índice de cristalinidade maior devido à remoção das regiões amorfas e/ou deficiências em componente C₁ (ALURRALDE & ELLENRIEDER, 1984; WEIMER & WESTON, 1985).

O componente C₁ ou agente despolimerizador tem efeito de solubilização sem produção de açúcares, combinando-se os efeitos de C₁ e C_x, a eficiência do sistema celulolítico pode ser quintuplicada (HALLIWELL & GRIFFIN, 1973). A celobiohidrolase I e II entretanto, são específicas para diferentes pesos moleculares de celooligossacarídeos e susceptíveis a inibição clássica por celobiose que é o principal produto final (GUSAKOV *et alii*, 1985b; VAN TILBEURGH *et alii*, 1985). O efeito limitante clássico da

cristalinidade pode ser a inativação por propriedades físico-químicas do substrato (ALURRALDE & ELLENRIEDER, 1984).

d.3) Potencial enzimático e sinergia

O potencial de um sistema celulolítico pode ser avaliado como a capacidade (taxa e extensão) de sacarificação em condições comparativas padronizadas. As propriedades físico químicas dos substratos interagem com os sistemas enzimáticos (ROLZ *et alii*, 1986).

As enzimas dos sistemas celulolíticos ocorrem em diferentes formas intra (endo) ou extracelularmente (exo), seguindo o mecanismo proposto de indução e repressão (JACOB & MONOD, 1961). A ação coordenada das endo e exo enzima, atuando aleatória e especificamente sobre os respectivos substratos, garante a eficiência do processo hidrolítico (ENARI, 1983; COUGHLAN, 1985).

A inibição clássica por produto final ou intermediário e a sinergia entre endo e exoenzimas, endo e celobiase e diferentes formas de exoenzimas (isoenzimas) tem recebido diferentes considerações matemáticas. Sugere-se uma disfunção da cinética de primeira ordem, conforme é esperado para os casos de especificidade enzimática e de substrato. O referido modelo tem aplicação no estudo de diferenças estruturais e biológicas dos polissacarídeos (FUJJI *et alii*, 1981; FUJJI & KAWAMURA, 1985; FUJJI & SHIMIZU, 1986).

A atividade inicial da endoglucanase promove liberação de produtos que somente serão reduzidos na presen-

ça de beta-glucosidase. Observa-se, também, a liberação de celooligossacarídeos susceptíveis a celobiohidrolase devido à sua orientação e estrutura química. As exocelobiohidrolases também apresentam especificidade e sinergia, o produto final de CBH I é uma celobiose, enquanto da CBH II é uma celotriose. Em sistemas deficientes em celobiase, provavelmente, a sinergia observada pouco significa, tendendo a acumular celooligossacarídeos de pequeno peso molecular (CLESCERI *et alii*, 1985; POULSEN & PETTERSEN, 1985; VAN TILBEURGH *et alii*, 1985; TJERNELD *et alii*, 1985 a,b). O mesmo mecanismo sinérgico pode ser observado com a xilanase e xilosidase, com inibição por xilobiose e xilose respectivamente (DURAND *et alii*, 1984; DEKKER, 1986).

A importância da sinergia está relacionada com a eficiência da celulólise. O processo é visto como o balanço equilibrado da atividade específica e coordenada de cada um dos componentes. Entretanto, a afinidade e a especificidade das celobiohidrolases, também podem afetar a eficiência hidrolítica. Considerando-se os mecanismos naturais de inibição, o tempo funciona como determinante da atividade, aumentando a inibição por acúmulo dos produtos finais e intermediários (TJERNELD *et alii*, 1985a, b; GUSAKOV *et alii*, 1987). A remoção destes dá linearidade quase perfeita após 24 h (TAKAGI, 1984), enquanto que 72 h parece ser o tempo máximo de estudo do potencial em sistema batch (GUSAKOV *et alii*, 1987). As técnicas mutagênicas e do DNA-recombinante visam obter mutantes resistentes à inibição por produto

final e obter superprodutores, entretanto, ainda não se tem uma definição clássica do tipo de inativação promovida por estes produtos nos respectivos sítios moduladores (ALURRALDE & ELLENRIEDER, 1984; AGARWAL, 1985; KAWAMORI *et alii*, 1985).

Observa-se uma forte sinergia entre C₁/C_x, resultando também em eficiência hidrolítica (HALLIWELL & GRIFFIN, 1973). Os sistemas celulolíticos de *Trichoderma reesei* são ricos em celobiohidrolase I e II, enquanto, os de *Aspergillus niger* o são em beta-glucosidade, possivelmente, orientando formas distintas de uso, considerando a especificidade de substratos e potência enzimática (GROUS *et alii*, 1985; DEKKER, 1986).

d.4) Condições e estabilidade de reação

A especificidade enzima/substrato é um reflexo da estereoespecificidade quimicamente orientada pelos celooligossacarídeos formados através das reações que se sucedem, ao se expor os sistemas enzimáticos. Ou ainda, pode ser definida como a fração do substrato susceptível a hidrólise. Então, assume importância a relação enzima/substrato, principalmente nos estudos cinéticos com enzimas alostéricas. Em termos de produção de enzimas pelos microrganismos, a compatibilidade entre substratos e microrganismos, reflete as características estruturais dos substratos (CLESCERI *et alii*, 1985; GROUS *et alii*, 1985; TJERNELD *et alii*, 1985a, b).

A relação enzima/substrato interage com diferenças estruturais dos substratos em condições variantes da

saturação. Entretanto, o tempo também determina um limite da reação, em condições ótimas. Tem-se proposto que os fatores de inativação enzimática limitam a reatividade do substrato (AGARWAL, 1985). O tempo para potencial máximo parece estar entre 24 e 72 h, até 24 h podem aparecer as diferenças estruturais mais significativas dos substratos (GOEL & RAMACHANDRAN, 1983; CLESCERI *et alii*, 1985; GUSAKOV *et alii*, 1985; MANONMANI & SREEKANTIAH, 1987).

Sabe-se que os sistemas multienzimáticos variam em condições ótimas, principalmente pelo grande número de isoenzimas determinadas pelas modernas técnicas de produção de enzimas. Entretanto, as variações detectadas são mínimas, exceto, em casos especiais. Fatores como tampão, temperatura, concentração hidrogeniônica e composição iônica do meio, podem interferir na estabilidade da reação, refletindo na reatividade dos substratos (DURAND *et alii*, 1984; AGARWAL, 1985; GUSAKOV *et alii*, 1985; TJERNELD *et alii*, 1985a, b).

Admite-se em casos específicos, condições padronizadas para aferir equilíbrio e estabilidade do sistema, ou de componentes individuais. Os tampões simples citrato e acetato de sódio dão melhor estabilidade que os fosfato-citrato e acetato de sódio. Justifica-se assim a grande aplicação destes na maioria dos ensaios de atividade celulolítica (MULLINGS & PARISH, 1984; MANONMANI & SREEKANTIAH, 1987).

A concentração hidrogeniônica está relacionada ao ponto isoelétrico (pI), entretanto, mostra-se bastante

específico em algumas condições. O pH médio 4,8 é indicado para os sistemas celulolíticos de *Trichoderma reesei* e *Aspergillus niger*. Certamente, a nível industrial pode parecer interessante trabalhar com altas temperaturas e diferentes faixas de pH, assim há sugestões de que a albumina sérica bovina (BSA) funciona como termo estabilizante das enzimas (DEKKER, 1985). Acréscimos de 10°C (40-50°C) podem duplicar a energia de ativação de enzimas, dobrando a velocidade de reação (LEHNINGER, 1988). Para a maioria dos sistemas celulolíticos, tem-se proposto 50°C como temperatura ótima com maior estabilidade no início da reação (DURAND *et alii*, 1984; GROUS *et alii*, 1985; TJERNELD *et alii*, 1985 a,b; MANONMANI & SREEKANTIAH, 1987).

A composição iônica do meio reduz a sacarificação em substratos puros e naturais, a diferentes tempos, 24 a 72 h, usando celulasas de *Trichoderma reesei* e *Aspergillus ustus*. Além disso, a taxa e a extensão de sacarificação respondem a diferenças em concentração enzimática (GROUS *et alii*, 1985; MANONMANI & SREEKANTIAH, 1987).

A taxa de sacarificação é um bom indicativo de eficiência hidrolítica, sendo que a extensão de sacarificação não se correlaciona bem com eficiência, principalmente por diferenças estruturais dos substratos naturais. A máxima eficiência de uso destas enzimas pode ser obtida com remoção de inibidores, combinando os processos biotecnológicos de sacarificação e fermentação (TAKAGI, 1984). Em condições subótimas, a atividade pode se estender até 24 dias. A

eficiência hidrolítica pode ser melhorada simplesmente por adição de beta-glucosidase, a de *Aspergillus niger*, apesar de abundante, é bastante sensível ao produto. A adição de beta-glucosidase de *Aspergillus niger* em sistemas de *Trichoderma reesei* remove a celobiose não-reduzida, aumentando em até 1/3 a eficiência hidrolítica (CLESCERI *et alii*, 1985; GROUS *et alii*, 1985; TJERNELD *et alii*, 1985 a,b; DEKKER, 1985).

A eficiência máxima de hidrólise pode ser acompanhada de recuperação máxima de enzimas, entretanto, os componentes individuais diferem em dessorção, principalmente por especificidade e *attached* com substratos relacionados (ALURRALDE & ELLENRIEDER, 1984). Além dos fatores já descritos, tratamentos específicos sobre os substratos e sistemas de reatores (contínuo, semicontínuo e *batch*) interferem na recuperação das enzimas. A produção das enzimas responde por mais ou menos 60% do custo do processo (DESPHANDE & ERIKSSON, 1984; CLESCERI *et alii*, 1985; TJERNELD *et alii*, 1985; GUSAKOV *et alii*, 1987), o que justifica pesquisas na área de recuperação das referidas enzimas.

d.5) Tratamento físico, químico e biológico e acessibilidade

Alguns tratamentos promovem delignificação, rompem ligações de hidrogênio, reduzem grau de polimerização e de cristalinidade, tornando os substratos mais reativos. Os referidos efeitos sobrepõem-se ao de intumescimento, com

importância na hidrólise efetiva da matriz sólida da parede celular por microrganismos. Paralelamente, podem ocorrer perdas relativas de hemicelulose e celulose (DAVID *et alii*, 1985; ROLZ *et alii*, 1986).

Tratamentos físicos em moinho bola reduzem a cristalinidade, aumentam a área superficial, aumentando portanto a acessibilidade das enzimas. O tempo de moagem tem se mostrado efetivo até 96 h. A descompressão à vapor desprende a lignina dos polissacarídeos, produzindo monômeros de baixo peso molecular. A eficácia dos tratamentos pode ser avaliadas pela relação custo/aumento de reatividade, ao se conseguir aumentar a distribuição dos poros, com consequente aumento em área superficial e acessibilidade (GRETHLEIN, 1984; DAVID *et alii*, 1985; ROLZ *et alii*, 1986). As dificuldades em se determinar tamanho de partículas e acessibilidade limitam o uso das referidas técnicas para avaliações de tratamento. Na verdade, há baixa correlação entre tamanho de partículas e acessibilidade, e há forte correlação entre área superficial e acessibilidade. A acessibilidade pode ser detectada por exclusão de soluto na matriz da parede celular, determinando a distribuição e tamanho de poros (STONE *et alii*, 1965; GRETHLEIN, 1984).

Os tratamentos em meios alcalinos (CH_2O_2 , Na_2O , SO_2^- , NH_3 , NaOH , Na_2CO_3 , Ca(OH)_2) despolimerizam a lignina, tornando a celulose e a hemicelulose mais reativa (GRETHLEIN, 1984; ROLZ *et alii*, 1986; TAKAGI, 1987). Os tratamentos em meios ácidos, alteram a cristalinidade, rom-

pem pontes de hidrogênio e dependendo da concentração e forma de aplicação, podem hidrolisar parcialmente a celulose e a hemicelulose (DAVID *et alii*, 1985; WEIMER & WESTON, 1985).

Os tratamentos biológicos resumem-se em aplicações de enzimas e/ou microrganismos sobre a biomassa (ver Figura 5). Os mecanismos naturais envolvidos na obtenção ou extração de energia, por estes tratamentos indicam maior susceptibilidade dos substratos a tratamentos enzimáticos, isto devido o processo microbiológico, não demonstrar rapidez e eficiência na detecção de diferenças estruturais dos substratos. O balanço energético positivo, somente é conseguido com células adultas, sendo que as diferenças e incompatibilidade de substratos com microrganismos provocam retardamento no processo (DAVID *et alii*, 1985; COLBERG & YOUNG, 1985; ROLZ *et alii*, 1986; MURRAY, 1987).

Das diferenças entre sistemas aeróbicos e anaeróbicos, uma das mais marcantes, é a independência de beta-glucosidase nos anaeróbicos. A inibição clássica por glucose é baixa, mantendo conversões de biomassa em elevadas concentrações molares de glucose. Assim, os sistemas anaeróbicos respondem a adição de beta-glucosidase devido o acúmulo normal de celobiose. A dependência do *attachment* é maior em anaeróbicos, e a digestão ocorre nos celulosomos ou vesículas celulares. Em geral, a digestão extracelular dos aeróbicos assume maior importância que a intracelular (ROLZ *et alii*, 1986; MURRAY, 1987).

Figura 5 - Uso alternativo de materiais lignocelulósicos em processos biotecnológicos. Fonte: ENARI, 1983.

2.2. Métodos de Estudo da Fração Potencialmente Digestível em Forragens

a) Modelo de digestão nos ruminantes

Os modelos matemáticos têm contribuído bastante para o conhecimento do processo digestivo nos ruminantes. Principalmente por permitirem avaliações de fatores associados diretamente ao alimento, ao animal ou ambas (OSBOURN, 1978; MERTENS & ELY, 1979; MURPHY *et alii*, 1986).

Conhecida a relação simbiote no processo digestivo dos ruminantes e o singular sistema multicompartimental referente a digestão de carboidratos estruturais, têm-se considerado uma fração potencialmente digestível e outra indigestível (WALDO, 1972). A primeira é submetida a dois mecanismos, os quais, denominam-se digestão e passagem, enquanto que a segunda fração é submetida apenas ao mecanismo de passagem. Sabe-se hoje, que este modelo aplica-se a outras frações da dieta, entretanto, muitas vezes têm-se interesse em manipular os referidos mecanismos no sentido de aumentar a digestão do referido grupo de nutrientes, a nível de rúmen-retículo, e por conseguinte, reduzir a passagem dos mesmos (WALDO, 1972; VAN SOEST, 1982).

Uma melhor caracterização da digestão da fibra pelos ruminantes inclui a relação entre a fração indigestível e consumo voluntário, tempo e taxa de turnover e taxa de passagem (MERTENS & ELY, 1979; VAN SOEST, 1982). Obviamente, estes parâmetros estão associados a fatores inerentes ao alimento e ao animal, sem nenhuma relação mutuamente exclusiva (VARGA & HOOVER, 1983; MURPHY *et alii*, 1986).

Modernamente, tem-se proposto um modelo no qual inclui-se 12 constituintes químicos, crescimento microbiano e respectivas interações com o hospedeiro (MURPHY *et alii*, 1986). Experimentos comparativos para testar este modelo comprovam interações de nível e frequência de alimentação sobre os parâmetros considerados.

Reconhecidamente, a extensão de degradação no rúmen é função inversa de turnover e direta de tempo de permanência (VAN SOEST, 1982; CZERKAWSKI, 1986). A taxa de digestão é uma função inversa da taxa de passagem, devido à competição de ambas, obviamente, considerando a fração potencialmente digestível (WALDO, 1972). Nesse sentido, tem-se proposto como forma de avaliar as forragens, o estudo paralelo de taxa e extensão de digestão. Esse enfoque caracteriza a forragem quanto a variabilidade na taxa de digestão e *lag-time* (VARGA & HOOVER, 1983).

A fração indigestível tem relação direta com o estado de enchimento no rúmen-retículo, ficando claro o seu efeito sobre o valor nutritivo, caso se observe a esperada redução em consumo voluntário e taxa de digestão (MERTENS & ELY, 1979; VAN SOEST, 1982). A fração potencialmente digestível constitui-se de conteúdo celular e parede celular verdadeiramente digestível (WALDO, 1972; OSBOURN, 1978; VAN SOEST, 1982).

b) Métodos de estudo de digestão

A composição química mostra relações significativas com o valor nutritivo dos alimentos, principalmente para os constituintes do conteúdo celular, indicando sua alta disponibilidade. Entretanto, para parede celular, devido as propriedades intrínsecas e a variabilidade de seus componentes, tem-se questionado a disponibilidade, devido ao grande número de fatores determinantes (VAN SOEST, 1973; VAN

SOEST, 1981). A fração potencialmente digestível de celulose e hemicelulose, entretanto fornece bons indicativos do potencial digestível nos alimentos, e quanto menor sua participação maior a variabilidade na matéria seca digestível, indicando uma maior heterogeneidade (VAN SOEST, 1982; MINSON, 1982).

Há tentativas de se obter equações capazes de estimar a matéria seca digestível ou energia digestível nos alimentos, onde se leva em consideração os componentes individuais da parede celular (celulose, fibra detergente ácido, lignina) e suas relações intrínsecas com valor energético. Entretanto, o problema analítico torna estas equações de difícil aplicação prática (MINSON, 1982). Pode se estimar o valor nutritivo, por regressão múltipla a partir de componentes químicos e do potencial digestível (MINSON, 1982; COTTYN *et alii*, 1984; DEBOEVER *et alii*, 1988) obtidos pelos diferentes procedimentos analíticos. A energia líquida e energia metabolizável podem ser estimada no alimento a partir de lignina e lignocelulose fibra detergente ácido (MINSON, 1982). Ao se considerar o efeito do ambiente sobre os alimentos, a aplicação das referidas equações torna-se mais específica (KIRCHGESSNER & KELLNER, 1978; OSBOURN, 1978; COTTYN *et alii*, 1984).

A variabilidade, o custo e o tempo necessário, tem inviabilizado a maioria dos estudos diretos de digestão. Qualquer dos métodos diretos (coleta de fezes, marcadores isotópicos ou não, *in situ* com saco de nylon) pode ser

aplicado no estudo de taxa de digestão. Entretanto, para o estudo de extensão de digestão, os métodos *in situ* com saco de nylon ou *in vitro* microbiológico tem sido proposto (CHOPSON *et alii*, 1963; MARTEN, 1981; MINSON, 1981; VARGA & HOOVER, 1983; DEBOER *et alii*, 1987). Quanto à técnica pepsina-celulase, trabalhos preliminares evidenciam ambas as possibilidades, desde que sejam controlados alguns fatores que determinam a atividade enzimática (MCQUEEN & VAN SOEST, 1975; MCLEOD & MINSON, 1978; MCLEOD & MINSON, 1982). A importância dos referidos estudos está em se conhecer melhor a natureza da fração potencialmente digestível, principalmente a contribuição da parede celular, e assim melhor utilizar a informação sobre digestibilidade em estratégias de alimentação.

As avaliações sobre digestão tem variabilidade menor que as de consumo voluntário, tornando o primeiro mecanismo mais fácil de ser avaliado (ULYATT, 1973). Algumas vezes a reprodutibilidade entre análises e laboratórios tem dificultado a aplicação dos métodos convencionais, diretos e indiretos (MCLEOD & MINSON, 1969; CLARK & BEARD, 1977; GOLDMAN *et alii*, 1987; CLARY *et alii*, 1988). A técnica enzimática tem custo operacional e financeiro bastante reduzido mesmo ao se considerar a necessidade de importação de enzimas e ainda é compensada pela sua alta reprodutibilidade (JONES & HAYWARD, 1975; DOWMAN & COLLINS, 1977; ROUGHAN & HOLLAND, 1977; MCLEOD & MINSON, 1982).

Em geral, tem-se indicado a técnica microbiológica (TILLEY & TERRY, 1963; VAN SOEST *et alii*, 1966) para os estudos de valor nutritivo, nos programas de melhoramento e manejo agrônômico de forrageiras (MINSON & HAYDOCK, 1971; REES & MINSON, 1979). Espera-se que a resposta da forrageira, ao ser selecionada pela sua digestibilidade, possa ser refletida também em consumo voluntário e valor nutritivo (MERTENS & ELY, 1979). Outros grupos de alimentos, tais como: forragens conservadas (DOWMAN & COLLINS, 1977; DOWMAN & COLLINS, 1982; DEBOEVER, 1988); resíduos agrícolas tratados ou não (REXEN, 1977; ISRAELSEN *et alii*, 1978; WALKER *et alii*, 1983) e misturas de alimentos (CLARK & BEARD, 1977; COTTYN *et alii*, 1984; DEBOEVER *et alii*, 1986) poderão ser avaliados indistintamente pelos métodos enzimático e microbiológico, desde que sejam observadas as respectivas modificações no procedimento analítico, visando compatibilizar fonte e especificidade enzimática e composição dos substratos.

c) Procedimento analítico da técnica enzimática

(Recentes propostas descritas na Tabela 4)

c.1) Tratamento da amostra

Considerando-se o mecanismo de digestão da fibra pelos microrganismos ruminais, sabe-se que o efeito do intumescimento ocorre paralelamente ao processo de remoção do conteúdo celular (VAN SOEST, 1982; MCLEOD & MINSON, 1982; MURPHY *et alii*, 1986). A reidratação do material garante

maior peso específico mantendo-o em compartimentos ruminais com maior atividade celulolítica (CZERKAWSKI, 1986; HOMMA, 1986).

Os métodos propostos incluem uma solubilização com HCl-pepsina, com concentração ácida de 0,1 a 2,0 N (JONES & HAYWARD, 1975; MCLEOD & MINSON, 1982; DEBOEVER *et alii*, 1986), apenas HCl 2N (PACE *et alii*, 1986) ou ainda análise de parede celular pelo sistema detergente neutro (ROUGHAN & HOLLAND, 1977; ISRAELSEN *et alii*, 1978; DOWMAN & COLLINS, 1982; MCLEOD & MINSON, 1982). A melhor correlação com digestibilidade *in vivo* do primeiro modelo tem sugerido que HCl-pepsina não só tem a função de remover o conteúdo celular, como também alterar a forma física da parede celular, tornando-a mais susceptível a hidrólise com celulase (JONES & HAYWARD, 1975; GOTO & MINSON, 1977; MCLEOD & MINSON, 1982). Para estudos com resíduos ou alimentos com grande quantidade de parede celular, a determinação prévia desta fração tem dado resultados satisfatórios para estimar a digestibilidade *in vivo* (MCQUEEN & VAN SOEST, 1975; ROUGHAN & HOLLAND, 1977). Para alimentos com alto conteúdo de amido, têm-se sugerido tratamentos adicionais no sentido de hidrolisá-lo (com HCl 1N ou 2 N) e/ou gelatinizá-lo com tratamento adicional 80°C/45' (KIRCHGESSNER & KELLNER, 1978; DEBOEVER *et alii*, 1986; HADJIPANAYIOTOU *et alii*, 1987; AUFRÈRE & MICHALET-DOREAU, 1988). Ou ainda, outro tratamento enzimático com amiloglucosidase (AGIDEX), adicional ao HCl-pepsina, é proposto para melhorar a correlação com os

resultados de estudos *in vivo* (DOWMAN & COLLINS, 1982).

A solubilização com pepsina 0,2% peso/volume, HCl 0,1N por 24 horas a 40°C tem sido utilizada como padrão para tratamento das forragens em sistemas de detecção da fração potencialmente digestível (JONES & HAYWARD, 1973; JONES & HAYWARD, 1975; MCLEOD & MINSON, 1982). Embora esse método subestime o valor real, este procedimento tem sido mais preciso do que as demais alternativas. Esta fração da forragem está altamente correlacionada com consumo voluntário, por assim determinar uma maior taxa de digestão inicial, reduzindo o *lag-time* (DONEFER *et alii*, 1963; MINSON & HAYDOCK, 1971; NARASIMHALU, 1984; MURPHY *et alii*, 1986).

Alguns autores propõem a solubilização com pepsina após o tratamento com celulase, entretanto, nem sempre os resultados são satisfatórios (JONES & HAYWARD, 1973; JONES & HAYWARD, 1975; KIRCHGESSNER & KELLNER, 1978; PACE, 1986). Outros propõem a solubilização da forragem apenas com a celulase, os resultados obtidos têm sido satisfatórios, principalmente para substratos ou formas cristalinas com celulasas mais específicas, especialmente em resíduos agrícolas (HARTLEY *et alii*, 1974; MCQUEEN & VAN SOEST, 1975; REXEN, 1977).

Poucos pesquisadores sugerem o acerto de potencial hidrogeniônico do meio após o tratamento com HCl-pepsina na forragem, o qual está com pH 1,5-2,0, antes de se expor a parede celular às enzimas celulolíticas. ALLISON & BORZUCKI, (1978); MALOSSINI *et alii*, (1984) sugeriram carbo-

nato de sódio (Na_2CO_3) enquanto (VANDERHAEGHE & BISTON, 1987) sugeriram acetato de sódio 20% num sistema FIBERTEC. Alimentos tratados com NaOH até 8%, certamente o tampão 0,1 M já garante condições de pH próximas ao ideal (REXEN, 1977).

A forragem fresca pode ser submetida a extração de conteúdo celular através do sistema detergente neutro (BAILEY & JONES, 1971; HARTLEY *et alii*, 1974; MCCLUSKEY *et alii*, 1984), principalmente ao se ter interesse em determinar a digestibilidade de tecidos especializados presentes na parede celular. Os hidrolisados podem ser submetido a análises cromatográficas e colorimétricas de carboidratos estruturais, usando-se as técnicas *in vitro*. A técnica indireta de dosagem de ésteres de carboidratos em hidrolisados de parede celular com celulase de *Oxyporus* sp mostrou bom indicativo do potencialmente digestível e boa comparação à equação múltipla, incluindo os componentes de parede celular (HARTLEY *et alii*, 1974).

As referidas metodologias (cromatografia e colorimetria) são aplicadas a situações em que se pretende recuperar a parede celular, ou ainda, distinguir a atividade hemicelulolítica em sistemas enzimáticos, fracionando a hemicelulose A e B. A extração incompleta de conteúdo celular pode trazer interferências nas referidas determinações. Portanto, devem ser feitas modificações analíticas concernentes a composição do alimento e forma de exposição de parede celular (BAILEY & JONES, 1971; HARTLEY *et alii*, 1974).

c.2) Especificidade enzima-substrato

(Recentes propostas descritas na Tabela 4).

As enzimas de *Trichoderma reesei* têm sido indicadas para a digestão de celulose cristalina e celulose amorfa encontradas em forragens tropicais e temperadas, em diferentes proporções (JONES & HAYWARD, 1975; ROUGHAN & HOLLAND, 1977; MCLEOD & MINSON, 1982; VALDES & JONES, 1987). Por outro lado, as enzimas de *Aspergillus niger* têm-se mostrado mais específicas para alimentos ricos em carboidratos não estruturais (CLARK & BEARD, 1977; DOWMAN & COLLINS, 1977; COTTYN *et alii*, 1984). Também tem-se observado que celulasas de basidiomicetos (*Oxyporus* sp) poderão ser usadas para formas altamente ordenadas de celulose (JARRIGE & THIVEND, 1969; HARTLEY *et alii*, 1974; ISRAELSEN *et alii*, 1978).

A presença de atividade hemicelulolítica em celulasas comerciais tem sugerido adaptações na metodologia, possibilitando adequação às diferentes formas de ligações químicas entre os componentes da parede celular. A distinção completa dos componentes individuais do sistema celulolítico e hemicelulolítico, pode indicar a eficiência com que o material é hidrolisado (BAILEY & JONES, 1971; HARTLEY *et alii*, 1974; JONES & HAYWARD, 1975; MCQUEEN & VAN SOEST, 1975; ROUGHAN & HOLLAND, 1977).

A adição de enzimas no rúmen e nas dietas tem revelado interações com o potencial digestível dos alimentos (DANIELS & HASHIM, 1977; ROLZ *et alii*, 1986). Em dietas

volumosas de baixa digestibilidade, observa-se efeitos mais significantes sobre o potencial do alimento em relação às dietas de melhor digestibilidade (DANIELS & HASHIM, 1977; REXEN, 1981; ROLZ *et alii*, 1986). Os resíduos agrícolas pela sua heterogeneidade podem revelar melhor tais interações (ROLZ *et alii*, 1986), orientando possíveis combinações de tratamentos (enzimático x microbiológico) visando efetivamente melhorar o aproveitamento.

c.3) Condições de reação

A variação na atividade das enzimas produzidas por diferentes laboratórios e em diferentes condições possivelmente justifica os diferentes níveis de concentração ou relação enzima/substrato ou enzima/tampão. As concentrações enzimáticas recomendadas na solução tampão variavam de 0,1 a 3,25% peso/volume (JONES & HAYWARD, 1975; MCQUEEN & VAN SOEST, 1975; MASAOKA & TARUMOTO, 1979, DEBOEVER *et alii*, 1986). Ainda observaram-se que pequenas concentrações tendem a apresentar menor desvio padrão residual (JONES & HAYWARD, 1975; DOWMAN & COLLINS, 1977; MCLEOD & MINSON, 1978; VALDES & JONES, 1987). (Detalhes na Tabela 4).

Alguns estudos tem avaliado o tamanho da amostra como fonte de variação, e há indícios de que amostras pequenas (0,2 g) tendem a apresentar maior desvio padrão residual (MCLEOD & MINSON, 1978; DOWMAN & COLLINS, 1982). Com relação ao diâmetro médio de partículas para análise, observa-se que as de 1,0 mm de diâmetro apresentam menor

desvio padrão residual em relação a 0,4 mm (GOTO & MINSON, 1977; MCLEOD & MINSON, 1978).

A temperatura ideal para a atividade da celulase é de 50°C e tem se demonstrado que a solubilização pela pepsina-celulase aproxima-se bastante da digestão *in vivo* em gramíneas tropicais (MCLEOD & MINSON, 1978; MCLEOD & MINSON, 1982). Entretanto, a maioria dos estudos tem proposto temperaturas entre 39-40°C (JARRIGE & THIVEND, 1969; JONES & HAYWARD, 1975; CLARK & BEARD, 1977; DOWMAN & COLLINS, 1977).

Tentativas foram feitas no sentido de reduzir o tempo de reação, por se observar com 24h a maior parte de solubilização (JONES & HAYWARD, 1973; MCLEOD & MINSON, 1978; MASAOKA & TARUMOTO, 1979; BUGGE, 1980; DOWMAN & COLLINS, 1982; DEBOEVER *et alii*, 1986). Entretanto, essa medida é comprometida pelo alto desvio padrão residual. Outros estudos têm propostos 48 h (JONES & HAYWARD, 1975; MCLEOD & MINSON, 1982; VALDES & JONES, 1987). Poucos sugerem 72 h (MCQUEEN & VAN SOEST, 1975; BUGGE, 1980; NARASHIMAHU, 1984). Em geral, supunha-se que com a redução em tempo havia necessidade de se aumentar a concentração enzimática (DOWMAN & COLLINS, 1977; REXEN, 1977; MCLEOD & MINSON, 1978; MASAOKA & TARUMOTO, 1979; DEBOEVER, 1986). Entretanto, deve-se levar em consideração a especificidade sobre os substratos em questão (CLARK & BEARD, 1977; MCLEOD & MINSON, 1982) ao se estabelecer qualquer relação entre concentração enzimática e tempo de reação com atividade celulolítica. (Detalhes na Tabela 4).

Tabela 4 - Recentes propostas da metodologia enzimática para estudos da fração potencialmente digestível.

FORTE BIBLIOGRAFICA	TIPO ALIM	N°	TRAT ADICIONAL	FORTE ENZIMATICA
JARRIGE & THIVEND, 1969	GRAMINEAS, LEGUMINOSAS FENOS, SILAGENS		TANPAO ACETATO	Basidiomiceto
JONES & MAYNARD, 1975	GRAMINEAS LEGUMINOSAS	19 25	HCl 0.1M PEPSINA 0.2% FDN	Trichoderma Basidiomiceto Aspergillus
CLARK & BEARD, 1977	ALIMENTOS COMPOSTOS FORRAGENS	24 23	HCl 0.1M PEPSINA 0.2%	Trichoderma (BDH) Aspergillus (SIGMA)
DOWNHAM & COLLINS, 1977	SILAGENS	22	FDN HCl-PEPSINA	Trichoderma (BDH, ONOZUKA)
KELLNER & KIRCHGESNER, 1977	FORR. CONSERVADAS FORR. FRESCAS	37	HCl 2M + CELULASE + PEPSINA	NAO IDENT
ROUSHAN & HOLLAND, 1977	GRAMINEAS		HCl - PEP-SINA/ FDN/OUTROS	Trichoderma (autante)
ALLISON & BONZUCHI, 1978	BRASSICAS	5	HCl 0.1-0.12M PEPSINA 0.2%	Trichoderma
MCLEOD & HINSON, 1978	GRAMINEAS LEGUMINOSAS	50 32		
MASAKA & TANIMOTO, 1979	SORO (diferentes CV e estagios)			Trichoderma (YAKULTS)
BUSSE, 1980	GRAMINEAS	17	HCl 0.1M PEPSINA 0.2%	Trichoderma (BDH, YAKULTS)
MCLEOD & HINSON, 1982	GRAMINEAS (5 sp) LEGUMINOSAS (3 sp)	50	HCl - PEP-SINA FDN	YAKULTS
DOWNHAM & COLLINS, 1982	FORRAGENS FENOS SILAGENS	16 28 16	HCl 0.1M PEPSINA 0.2% + ASIDEX 50°C/45'	Trichoderma Aspergillus
COTTEN et alii, 1984	ALIMENTOS COMPOSTOS	32	HCl 0.1M PEPSINA 0.2%	Trichoderma (BDH) Aspergillus (SIGMA)
MALOBISINI, FACE & SETTINERI, 1984	GRAMINEAS LEGUMINOSAS	17 13	HCl 0.1M PEPSINA 0.2%	Trichoderma (BDH)
DEBOEVER et alii, 1986	ALIMENTOS COMPOSTOS	40	HCl 0.1M - PEP 24h 0.2% + 45'/50°C	Trichoderma (BDH/YAKULTS)
HADJIPANAYIOTOU, 1987	FORRAGENS PALHAS	5	HCl 0.1-0.75M PEPSINA 0.2%	YAKULTS
VALDES & JONES, 1987	GRAMINEAS LEGUMINOSAS	30 25	HCl 0.1M + PEPSINA 0.2%	Trichoderma
DEBOEVER et alii, 1988	FORR. CONSERVADAS PALHAS	53	HCl 0.1M - PEP 24h 0.2% + 45'/50°C	Trichoderma (BDH) Aspergillus

Trichoderma ==> T.viride; T.reesei
Aspergillus ==> Aspergillus niger
"IN VIVO" ==> Estudos com mercaçoes e/ou coleta de fezes
"IN VITRO" ==> TILLEY-TERRY (microbiologico)
"IN SITU" ==> Saco de "nylon"
ENZIMATICO ==> FDN + CELULASE
HCl-PEPSINA + CELULASE

Tabela 4 - Continuação.

FONTE BIBLIOGRAFICA	CONC (%)	TEMPO	T °C	CD	METODOS DE ESTUDOS
JARRIS & THIVEND, 1969	1	24	40	0.80	"IN VITRO" x ENZIMATICO
JONES & HAYWARD, 1975	(0-2.5) 0.625	48	40	0.96	"IN VIVO" x ENZIMATICO
CLARK & BEARD, 1977				0.60 0.85	"IN VITRO" x ENZIMATICO
DOWNHAM & COLLINS, 1977	1 0.625	24, 48	40	0.85 0.89	"IN VIVO" x ENZIMATICO
KELLNER & KIRCHGESNER, 1977	1	48	40	0.91 0.78	"IN VITRO" x ENZIMATICO
ROUSHAN & HOLLAND, 1977		48	40	0.98	"IN VIVO" x ENZIMATICO
MALLISON & BORZUCHI, 1978	0.6%	48	50	0.95	"IN VIVO" x ENZIMATICO
MCLEDD & MINSON, 1978	0.625 2.5	24, 48	40 50	0.91 0.94	"IN VIVO" x ENZIMATICO
MASADOKA & TARUNOTO, 1979	(0.25-2.0) 1.0%	3, 6, 12 24, 48	40	0.99	"IN VITRO" x ENZIMATICO
BUSSE, 1980	(2-10) 2	24, 48 72		0.95	"IN VITRO" x ENZIMATICO
MCLEDD & MINSON, 1982	2.5	48	50		"IN VIVO" x ENZIMATICO
DOWNHAM & COLLINS, 1982	(1-4) 1%	48	40	0.80 0.90	"IN VITRO" x ENZIMATICO
GOTTSM et alii, 1984					"IN SITU" x ENZIMATICO
MALOSSINI, PAGE & BETTINERI, 1984	0.33	48	40	0.97	"IN VITRO" x ENZIMATICO
DEBOEVER et alii, 1986	1.33 (BDH) 0.33 (YAKULTS)			0.96	"IN VIVO" x "IN VITRO"
HADJIPANAYIOTOU, 1987	0.1	48	40	0.97	"IN VITRO" x ENZIMATICO
VALDES & JONES, 1987	0.5 (0 - 1.5)	48	40	0.92 0.96	"IN VIVO" x ENZIMATICO
DEBOEVER et alii, 1988	1.33	48	40		"IN VIVO" x ENZIMATICO
Trichoderma ==> T. viride; T. reesei Aspergillus ==> Aspergillus niger "IN VIVO" ==> Estudos com marcadores e/ou coleta de fezes "IN VITRO" ==> TILLEY-TERRY (microbiológico) "IN SITU" ==> Saco de "nylon" ENZIMATICO ==> PDH + CELULASE HCl-PEPSINA + CELULASE					

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Fase Pré-experimental

3.1.1. Definições de substratos e fatores de estudo

Os estudos cinéticos dos sistemas celulolíticos serão aplicados às forragens, portanto, não se proporá modificações no tamanho de partículas para as análises laboratoriais. Visando os referidos estudos, inicialmente, tentou-se transformar placas de celulose comercial, em partículas de tamanho definido, em moinhos tipo faca, moinho-bola e moinho-martelo, sem nenhum resultado significativo, principalmente devido as características químicas assumidas após os referidos tratamentos (maior variabilidade em dosagens de açúcares e solubilização).

Procedeu-se então a teste com substratos puros comerciais de tamanho de partículas diferenciadas, fazendo variar os possíveis fatores de estudo, tempo de reação e concentração enzimática. Alguns desses substratos, devido provavelmente a modificações em acessibilidade e cristalinidade, demonstravam maior variabilidade nas leituras colorimétricas. Enquanto que os demais diferiam pouco em reativi-

dade avaliados a 24, 48 e 72 h em relação ao papel de filtro Whatman nº 1 tomado como padrão. Optou-se pela celulose microfina ($\approx 70 \mu\text{m}$) da BLANVER FARMOQUÍMICA LTDA., pela baixa variabilidade nos diferentes ensaios. Praticamente, não se observaram diferenças nas variáveis de estudo (açúcares redutores e solubilização), entre 72, 96 e 120 h. Enquanto as relações enzima/substrato foram determinadas a partir do ensaio auxiliar (D1, 1%; D2, 0,1% peso/volume) (D1, 1:1; D2, 1:10) com tempo fixo, 72 h (Figura 6). Foi testado o efeito da agitação sobre a atividade em alguns ensaios, sem nenhum resultado significativo.

AR - AÇÚCAR REDUTOR
CS - CELULOSE SOLUBILIZADA
Obs.: Média de 3 repetições

Figura 6 - Efeito da diluição enzimática sobre o potencial hidrolítico de três sistemas enzimáticos, obtidos a partir de *Trichoderma reesei* (E1, E2) e de *Aspergillus niger* (E3).

Os materiais referidos na Tabela 5 variam em índice de cristalinidade, entretanto, não se observou diferenças significativas em atividade celulolítica quando comparados aos menos cristalinos. Possivelmente, os tamanhos de partículas comparáveis nos dois substratos (OURO BRANCO, BLANVER), tenham mascarado o efeito de cristalinidade. E ainda, materiais com maior índice de cristalinidade apresentaram maior variabilidade.

Tabela 5 - índice de cristalinidade (I.C.) em celulosas comerciais.

TIPO DE AMOSTRA	ÍNDICE DE CRISTALINIDADE (%)
Ouro - 1	36,30
Ouro - 2	52,40
Ouro - 4	51,80
Celulose microfina (Blanver)	57,60
Celulose microcristalina (Blanver)	71,00
OB-810 (ouro-branco)	56,00
OB-500 (ouro-branco)	43,90
OB-364 (microcristalina)	32,30
Celulose Hércules (Línter)	75,00

I.C. (%) tomado pelo método da triangulação proposto por STEWART & FOSTER (1976).

Além dos substratos puros (celulosas comerciais em pó) para os estudos cinéticos, testou-se a forragem-padrão (napier, 15 dias), procedente do Laboratório de Bromatologia/ESALQ. As interferências de constituintes do conteúdo celular tornaram mais difíceis as dosagens colori-

métricas. A solubilização com tampão citrato (26%) da matéria seca indica valor subestimado do conteúdo celular na forragem-teste (32%). A opção do pré-tratamento da forragem (HCl 0,1N pepsina - 0,2% peso/volume) poderia ser aplicado por 24 h ou 48 h. Após estudos em tempos crescentes (1-48 h), não foram observadas diferenças entre 24 e 48 h, enquanto em intervalos inferiores a 24 h, observou-se solubilização decrescente, com alterações em desvio padrão residual destes e a 48 h. No início da reação (1-3 h) ocorreu mais ou menos 80% da solubilização observada a 24 h. Ainda, testaram-se as concentrações de pepsina, 0,2% e 0,1% peso/volume e não observaram diferença a 24 h e 48 h em matéria solubilizada.

3.1.2. Adaptação da metodologia para o ensaio de identificação bioquímica

A caracterização da beta-endoglucanase e beta-glucosidase nas soluções indicadas na literatura para avaliação de forragens e nas condições padronizadas não apresentavam leituras (solução de carboximetilcelulose e salicina respectivamente a 1% peso/volume em tampão). As condições padronizadas de observação foram 0,5 ml de solução de substrato e 0,5 ml de solução enzimática (1% peso/volume em tampão), em 1 h de reação. Após os estudos cinéticos referentes a primeira fase do trabalho, foram feitas modificações na metodologia (5 ml de solução de substrato + 5 ml de solução

enzimática) para estudos de atividade em alguns dos tempos indicados no ensaio 1 (1 h, 12 h, 24 h, 72 h).

Definições das Variáveis:

Variável 1: Açúcar redutor (mg/ml ou ug/ml)

Variável 2: Solubilização mg CELULOSE/100 mg MS (%)

Variável 3: Atividade específica (ug AR/mg PROT/ml)

Variável 4: Velocidade de Reação (ug AR/min/ml)

(Variáveis avaliadas por experimento)

Estratégia Experimental

1^a FASE: Estudo das condições ótimas para os sistemas enzimáticos de *Trichoderma reesei* (E₁, E₂) e *Aspergillus niger* (E₃).

Ensaio 1: Potencial hidrolítico em função de concentração enzimática e tempo de reação (V₁, V₂, V₃, V₄).

(3) ENZIMAS x (4) CONCENTRAÇÕES x (6) TEMPOS x (3) REPETIÇÕES.

Ensaio 2: Efeito de temperatura, tampão e pH sobre atividade enzimática (V₁ e V₂).

(3) ENZIMAS x (2) TEMP °C x (2) TAMPÕES x (2) pH x (4) REPETIÇÕES

Ensaio 3: Efeito da concentração molar de sódio sobre atividade celulolítica (V₁ e V₂).

(3) ENZIMAS x (3) MOLARIDADES x (3) REPETIÇÕES.

Ensaio 4: Identificação bioquímica de beta endo-glucanase e beta-glucosidase (V₁ e V₄).

(3) ENZIMAS x (2) COMP. BIOQUÍMICOS x (4) TEMPOS x (3) REPETIÇÕES.

2^a Fase: Estudos da fração potencialmente digestível em forragens e alimentos por sistemas *in vitro* (microbiológico e enzimático).

Ensaio 5: Estudos de parede celular por dois métodos (detergente e enzimático) em forragens e alimentos tropicais. MÉTODOS (2) x GRUPOS (4) x REPETIÇÕES (3)

Ensaio 6: Estudos da fração potencialmente digestível em forragens pelos procedimentos gravimétrico e colorimétrico em sistemas *in vitro*.

SISTEMAS (2) x ENZIMAS (2) x PROC. (2) x GRUPOS (4) x REPETIÇÕES (3).

3.2. Material

3.2.1. Substratos

a) Puro e específicos

Na primeira fase do trabalho foi utilizado celulose microfina da BLANVER FARMOQUÍMICA LTDA., para estudos cinéticos dos referidos sistemas celulolíticos. No ensaio de

identificação bioquímica de beta-endo-glucanase e beta-glucosidase foram utilizados respectivamente carboximetilcelulose (grade coarse, 0,7 meq/g MERCK) e salicina para microbiologia (C13 H18 O7, MERCK).

b) Forragens

As amostras foram obtidas no campo de introdução e avaliação de forrageiras do Instituto de Zootecnia, Coordenadoria de Pesquisa Agropecuária, Secretaria de Agricultura do Estado de São Paulo, Nova Odessa/SP, em 25 e 27 de janeiro de 1988, tentando coincidir com a fase do potencial máximo de produção de gramíneas e leguminosas. As forragens conservadas e os resíduos agrícolas foram escolhidos conforme disponibilidade e uso dos referidos na unidade onde foi executado o trabalho, Seção de Avaliação de Forragens, Divisão de Nutrição Animal e Pastagens. Os alimentos são descritos a seguir:

IDENTIFICAÇÃO	NOME CIENTÍFICO	OBSERVAÇÕES
GRAMÍNEAS		
I-1	<i>Pennisetum purpureum</i>	cv Guacu
I-2	<i>Pennisetum purpureum</i>	Roxo
I-3	<i>Pennisetum purpureum</i>	Mineirão
I-4	<i>Paspalum virgatum</i>	(+ 60 dias)
I-5	<i>Paspalum virgatum</i>	(florescido sementeado)
I-6	<i>Setaria splendida</i>	
I-7	<i>Setaria sphacelata</i>	cv. kazungula
I-8	<i>Cynodon dactylon</i>	
I-9	<i>Brachiaria brizantha</i>	

I-10	<i>Brachiaria decumbens</i>	
I-11	<i>Brachiaria ruziziensis</i>	
I-12	<i>Brachiaria humidicola</i>	
I-13	<i>Hyparrhenia rufa</i>	
I-14	<i>Panicum maximum</i>	cv Aruana
I-15	<i>Brachiaria</i> sp (híbrido)	(Tangola)
I-16	<i>Andropogon gayanus</i>	
I-17	<i>Heteropogon gayanus</i>	
I-18	<i>Hemarthria altissima</i>	
I-19	<i>Panicum</i> sp.	
I-20	<i>Panicum maximum</i> x <i>Macrotyloma axillare</i>	
I-21	<i>Brachiaria</i> sp	(consorciado misto)
I-22	<i>Brachiaria humidicola</i> + <i>Macrotyloma axillare</i>	
I-23	<i>Pennisetum purpureum</i> cv Napier	(Padrão)

LEGUMINOSAS

II-1	<i>Macrotyloma axillare</i>	
II-2	<i>Macroptilium atropurpureum</i>	
II-3	<i>Pueraria phaseoloides</i>	
II-4	<i>Neonotonia wightii</i>	
II-5	<i>Neonotonia wightii</i>	(folhas danificadas)
II-6	<i>Vigna marina</i>	
II-7	<i>Desmodium</i> sp	
II-8	<i>Stylosanthes hamata</i>	(início florescimento)
II-9	<i>Stylosanthes macrocephala</i>	
II-10	<i>Leucaena leucocephala</i>	(folhas)
II-11	<i>Leucaena leucocephala</i>	(hastes)
II-12	<i>Galactia striata</i>	
II-13	<i>Centrosema pubescens</i> cv. Deodoro	
II-14	<i>Centrosema virginianum</i>	

FORRAGENS CONSERVADAS

III-1	Silagem milho (IZ/1987)
III-2	Silagem milho (IZ/1988)
III-3	Silagem milho (Nestlé)

III-4	Silagem sorgo (IZ/1986)
III-5	Feno de soja perene (IZ/1986)
III-6	Feno de colônia (IZ/1988)
III-7	Feno de <i>coast-cross</i> (ESALQ/1988)
III-8	Feno de soja perene (IZ/1988)
III-9	Feno de alfafa (IZ/1988)
III-10	Feno de <i>rhodes</i> (IZ/1988)

RESÍDUOS AGRÍCOLAS

IV-1	Bagago de cana <i>in natura</i> (Usina Costa Pinto, 1989)
IV-2	Bagago autohidrolisado (Usina Costa Pinto, 1989)
IV-3	Bagago autohidrolisado + vinhaça + levedura (IZ/1987)
IV-4	Bagago autohidrolisado + vinhaça + lactato de amônio (IZ/1987)
IV-5	Casca de Arroz (IZ/1988)
IV-6	Subproduto da limpeza do arroz (IZ/1988)
IV-7	Palha e sabugo de milho (IZ/1988)
IV-8	Bagago de cana <i>in natura</i> , fermentado no laboratório (IZ/1989)

3.2.2. Reagentes e Soluções

a) Tampões

* Saliva Artificial de MCDOUGAL
 g/l (Solução-tampão)
 9,80 Bicarbonato ácido de sódio
 3,71 Fosfato dibásico de sódio
 0,57 Cloreto de potássio
 0,47 Cloreto de sódio
 0,12 Sulfato de magnésio
 40,00 (Solução de cloreto de cálcio, 100 ml)

* Tampões para celulase

g/l	
10,505	0,05M Ácido citrico
21,01	0,1M
105,05	0,5M
14,705	0,05 M Citrato de sódio
29,41	0,1 M
147,05	0,5 M.
2,9 (ml)	0,05M Ácido acético glacial
6,8	0,05M Acetato de sódio

b) Solução Detergente Neutro (VAN SOEST & ROBERTSON, 1980)

qtde/l	
30,00 g	Laurilsulfato de sódio
18,61 g	Etilenodiaminotetraacetato dissódico
6,81 g	Borato de sódio decahidratado
4,56 g	Fosfatobisódicoanidro
10,0 ml	Etoxietanoletilenoglicol

c) Solução HCl-Pepsina

qtde/l	
200,0 ml HCl	20% peso/volume (2,4 N)
8,5 ml HCl	0,85% peso/volume (0,1 N)
50,0 g	Pepsina 1:10000, 5% peso/volume
2,0 g	Pepsina 1:10000, 0,2% peso/volume

d) Enzimas celulolíticas

Celulações de *Trichoderma reesei*, dos laboratórios, NOVO INDUSTRI DO BRASIL IND. E COM. LTDA (Enzima 1) e BIOBRÁS, BIOQUÍMICA DO BRASIL S/A. (Enzima 2).

Celulase de *Aspergillus niger*, da BIOCON DO BRASIL INDUSTRIAL LTDA. (Enzima 3).

e) Solução de DNS (MILLER, 1959)

19,8 g	Hidróxido de Sódio
306,0 g	Tartarato de sódio e potássio
8,3 g	Metabissulfito de sódio
10,6 g	Ácido 3,5 dinitrosalicílico
7,6 ml	Fenol (aquecido a 50°C)
1416,0 ml	Água destilada

f) Inóculo ruminal

O inóculo foi obtido de um novilho mestiço, arraçoado sob nível de manutenção, uma vez ao dia, basicamente com silagem de milho/1987. Mantido em baia individual e sob as condições normais para avaliações *in vitro* pela técnica convencional (Tilley & Terry), rotina do laboratório da Seção de Avaliação de Forragens/I.Z.

3.3. Métodos

3.3.1 Coleta e preparo de forragens

Foi jogado o quadrado para a amostragem do material forrageiro, obtido da planta inteira, com corte acima de 10 cm do chão no caso de cespitosas, com algumas exceções para as de crescimentos diferentes e arbustos. Os cortes foram feitos em dias estiados, intercalados por um dia chuvoso, no horário das 9:00 às 11:00 h. Após a pesagem,

o material foi picado e acondicionado em sacos plásticos identificados, e imediatamente levadas ao laboratório para secagem em estufas a 50°C com ventilação forçada por pelo menos dois dias até a constância de peso final. Em seguida, moídas em moinho-faca do tipo *Willey-Mill* com peneira 1,0 mm (40 mesh) e estocadas em vidros apropriados. Os resíduos agrícolas e forragens conservadas foram submetidos a primeira secagem somente quando necessário (umidade alta). Todos os alimentos foram submetidos a segunda secagem, em estufas a 105°C , com ventilação forçada, por pelo menos 24 h, para as devidas correções dos valores finais obtidos.

3.3.2. Preparo de tampões e soluções

Os tampões para soluções enzimáticas foram preparados pelo menos na mesma semana de uso, tentando evitar contaminações, e mantidos em geladeira ($0-4^{\circ}\text{C}$). Procedeu-se a uma titulação com o ácido na concentração desejada (0,05 M; 0,1 M e 0,5 M) até atingir o pH desejado (4,8) na base. Para 500 ml de base gastaram-se de 320-330 ml de ácido. Os reagentes foram mantidos à temperatura ambiente antes do preparo. Executou-se tal procedimento com o auxílio de bureta graduada (50 ml), agitador magnético e potenciômetro aferido a pH 4,01 e pH 7,01 com os respectivos padrões.

A ordem de adição dos reagentes individualmente na solução de DNS seguiu àquela indicada no item 3.2.2. (E), o que facilitou suas solubilizações. As demais soluções não apresentaram problemas com relação ao seu preparo.

3.3.3. Determinações gravimétricas

As amostras de celulose e/ou forragens pré-secas, após pesagens em balanças analíticas foram submetidas às respectivas reações com enzimas, com inóculo ruminal e outros. Foram em seguida filtradas em cadinhos (porosidade 1 e 2), previamente tarados, com o auxílio de bomba de vácuo. Em seguida, foram secas em estufas a 105°C, com ventilação forçada para forragens, por pelo menos 24 horas. As pesagens finais foram realizadas após a estabilização das amostras nos respectivos cadinhos, por pelo menos 1h em dessecador com sílica-gel, para equilíbrio de temperatura.

3.3.4. Determinações colorimétricas

a) Dosagens de açúcares redutores de acordo com o método proposto por MILLER, 1959.

A partir de uma solução-padrão de glucose (1 mg/1 ml) em tampão padronizado, prepararam-se alíquotas em duplicatas, fazendo variar de 0,0 a 1,0 mg em 22 tubos (11 pontos). As amostras de hidrolisados com substratos puro, específicos e forragens, foram diluídas em 1 ml, de acordo com a expectativa de leitura. Antes de cada grupo de análises, procedeu-se a determinação de uma reta-padrão (Figura 7), inclusive com o objetivo de zerar o colorímetro com o branco (solução tampão sem açúcares).

Procedimento:

1. Foi retirada uma alíquota da amostra previamente resfriada e completou-se a 1 ml com tampão.
2. Foram adicionados 3 ml da solução de DNS com dispensador automático.
3. Ferveu-se por 5 min em banho-maria.
4. Esfriou-se e adicionaram-se 15,5 ml de água destilada com dispensador automático.
5. Homogeneizou-se por 15 min em agitador tipo BURREL, com aproximadamente 240 rpm.
6. Leu-se em colorímetro BAUSCH & LOMB, SPETRONIC 20, a 540 nm, em luz visível zerado continuamente com o branco da reta-padrão, dentro de 6 h após a etapa 3.
7. Aceitou-se toda diluição em hidrolisados e brancos de tratamentos (tampão + enzima) que mostraram leitura em absorvância na faixa de 0,2 a 0,9 mg glucose/ml na reta padrão.
- 8) Procedeu-se ao seguinte tratamento matemático dos dados:

$$C \text{ (mg/ml)} = (1,0783 + 0,0402A) \times \text{Diluição}$$

Figura 7 - Reta padrão de glucose para dosagem de açúcares redutores (DNS).

b) Dosagens de proteínas totais de acordo com o método proposto por LOWRY *et alii*, 1954.

Foram feitas pelo método do FOLIN-CIOCALTAU, que consiste na reação do biureto com o íon Cu^{++} em meio alcalino e redução do reagente fosfomolibdico e fosfotungstênico pelo triptofano e tirosina.

3.3.5. Determinações da parede celular

a) Pelo sistema detergente neutro (VAN SOEST & ROBERTSON, 1980).

Colocaram-se amostras pré-secas de forragens (1,00 g) em tubos apropriados de um bloco digestor. Adicio-

naram-se 100 ml da solução detergente neutro e aqueceu-se até fervura. Manteve-se por 60 min nessas condições, com sistema de refluxo do vapor, em seguida, filtrou-se e lavou-se com água quente (3x) e acetona (2x). Os cálculos foram tomadas por diferenças de pesagens em duplicata para cada repetição.

b) Pelo sistema enzimático

Colocaram-se amostras de forragens pré-secas (0,5 g) em tubos de ensaios. Foram umedecidas com água destilada e adicionaram-se 50 ml de uma solução de HCl 0,1 N com pepsina 0,2% peso/volume. Manteve-se em banho-maria, previamente aferido a 40°C por 24 h. O resíduo foi filtrado em cadinhos e lavado com água quente (2x). O procedimento de cálculo de insolubilização foi o mesmo descrito no item a).

3.3.6. Determinações de digestibilidade pela técnica convencional (TILLEY & TERRY, 1963).

As coletas de inóculo ruminal foram obtidas sempre à mesma hora nos respectivos ensaios (8:00 - 8:30 h), de um animal-doador em jejum de alimento (12 h). As amostras foram feitas em diferentes pontos do rúmen evitando-se tanto os locais mais profundos quanto os mais superficiais. O fluido ruminal foi coado em 4 camadas de gase e transportado até o laboratório em garrafas térmicas pré-aquecidas a 40°C. Imediatamente antes do uso, foi coado novamente em 4

camadas de gase e adicionado ao tampão (saliva artificial de MCDOUGAL) já aquecido e homogeneizado.

As amostras de forragens (0,5 g) foram colocadas em tubos de digestão (± 80 ml). O tampão foi aquecido antes do uso (39°C), quando adicionou-se 1 ml da solução de CaCl_2 (4% peso/volume) e homogeneizado por 15 min com borbulhamento constante de CO_2 . Em seguida, colocou-se o inóculo na proporção requerida e manteve-se o borbulhamento e aquecimento por 15 min. A adição de saliva artificial (40 ml) e inóculo (10 ml) foi precedida pelo umedecimento do material forrageiro com água destilada (1-2 ml). Imediatamente após a adição da saliva e inóculo, os tubos foram arrolhados e mantidos em banho-maria (39°C) por 48 h. Interrompeu-se a reação adicionando-se alíquotas de 1 ml de HCl a 20% (2,4 N), agitando-se vagarosamente os tubos para evitar borbulhamento (cada tubo recebeu 6 ml de HCl). Em seguida, adicionaram-se 2 ml de uma solução de pepsina a 5% peso/volume em 100 ml de água destilada. Após 48 h de reação, a partir do horário do início da 1^a fase, o material foi retirado, filtrado e lavado com água quente. Parte dos tubos foi mantido em geladeira até a filtragem. O resíduo foi então seco em estufa a 105°C por 24 h com ventilação forçada e pesado após a estabilização em dessecador (± 1 h). Os cálculos foram obtidos por diferença de pesagens considerando inclusive os brancos (n = 4) por *batch*. As análises foram tomadas em duplicatas para cada repetição.

3.3.7. Determinações de digestibilidade pela técnica enzimática

As soluções enzimáticas foram preparadas imediatamente antes do seu uso, e a concentração expressa em relação ao tampão, por peso/volume ou volume/volume quando se tratava de enzima em pó ou líquida, respectivamente. Para a homogeneização no tampão, as soluções foram postas em agitação por 15 min.

Os substratos puros (100 mg:10 ml solução) e forragens (200 mg:20 ml) para análise foram colocados em tubos de ensaio (50-80 ml) nas respectivas grades para a hidrólise. Um sistema *batch* foi usado, tomando-se amostras de hidrolisados nos respectivos tempos, de acordo com os tratamentos aplicados. Foram adicionadas 2 gotas de tolueno/tubo com substrato puro e 4-5 gotas/tubo com forragens. Os tubos em triplicatas para substratos puros e duplicatas para forragens foram casualizados aos tratamentos em cada repetição. Após a hidrólise, os tubos foram retirados do banho e resfriados rapidamente. Aguardou-se pelo menos 2 h para a centrifugação a 3000 rpm por 10 min para substrato puro e 15 min para forragens. Procedeu-se a amostragem do sobrenadante (5-10 ml), que foi estocado em vidros identificados, com 1-2 ml de tolueno. Mantidos em geladeira até a leitura colorimétrica, procedida dentro de 2 semanas, quando as amostras receberam mais tolueno e foram congeladas.

As forragens antes do tratamento com celulase foram submetidas à solubilização com pepsina, 0,2% peso/volume, em HCl 0,1N, por 24 horas, a 40°C. Após o ajuste do pH (1,5 --> 4,8) com 5 ml de citrato de sódio (0,5 M), as amostras foram centrifugadas, e com o auxílio de bomba de vácuo num sistema de válvulas em quitassato, retirou-se o sobrenadante.

O tratamento com celulase (1% peso/volume, 72 h) equiparou o procedimento enzimático ao sistema convencional (microbiológico) na detecção de matéria seca digestível (96 h.). A quantidade da solução enzimática adicionada nesta fase foi determinada em relação à quantidade de amostra pré-seca inicial. Após a centrifugação e a amostragem (5-10 ml), os resíduos foram filtrados e lavados com água quente. As determinações foram tomadas por diferença considerando os brancos (n = 2) por *batch* para as avaliações gravimétricas e colorimétricas.

3.3.8. Procedimento estatístico

Para o ensaio 1 foram feitas tentativas de ajustes por equações linear e não-lineares para os dados. Os modelos não-lineares testados objetivaram detectar uma possível regressão assintótica (SNEDECOR & COCHRAN, 1972). Os modelos testados foram:

M1: LINEAR	$Y = A + BX$
M2: LOGARÍTMICO	$Y = A (B^x)$
M3: QUADRÁTICO	$Y = A + BX + CX^2$
M4: GOMPERTZ	$Y = \text{EXP} (A + B \rho^x)$

Os ensaios preliminar, 2, 3 e 4 foram discutidos com análise gráfica. Para as análises de dados com forragens, nos ensaios 5 e 6, respectivamente, aplicaram-se três modelos de equações (M₁, M₂, M₃). Na avaliação do ensaio 6 procedeu-se a uma análise de covariância para teores de parede celular pelos dois possíveis métodos (detergente x enzimático) na tentativa de ajustar o modelo. As análises da(s) covariável(is) foram avaliadas pelos seus valores e significância do F. As equações foram escolhidas a partir dos valores e significâncias do F para análises de regressão (M₁, M₂, M₃). Os modelos de equações foram definidos com base nos coeficientes de determinação, assumindo-se no mínimo diferenças na ordem de 4 unidades percentuais, para a discussão dos tratamentos. As análises foram executadas pelo S.A.S. (*General Linear Models*).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ensaio 1

A primeira fase do trabalho teve como objetivo observar alguns fatores que interferem no comportamento cinético das enzimas alostéricas celulolíticas. Na fase pré-experimental, algumas condições foram padronizadas, como por exemplo, concentração mínima e tempo máximo de reação. Outros fatores, como tamanho de partículas e índice de cristalinidade no substrato-teste são conhecidos em relação a alguns materiais disponíveis e constam na Tabela 5 (Material e Métodos). Os resultados obtidos no ensaio auxiliar são mostrados na Figura 6 (Material e Métodos), a concentração enzimática foi manipulada na relação 1:10 e 1:1 do referido substrato com tempo fixo (72 h) e os resultados demonstram que as enzimas 1 e 2 de *Trichoderma reesei* são menos sensíveis ao referido tratamento em relação à de *Aspergillus niger*, enzima 3. Os resultados da literatura sugerem grande interesse em aumentar a eficiência hidrolítica nos substratos lignocelulósicos, por manipulações na concentração enzimática (até 10% peso/volume, BUGGE, 1980). Aparentemente, o potencial máximo hidrolítico difere nos distintos sistemas enzimáticos.

O referido estudo foi executado em esquema fatorial, inteiramente casualizado, com 4 níveis de concentrações (C1, 1:1; C2, 2:1; C3, 4:1; C4, 8:1) e 6 de tempos (3, 6, 12, 24, 48 e 72 h), com o intuito de se conhecer melhor as interações dos fatores de estudo nos respectivos sistemas celulolíticos.

Os dados ajustados conforme modelos matemáticos (descritos no item 3.3.8) tiveram o objetivo de distinguir melhor a possível assíntota descrita na Figura 8A, 8B, 8C e 8D para as respectivas variáveis. Observa-se através dos valores e significância de F e coeficientes de determinação descritos na Tabela 1 (Apêndice), que esta assíntota corresponde a um limite potencial do substrato e dos sistemas celulolíticos, e ainda, o M2 (logarítmico) descreve melhor os dados obtidos nas diferentes variáveis.

Com base nas Figuras 8A, 8B, 8C e 8D, observa-se que na concentração à 1% (relação 1:1 de enzima/substrato) atingiu-se o referido limite, descrevendo o mecanismo hidrolítico nas condições de estudo. É possível que na faixa entre 1:10 e 1:1, atinja-se a concentração-enzimática limite do ponto de saturação dos sítios catalíticos e moduladores dos diferentes componentes bioquímicos.

TRAT	EQUACAO	Coef. Determ.	√QMR(8y.x)
E1C1	$I(AR) = 0.5090 + 0.3994 I(t)$	0.9823	0.06
E2C1	$I(AR) = 0.1240 + 0.4505 I(t)$	0.9669	0.09
E3C1	$I(AR) = -0.1026 + 0.5243 I(t)$	0.9376	0.15
E3C2	$I(AR) = -0.0531 + 0.5526 I(t)$	0.8972	0.21
E3C3	$I(AR) = 0.0268 + 0.5407 I(t)$	0.8970	0.21

Variável 1, Açúcar redutor (média de três repetições).

Figura 8A - Potencial hidrolítico em função de concentração enzimática e tempo de reação, em três sistemas enzimáticos obtidos a partir de *Trichoderma reesei* (E₁ e E₂) e de *Aspergillus niger* (E₃).
C₁; C₂; C₃ ⇒ 1% P/V; 2% P/V; 4% P/V.

TRAT	EQUACAO	Coef. Determin.	$\sqrt{QMR(Sy.x)}$
E1C1	$I(CS) = 3.0601 + 0.3013 I(t)$	0.9559	0.07
E2C1	$I(CS) = 2.6637 + 0.3590 I(t)$	0.9456	0.10
E2C2	$I(CS) = 2.5143 + 0.3944 I(t)$	0.8892	0.16
E2C3	$I(CS) = 1.3578 + 0.6694 I(t)$	0.8511	0.32
E3C1	$I(CS) = 2.8734 + 0.3392 I(t)$	0.8704	0.15
E3C2	$I(CS) = 3.1078 + 0.3007 I(t)$	0.9482	0.08
E3C2	$I(CS) = 3.3068 + 0.2730 I(t)$	0.9539	0.07

Variável 2, Teor de solubilização (média de três repetições).

Figura 8B - Potencial hidrolítico em função de concentração enzimática e tempo de reação, em três sistemas enzimáticos obtidos a partir de *Trichoderma reesei* (E1 e E2) e de *Aspergillus niger* (E3).
C1; C2; C3 $\Rightarrow$ 1% P/V; 2% P/V; 4% P/V.

TRAT	EQUACAO	Coef. Determ.	$\sqrt{\text{QMR}(\text{sy.x})}$
E1C1	$I(\text{ATESP}) = 5.9023 + 0.3993 I(t)$	0.9805	0.06
E1C2	$I(\text{ATESP}) = 5.3546 + 0.4035 I(t)$	0.9318	0.12
E2C1	$I(\text{ATESP}) = 5.2625 + 0.4504 I(t)$	0.9577	0.11
E2C2	$I(\text{ATESP}) = 4.5971 + 0.4427 I(t)$	0.9388	0.13
E3C1	$I(\text{ATESP}) = 4.2589 + 0.5239 I(t)$	0.9187	0.17
E3C2	$I(\text{ATESP}) = 3.7489 + 0.5535 I(t)$	0.8894	0.22

Variável 3, Atividade específica (média de três repetições).

Figura 8C - Potencial hidrolítico em função de concentração enzimática e tempo de reação, em três sistemas enzimáticos obtidos a partir de *Trichoderma reesei* (E1 e E2) e de *Aspergillus niger* (E3).
C1; C2; C3 $\Rightarrow$ 1% P/V; 2% P/V; 4% P/V.

TRAT	EQUACAO	Coef. Determ.	$\sqrt{QMR(Sy.x)}$
E1C1	$I(VELOC) = 3.3233 - 0.6009 I(t)$	0.9920	0.06
E2C1	$I(VELOC) = 2.9383 - 0.5496 I(t)$	0.9776	0.09
E3C1	$I(VELOC) = 2.7110 - 0.4756 I(t)$	0.9248	0.15
E3C2	$I(VELOC) = 2.7630 - 0.4482 I(t)$	0.8510	0.21
E3C3	$I(VELOC) = 2.8392 - 0.4589 I(t)$	0.8619	0.21

Variável 4, Velocidade de reação (média de três repetições).

Figura 8D - Potencial hidrolítico em função de concentração enzimática e tempo de reação, em três sistemas enzimáticos obtidos a partir de *Trichoderma reesei* (E₁ e E₂) e de *Aspergillus niger* (E₃).
C₁; C₂; C₃ ⇒ 1% P/V; 2% P/V; 4% P/V.

Paralelamente, observou-se também que por aumento em concentração ou na relação enzima/substrato, não se detectou aumento em atividade celulolítica com exceção da enzima 3 (de *Aspergillus niger*). Os dados indicam certa regularidade da atividade no tempo, nas diferentes concentrações de estudo, sugerindo que o fator tempo tem importância fundamental nos estudos de mecanismos hidrolíticos. A resposta diferenciada na enzima 3 possivelmente está indicando alterações na relação entre os tamanhos médios de partículas da enzima e do substrato, o que altera a acessibilidade das referidas enzimas aos respectivos substratos. GOEL & RAMACHANDRAN (1983) descreveram que o tamanho ideal de partículas do substrato é de 63 μm , indicando que a partir deste valor o tamanho de partículas do substrato pode interferir com o potencial hidrolítico dos sistemas celulolíticos, principalmente nos tempos iniciais em condições variantes da saturação. Apesar das diferenças observadas quanto a concentração enzimática, foram estabelecidas condições comparativas (1% peso/volume) para os demais estudos nos três sistemas enzimáticos.

As técnicas para determinação de área acessível e tamanho de partículas em substratos não são tão simples. De ordem prática, a questão pode ficar mais difícil, principalmente, porque os tratamentos e formas naturais dos substratos lignocelulósicos diferem enormemente em acessibilidade, inclusive promovendo alterações significativas em formas tridimensionais da parede celular (GOEL & RAMACHAN-

DRAN, 1983; WEIMER & WESTON, 1985; ROLZ *et alii*, 1986). Até 10% de lignina no substrato teste o efeito sobre a acessibilidade é mínimo, conforme demonstraram GOEL & RAMACHANDRAN (1983).

A concentração enzimática máxima de 8% foi desprezada das análises estatísticas em virtude dos resultados obtidos em celulose solubilizada. Em função principalmente do aumento em concentração enzimática houve um decréscimo significativo da celulose solubilizada (Figura 8B). Comparando-se as três enzimas do referido estudo, pode-se supor que a enzima 2 apresenta menor grau de pureza, contaminantes que interferem nos resultados, principalmente, nos tempos iniciais de estudo.

Na variável açúcar redutor (Figura 8A) nas enzimas 1 e 2, não se detectou tal efeito, sugerindo a confiabilidade do DNS nos estudos relativos a concentração e tempo. Alguns estudos preliminares foram desenvolvidos para reconhecer a necessidade de brancos (tampão + enzima) por tratamentos. Devido ao grande número de tratamentos, decidiu-se optar pelo uso de brancos nas diferentes concentrações, com tempo fixo (72 h), apesar de se reconhecer a necessidade de seu uso em cada tempo, principalmente, para corrigir os dados da variável 2, solubilização (Figura 8B).

Observou-se ainda que a variável atividade específica (Figura 8C) decresceu acentuadamente em função de concentração enzimática nos diferentes sistemas enzimáticos. A enzima 3 apresentou elevadas concentrações de proteínas

totais, quando comparada com as enzimas 1 e 2, entretanto a atividade celulolítica mostrou-se semelhante para tais comparações. O sistema hemicelulolítico da enzima 3 pode estar afetando de alguma forma as interpretações dos estudos com os sistemas celulolíticos.

A variável velocidade de reação (Figura 8D) sugeriu que o acúmulo do produto final interferiu na atividade dos sistemas enzimáticos em condições *batch*. A velocidade decresceu até o limite potencial do sistema celulolítico no referido substrato, conforme descreve a Figura 8D, atingindo o máximo de inibição a 72 h. A relação interdependente dos componentes individuais será melhor descrita no ensaio 4. Conforme descreveu TAKAGI (1984), a remoção do produto final por algum processo biotecnológico resulta em aumento da eficiência do processo hidrolítico. Outra forma de aumentar a eficiência do processo é a adição de soluções enzimáticas ricas em beta-glucosidase; entretanto, algumas análises laboratoriais confirmaram aumento em aproximadamente 10% nas solubilizações, sem observações correspondentes em açúcares redutores. Ao se transporem as referidas informações para os substratos naturais (forragens), frequentemente a eficiência é reduzida, conforme demonstraram CROUGHAN & HOLLAND, 1977), principalmente devido ao efeito associado da lignificação e da cristalinidade.

A lignina e o caráter cristalino dos diferentes materiais lignocelulósicos provavelmente atuam inativando os sítios catalíticos e moduladores de forma reversível

e/ou irreversivelmente, das respectivas enzimas do estudo. Ao serem removidas ou modificadas tais estruturas, os efeitos podem ser minimizados. Alterando-se a acessibilidade dos substratos às respectivas enzimas, promovem-se modificações de especificidade e/ou alterações no processo hidrolítico, sem se conhecer efetivamente as características físico-químicas dos substratos envolvidos (GOEL & RAMACHANDRAN, 1983; DAVID *et alii*, 1986).

Em síntese, a lignina atua como barreira física ao processo hidrolítico e o mecanismo de inibição, apesar de bastante estudado, é pouco conhecido por não se dispor de metodologias apropriadas para sua caracterização (BARTON, 1988; REEVES, 1988). A lignina ainda pode atuar diferentemente nos distintos componentes bioquímicos dos sistemas enzimáticos. Por outro lado, a cristalinidade confere variações em grau de polimerização atuando como modificadores de especificidade, limitando a reação nos substratos em questão (WEIMER & WESTON, 1985; ROLZ *et alii*, 1986).

A inibição por produtos intermediários dos diferentes componentes bioquímicos não apresenta uma forma usual de inibição. Assim não se pode descrever o mecanismo pelas formas gráficas convencionais (competitiva e não competitiva) de estudo (LEHNINGER, 1988) devido principalmente a especificidade e potência enzimática e diferentes níveis de inibição. A lignina e o caráter cristalino dos materiais lignocelulósicos conferem o heterotropismo, configurado para as referidas enzimas alostéricas.

Ensaio 2

Após fixar o limite potencial ou a assíntota como a extensão máxima de solubilização, a 72 h, foram planejados alguns tratamentos visando observar efeitos de outros fatores determinantes da atividade celulolítica. E ainda, o comportamento cinético em pH semelhante ao do rúmen.

Neste segundo ensaio, foram estudados os seguintes fatores: temperatura (40°C e 50°C), tampões (citrato e acetato de sódio) e pH (4,8 e 6,5), tomando-se como referência o potencial de solubilização máxima, atingido no ensaio 1. As variáveis 3 e 4 não foram avaliadas neste ensaio, por serem mais importantes em estudos com concentração e tempo, e também por serem medidas compostas a partir da variável 1.

Os efeitos dos tampões citrato e acetato de sódio 0,05 M não diferiram entre si nas variáveis 1 e 2 (Figuras 9A e 9B). Não houve diferenças significativas entre as temperaturas avaliadas para os diferentes sistemas celulolíticos. Em pH 6,5 observou-se uma redução de aproximadamente metade do potencial hidrolítico em relação ao pH ótimo no tampão citrato. As respostas foram semelhantes para os sistemas de *Trichoderma reesei*, enquanto que no de *Aspergillus niger*, em pH 6,5, a redução foi mais marcante a 50°C. Ao contrário, a 40°C e pH 6,5, o sistema celulolítico de *Aspergillus niger* mostrou alguma atividade, indicando possivelmente condições para expressão de atividade hemicelulolítica, certamente em condições de subavaliação por problemas

metodológicos (substratos inadequados e dosagens de açúcares redutores pelo DNS). De acordo com as informações obtidas junto as fontes de substratos e sistemas enzimáticos, o de *Aspergillus niger* usado no referido estudo contém hemicelulase e o substrato-teste não é puro.

AR - AÇÚCAR REDUTOR
Obs.: Média de 4 repetições

Variável 1, Açúcar redutor.

Figura 9A - Efeito da temperatura, tampão e pH sobre o potencial hidrolítico, em três sistemas enzimáticos obtidos a partir de *Trichoderma reesei* (E1, E2) e de *Aspergillus niger* (E3).

CS - CELULOSE SOLUBILIZADA
Obs.: Média de 4 repetições

Variável 2, Teor de solubilização.

Figura 9B - Efeito da temperatura, tampão e pH sobre o potencial hidrolítico, em três sistemas enzimáticos obtidos a partir de *Trichoderma reesei* (E1, E2) e de *Aspergillus niger* (E3).

Os referidos fatores podem interferir sobre a atividade celulolítica, entretanto, o mecanismo mais provável seria por desnaturação, como no caso do pH (pI). A temperatura pode dar confundimento no efeito pelos componentes

bioquímicos do sistema celulolítico e hemicelulolítico diferirem quanto a temperatura ótima, principalmente, em função dos microrganismos que os produzem (DURAND *et alii*, 1984; DEKKER, 1985).

Para observações do efeito destas enzimas sobre o metabolismo ruminal (DANIELS & HASHIM, 1977; ROLZ *et alii*, 1986), sugere-se melhores estudos, em condições mais apropriadas, pois o pH 6,5 não desnaturou completamente os sistemas celulolíticos. Outros fatores podem interferir, observando os resultados com tampão acetato, o efeito do pH foi minimizado em relação ao tampão citrato, a 40 e 50°C, conforme descrito anteriormente. Possivelmente, as condições ruminais podem apresentar interações bioquímicas com os sistemas enzimáticos do referido estudo.

Ensaio 3

O ensaio 3 visou obter o efeito da concentração molar de sódio nas condições definidas nos estudos anteriores em três níveis (M1, 0,05 M; M2, 0,1 M e M3, 0,5 M) para os três sistemas celulolíticos. Não foram detectadas diferenças entre M1 e M2, entretanto o efeito foi notório em M3. Os dados sugerem que possivelmente o íon Na^{++} interferiu sobre o potencial hidrolítico dos sistemas celulolíticos em estudo (Figura 10), corroborando com as observações de GROUS *et alii* (1985); MANONMANI & SREEKANTIAH (1987) em substratos puros e naturais.

AR - AÇÚCAR REDUTOR
CS - CELULOSE SOLUBILIZADA
Obs.: Média de 3 repetições

Figura 10 - Efeito da concentração molar de sódio sobre o potencial hidrolítico, em três sistemas enzimáticos obtidos a partir de *Trichoderma reesei* (E1, E2) e de *Aspergillus niger* (E3).

O interesse prático nesse estudo foi de verificar a possibilidade de se preparar as soluções enzimáticas diretamente, com o acerto de pH (1,5 → 4,8) para a fase 2 (celulase) já adicionar uma base com concentração necessária para atingir o pH ideal (4,8). Os resultados não mostraram-se favoráveis a tal possibilidade, assim deve-se levar em

consideração que o pH interfere na estabilidade das enzimas. Os dados sugeriram então que o acerto de pH pode ser feito com citrato de sódio 0,5M (5 ml), e após a centrifugação e a remoção do sobrenadante, adicionaram-se as soluções enzimáticas num tampão citrato 0,05M com pH (4,8).

Ensaio 4

A modificação proposta na metodologia para as dosagens de açúcares redutores em soluções enzimáticas com substratos específicos visou obter o comportamento cinético de dois componentes bioquímicos nos sistemas celulolíticos (beta-endoglucanase e beta-glucosidase). Os dados apresentados referem-se a atividade molecular (açúcar redutor ug/ml) e velocidade de reação (ug AR/min/ml) em função de 4 tempos (1h, 12 h, 24h, 72h), considerando tempo como fator determinante da atividade celulolítica, nas condições pré-fixadas de estudo.

As propostas referentes a tempo de reação mostram ser adequadas para as referidas enzimas; no caso de beta-glucosidase, a atividade a 1 h mostrou seu potencial máximo, entretanto, por ser o componente mais fortemente inibido pelo produto final, apareceu o referido efeito no sistema *batch* (Figuras 11A, 11B e 11C). No caso de identificação por unidades internacionais (UI), deve-se tomar cuidado nas interpretações mais práticas.

Enzima 1, E1 (média de três repetições).

Figura 11A - Identificação bioquímica de beta-endoglucanase e beta-glucosidase, em três sistemas enzimáticos obtidos a partir de *Trichoderma reesei* (E1, E2) e de *Aspergillus niger* (E3).

Enzima 2, E2 (média de três repetições).

Figura 11B - Identificação bioquímica de beta-endoglucanase e beta-glucosidase, em três sistemas enzimáticos obtidos a partir de *Trichoderma reesei* (E1, E2) e de *Aspergillus niger* (E3).

O potencial de beta-endoglucanase nos dois sistemas celulolíticos de *Trichoderma reesei* E1 e E2 (Figuras 11A e 11B) demonstrou comportamento semelhante. Entretanto, o de *Aspergillus niger*, E3 (Figura 11C) mostrou-se diferenciado a 1 h. evidenciando inibição pelo produto final nos tempos subsequentes.

Enzima 3, E3 (média de três repetições).

Figura 11C - Identificação bioquímica de beta-endoglucanase e beta-glucosidase, em três sistemas enzimáticos obtidos a partir de *Trichoderma reesei* (E1, E2) e de *Aspergillus niger* (E3).

Os sistemas diferiram quanto ao potencial de beta-glucosidase: a enzima 1 apresentou potencial de atividade mais elevado que a enzima 2, entretanto a 1 e a 3 não pareceram diferir com relação a esta característica. A beta-glucosidase de *Aspergillus niger* parece ter comportamento semelhante à de *Trichoderma reesei*, no que se refere ao mecanismo de inibição por produto final, ao serem avaliados conjuntamente, potenciais máximos e velocidade de reação.

A exemplo dos estudos de mecanismos hidrolíticos com enzimas purificadas ou não (DURAND *et alii*, 1984; DEKKER, 1986), os problemas inerentes às enzimas alostéricas devem ser considerados, inclusive tomando-se o fator tempo como determinante da atividade.

Outros experimentos sugeriram que a inibição clássica por glucose em beta-glucosidase de *Aspergillus niger* e *Trichoderma reesei* (ENARI, 1983; DEKKER, 1986) é diferente, conforme mostram os resultados da Tabela 6. O referido componente é bastante susceptível à modificações genéticas, o que parece estar envolvido nos resultados das enzimas em estudo. Sugere-se então que essas enzimas sejam melhor caracterizadas, inclusive com maior controle nas fontes (microrganismos, laboratórios e procedimento de obtenção).

Tabela 6 - Constante de Michaelis-Menten (K_m) e Constante de Inibição (K_i) para beta-glucosidase de *Trichoderma reesei* e de *Aspergillus niger*.

FONTE ENZIMÁTICA	K_m (mM)	K_i	
		GLUCOSE (mM)	GLUCONOLACTONA (mM)
<i>Aspergillus niger</i>	0,8	2,1	0,04
<i>Trichoderma reesei</i>	0,2	0,7	0,04

Fonte: ENARI, 1983.

Ao se avaliar a importância relativa dos componentes bioquímicos (Tabela 7), a contribuição de beta-endoglucanase é mínima em relação à celobiohidrolase, confirmando a participação do último componente na atividade celulolítica dos sistemas de *Trichoderma reesei*. Por outro lado, as enzimas de *Aspergillus niger* contêm pouca beta-endoglucanase e suficiente beta-glucosidase (ENARI, 1983) e não apresentam celobiohidrolase, indicando a procedência da discussão nos ensaios 1 e 2, sugerindo-se a participação de componentes hemicelulolíticos e alterações em acessibilidade das enzimas aos referidos substratos.

Tabela 7 - Enzimas celulolíticas produzidas por *Trichoderma reesei* e *Aspergillus niger*.

COMPONENTES BIOQUÍMICOS	QUANTIDADE RELATIVA (% PROTEÍNAS TOTAIS EXTRACELULARES)	
	<i>T. reesei</i>	<i>A. niger</i>
Celobiohidrolase	50 - 80	0
Endoglucanase	8 - 12	2 - 3
Beta-glucosidase	0,2 - 1,0	2 - 3

Fonte: ENARI, 1983.

Ensaio 5

Centralizou-se o objetivo do presente estudo em correlacionar dois métodos para extração de conteúdo celular: fibra em detergente neutro e insolubilização em HCl-pepsina. Conforme descritos na maioria das determinações de matéria seca digestível pelo método enzimático, os referidos tratamentos podem mostrar resultados significativos em diferenciar estruturas indisponíveis, ao se somar o efeito dos sistemas enzimáticos (24 h, 48 h, 72 h) nos estudos de extensão de solubilização.

Os grupos de forragens e alimentos que foram usados nesta fase estão descritos no item 3.2.1 (B). As análises do referido estudo seguiram o descrito no item 3.3.8. com o objetivo de adequar os dados a um modelo de equações para correlacionar os métodos propostos. Os resultados estão melhor detalhados na Tabela 2 (Apêndice).

As equações selecionadas para os referidos grupos de alimentos (Tabela 8) sugerem que o procedimento analítico alternativo (insolubilização em HCl-pepsina) pode substituir o sistema convencional (detergente neutro) para os alimentos volumosos, com a máxima resposta no grupo de resíduos agrícolas, tratados ou não. A variação observada em coeficientes de determinação pode ser explicada pela heterogeneidade do material, e ainda os referidos coeficientes podem ser corrigidos ao se avaliar os materiais em diferentes fases de crescimento e com diferentes potenciais de digestibilidade. Pode-se corrigir as referidas

equações, basicamente ao se amostrar maior número possível de formas de parede celular.

Tabela 8 - Modelos e equações definidas para estimativa de parede celular (%) pelos sistemas analíticos, detergente e enzimático.

GRUPOS DE ALIMENTOS	EQUACOES	CD	QMR (Sg.x)
FORRAGENS CONSERVADAS n=18 M3	$PCC = -204.1630 + 6.7293 PCE - 0.0409 PCE \times PCE$	0.6821	5.98
GRAMINEAS n=23 M1	$PCC = 10.1718 - 0.8117 PCE$	0.5317	3.15
LEGUMINOSAS n=14 M1	$PCC = -7.8658 + 1.0246 PCE$	0.6340	4.84
RESIDUOS AGRICOLAS n=8 M1	$PCC = -39.3327 + 1.2896 PCE$	0.8368	4.94
GERAL n=55 M2	$1(PCC) = -0.0701 + 0.9911 1(PCE)$	0.7405	0.08

PCC (TEOR) → PAREDE CELULAR PELO SISTEMA CONVENCIONAL (DETERGENTE NEUTRO)

PCE (TEOR) → PAREDE CELULAR PELO SISTEMA ENZIMÁTICO

M1 → LINEAR

M2 → LOGARÍTMICO

M3 → QUADRÁTICO

CD → COEFICIENTE DE DETERMINAÇÃO

QMR → QUADRADO MÉDIO DO RESÍDUO

Por outro lado, como sugerem alguns autores, em estudos do potencial digestível, a avaliação pode ser obtida por espécies forrageiras semelhantes ou por agrupamento definido do alimento em questão (MCLEOD & MINSON, 1978; MASAOKA & TARUMOTO, 1979; MCLEOD & MINSON, 1982) o que aparentemente tem dado resultado.

Os resultados deste estudo sugerem que ambos os métodos são apropriados para remover o conteúdo celular (amido, proteínas e lipídeos) em grande número de alimentos, comprovando as sugestões de JONES & HAYWARD (1975) e ROUGHAN & HOLLAND (1977). A solubilização em HCl-0,1N, pepsina 0,2% peso/volume por 24 h/40°C pode ser insuficiente para remover conteúdo celular de concentrados energéticos. DOWMAN & COLLINS, (1982); DEBOEVER (1986) sugeriram a adição de amiloglucosidase (AGIDEX) e tratamento térmico 80°C/45 min com efeitos complementares aos tratamentos do estudo. Os dados sugerem uma melhor avaliação dessa metodologia para grupos de alimentos como concentrados proteicos e energéticos e mistura de alimentos.

Ensaio 6

O referido estudo teve como objetivo avaliar através de medidas gravimétricas e colorimétricas, o efeito de fontes enzimáticas, visando substituir o método microbiológico convencional (TILLEY & TERRY, 1963) nos distintos grupos de forragens. Assim, tentou-se compatibilizar fonte enzimática e substratos forrageiros. Para os referidos

objetivos foram escolhidas as enzimas 1 (de *Trichoderma reesei*) e a 3 (de *Aspergillus niger*) por constituírem sistemas enzimáticos distintos, nas condições avaliadas nos estudos anteriores. As mesmas passam a ser referidas aqui por enzimas 1 e 2 respectivamente.

Observou-se que a heterogeneidade de parede celular, e por conseguinte dos substratos em questão, interferem marcadamente nas avaliações gravimétricas e colorimétricas. REEVES (1988) descreveu que os componentes individuais químicos da lignina não fornecem correlações com parede celular e parede celular digestível (VAN SOEST *et alii*, 1966) se avaliados sem o ajuste com o próprio alimento como covariável. No caso foi tentado um ajuste para parede celular pelos métodos propostos no ensaio 5. Os resultados constam na Tabela 3 (Apêndice) e indicam a procedência do ajuste, principalmente nas medidas colorimétricas para os sistemas enzimáticos 1 e 2.

A procedência do ajuste está associada aos grupos de forragens conservadas e gramíneas, onde apareceram os mais baixos coeficientes de determinação nos respectivos procedimentos gravimétrico e colorimétrico, que constam da Tabela 4 (Apêndice). Observa-se de forma clara que no grupo de leguminosas, com altos coeficientes de determinação, a covariável foi ineficaz para ambas as avaliações (gravimétricas e colorimétricas).

Por não haver diferenças significativas entre os dois métodos propostos para isolar parede celular, a

procedência do ajuste pode ser interpretada por ambos os procedimentos. Nos casos específicos de inadequação do procedimento, a dúvida pode refletir a ineficiência dos sistemas analíticos envolvidos (determinações de parede celular, matéria seca digestível e carboidratos estruturais disponíveis nos diferentes alimentos).

Com relação ao teste de modelo de equações mostrado na Tabela 4 (Apêndice) para matéria seca digestível e carboidratos estruturais disponíveis nos diferentes grupos, os dados estão ligeiramente de acordo com o observado no ensaio 5. O M₃ (quadrático) ajustou-se melhor para as forragens conservadas. No caso de gramíneas, o M₃ sugeriu melhores ajustes sem modificar o resultado com relação ao objetivo do trabalho. Com leguminosas, o M₁ (linear) mostrou-se eficaz para as medidas gravimétricas, enquanto o M₃ mostrou-se eficaz em explicar as avaliações colorimétricas. Para os resíduos, talvez pelo pequeno número de amostras, a definição do modelo não ficou muito clara. Aparentemente, o M₂ (logarítmico) explicou melhor os dados observados, entretanto, os modelos não interferiram nos resultados finais com relação aos objetivos do trabalho. Numa análise conjunta, o M₂ conferiu melhores ajustes, inclusive concordando com os resultados do ensaio 5, apesar dos modelos (M₁ = M₂ = M₃) não diferirem muito. Esses resultados sugerem importantes diferenças no caráter das medidas avaliadas principalmente, em relação aos carboidratos estruturais disponíveis, cujas diferenças são maiores, ao se aplicar os testes de

covariância e modelos de equações (resumo dos dados constam na Tabela 9).

Tabela 9 - Modelos e equações definidas para estimativas de matéria seca digestível entre os sistema micro-biológico e enzimático.

GRUPOS DE ALIMENTOS	EQUACOES	CD	QMR (Sq.x)
FORRAGENS CONSERVADAS n=10 R3	Y1 = 158.3437 - 5.3182 X + 0.0574 X*X	0.7414	7.43
	Y2 = 109.1238 - 3.0378 X + 0.0354 X*X	0.6874	6.64
	YC1 = 15.3700 - 0.3650 X + 0.0051 X*X	0.4899	2.09
	YC2 = -77.4761 + 3.1802 X - 0.0271 X*X	0.3950	3.68
GRANINEAS n=23 R3	Y1 = 80.7738 - 1.9151 X + 0.0229 X*X	0.4736	4.69
	Y2 = 62.4204 - 1.3585 X + 0.0195 X*X	0.6202	4.41
	YC1 = 24.6404 - 0.5365 X + 0.0058 X*X	0.1359	2.07
	YC2 = -3.5819 + 0.2730 X - 0.0003 X*X	0.1111	4.83
LEGUMINOSAS n=14 R1	Y1 = 2.3614 + 1.0186 X	0.8934	3.33
	Y2 = 3.6515 + 1.0200 X	0.8286	4.39
	YC1 = 1.9381 + 0.1772 X	0.2708	2.75
	YC2 = -11.8644 + 0.3674 X	0.5375	3.22
RESIDUOS AGRICOLAS n=8 R3	Y1 = -32.0567 + 2.3870 X - 0.0152 X*X	0.5793	13.25
	Y2 = -10.5750 + 1.0440 X + 0.0027 X*X	0.7714	10.58
	YC1 = -34.6541 + 2.2847 X - 0.0229 X*X	0.3350	10.48
	YC2 = 7.5454 - 0.3736 X + 0.0116 X*X	0.6036	8.82
GERAL n=55 R2	1(Y1) = -0.8995 + 1.1954 1(X)	0.6392	0.19
	1(Y2) = -1.0191 + 1.2376 1(X)	0.7196	0.16
	1(YC1) = 0.0186 + 0.6285 1(X)	0.1502	0.32
	1(YC2) = -2.3641 + 1.1791 1(X)	0.2464	0.44

Y1 → MSD1-MATÉRIA SECA DIGESTÍVEL (ENZIMA 1)
Y2 → MSD2-MATÉRIA SECA DIGESTÍVEL (ENZIMA 2)
YC1 → CED1-CARBOIDRATOS ESTRUTURAIS DISPONÍVEIS (ENZIMA 1)
YC2 → CED2-CARBOIDRATOS ESTRUTURAIS DISPONÍVEIS (ENZIMA 2)
X → MATÉRIA SECA DIGESTÍVEL (TILLEY & TERRY) M1 → LINEAR
CD → COEFICIENTE DE DETERMINAÇÃO M2 → LOGARÍTMICO
QMR → QUADRADO MÉDIO DO RESÍDUO M3 → QUADRÁTICO

As avaliações indicam que pelo pequeno número de amostras e heterogeneidade dos materiais estudados (parede celular e sistemas celulolíticos), as tentativas por modelo de equações e covariância podem fornecer dados interessantes, comparando-se os referidos testes com maior variação de resultados. Por outro lado, a dificuldade em avaliar a heterogeneidade dos materiais lignocelulósicos e de obter amostras com diferentes faixas de disponibilidade têm impossibilitado reunir as condições ideais para estudos de regressão. Alguns trabalhos sugeriram tentativas de equações por espécie forrageira ou tipo de alimento (CALISSON & BORZUCKI, 1978; MASAOKA & TARUMOTO, 1979). E ainda, as interações possíveis destas enzimas sobre o modelo de digestão podem dar resultados de difícil interpretação, principalmente por alterar a disponibilidade biológica dos substratos em questão (DANIELS & HASHIM, 1977; ROLZ *et alii*, 1986).

As diferenças estruturais dos substratos lignocelulósicos podem ser comprometidas pelo estado de oxidação da lignina (HARTLEY *et alii*, 1974; REEVES, 1988). As técnicas convencionais de hidrólise e uso de marcadores isotópicos ou não conferem modificações na estrutura química dos carboidratos estruturais, por submeterem paralelamente a lignina a um estado de oxidação (BARTON, 1988; REEVES, 1988), podendo gerar dúvidas nas interpretações dos dados. As referidas enzimas constituem um meio biológico de comparar os mecanismos de hidrólise envolvidos, bem como, de testar a eficiência comparativa do processo nos dois sistemas,

microbiológico e enzimático.

Observando a questão de especificidade enzima-substrato, aparentemente a enzima 1 (*Trichoderma reesei*) mostrou-se melhor para forragens conservadas e leguminosas, o que é também corroborado pelos ajustes de equações. Entretanto, para gramíneas e resíduos agrícolas, a enzima 2 (*Aspergillus niger*) proporcionou melhores resultados. Numa avaliação geral, a enzima 2 parece ser mais indicada para os substratos estudados. A metodologia deveria contemplar alimentos concentrados e ainda controlar melhor fonte enzimática (indicações de laboratórios na Tabela 4), como sugeriram CLARK & BEARD (1977); COTTYN *et alii* (1984).

O procedimento gravimétrico (matéria seca digestível) parece ser mais indicado que o colorimétrico para se avaliar os resultados com as enzimas envolvidas no estudo. A especificidade indicada na literatura, entre os sistemas celulolíticos de *Trichoderma reesei* e *Aspergillus niger* para os substratos lignocelulósicos deve ser melhor estudada, seguindo os critérios adotados neste estudo (procedimento gravimétrico x colorimétrico).

Ao se avaliar os carboidratos estruturais disponíveis, deve-se considerar que a eficiência dos sistemas enzimáticos no tempo pode ser maior em relação a dos microrganismos ruminais, conseguindo-se assim, extrair açúcares em quantidade maior e bastante variável pelas diferentes fontes enzimáticas. O potencial hidrolítico dos sistemas enzimáticos e as conformações tridimensionais da

parede celular influenciaram o resultado final. A disponibilidade de parede celular é extremamente variável, principalmente, por variações em composição e disposição tridimensional. Medidas comparativas para melhor detectar tais efeitos podem ser a técnica de fracionamento diferencial nas determinações de parede celular e lignina, isotópica e/ou marcadores de fase sólida.

Recentemente, o infravermelho tem mostrado correlações interessantes com os procedimentos *in vitro*, microbiológico e enzimático (COELHO *et alii*, 1988; GABRIELSEN *et alii*, 1988) e métodos químicos (REEVES, 1988; BARTON, 1988). A equação obtida por HARTLEY *et alii* (1974) reflete a eficiência do método enzimático, principalmente por avaliar uma característica importante no mecanismo de digestão, as ligações ésteres dos compostos fenólicos com os carboidratos estruturais. O mesmo trabalho ainda mostra diferenças entre as forragens quanto aos piques de absorção no ultravioleta ($\lambda = 324$ nm). A identificação de ligações específicas (C-H, O-H, N-H) em extensão e disposição possíveis no infravermelho e análises conformacionais por ressonância magnética sugerem melhores condições comparativas, com o procedimento colorimétrico, pela técnica enzimática (REEVES, 1988; BARTON, 1988).

A fonte de inóculo pode ser outro fator a ser considerado no presente estudo. CLARY *et alii* (1988) propuseram que pode ocorrer uma grande variação nos dados em função do animal doador, quando os alimentos apresentam valores

de 40-70% de matéria seca digestível. Os mesmos autores sugeriram que subamostragens reduzem pouco a variabilidade observada, enquanto o número de animais-doadores (2-3) controla com maior eficiência a variabilidade das referidas amostras.

Com relação ao método microbiológico, sugerem-se algumas modificações. A concentração ácida na 2ª fase de digestão, certamente dará resultados mais próximos ao tipo de avaliação proposta, uma vez que HCl 0,1N deve afetar menos a celulose e hemicelulose, avaliando-se de forma mais decisiva o potencial dos microrganismos ruminais. Por outro lado, a digestibilidade verdadeira da parede celular (VAN SOEST *et alii*, 1966) deve também fornecer dados mais próximos. Entretanto, os dados de literatura sugerem a metodologia convencional (TILLEY & TERRY, 1963) para as comparações com o enzimático.

Outro problema das medidas avaliadas certamente está relacionado com a heterogeneidade dos sistemas celulolíticos, de diferentes laboratórios, como está indicado na Tabela 4 (Recentes propostas da metodologia enzimática para estudos da fração potencialmente digestível).

Com os baixos coeficientes de determinação ($< 0,60$) obtidos no ensaio 6 (colorimétrico, enzima 1 e 2 x microbiológico) ficou a dúvida quanto às estruturas reconhecidas pelos respectivos sistemas enzimáticos. Assim, sugere-se que pelo menos entre o gravimétrico e colorimétrico, em cada sistema enzimático ocorra alguma correlação. A Tabela 5

(Apêndice) mostra os valores e significância de F e coeficientes de determinação obtidos nos diferentes grupos de alimentos, inclusive, testando os modelos de equações.

Os resultados do referido teste com a enzima 2 mostraram altas correlações entre matéria seca digestível e carboidratos estruturais disponíveis, confirmando certa especificidade com os substratos em questão. Ao contrário, os resultados com a enzima 1 mostraram correlações mais baixas em todos os grupos de forragens, inclusive nas forragens conservadas, o coeficiente de determinação aproximou-se de zero nos três modelos de equações, sugerindo baixa especificidade e/ou necessidade de modificações analíticas para o referido grupo. Por outro lado, a avaliação dos modelos sugere que o M3 é mais indicado para as medidas de carboidratos estruturais disponíveis, o que já havia sido sugerido para alguns grupos de forragens em análises anteriores.

SUGESTÕES E APLICAÇÕES PRÁTICAS

- 1) Os resultados apresentados na Tabela 9, com relação ao grupo de leguminosas, com coeficiente de determinação $\approx 0,90$, indicam que a metodologia é funcional e sugerem-se melhores estudos com objetivos mais definidos, em outros grupos de alimentos.
- 2) A questão da especificidade necessita ser testada com um controle maior de fonte enzimática e variação natu-

ral possível de substratos lignocelulósicos e respectivas disponibilidades.

- 3) A avaliação de carboidratos estruturais disponíveis exige um tratamento mais apurado no que diz respeito às equações estimativas. As observações laboratoriais demonstram ser esta medida interessante para o acompanhamento de redução de disponibilidade de parede celular pelos efeitos naturais de lignificação e cristalinidade.
- 4) A metodologia deve ser ampliada a outros grupos de alimentos, como concentrados energéticos e protéicos, e conferir possíveis modificações visando seu aperfeiçoamento.
- 5) As diferenças estruturais mais significativas podem ser obtidas até 24 h de reação, com substratos purificados e naturais nos distintos sistemas celulolíticos, inclusive com menores interferências dos inibidores intermediários e finais. Assim permite sugerir a possibilidade de se detectar matéria seca digestível em 48 h de análises laboratoriais, combinando com a fase em HCl-pepsina (24 h).
- 6) Há evidências também de que a dosagem de CED (carboidratos estruturais disponíveis) pode expressar resultados de tratamentos específicos sobre os resíduos agrícolas.

5. CONCLUSÕES

Os resultados experimentais permitem concluir que:

1. No presente estudo, observa-se que a condição de saturação, para os sistemas celulolíticos, foi estabelecida com a concentração mínima (1% peso/volume) e tempo máximo de reação (72 h), condições nas quais os efeitos inibitórios de produtos finais e intermediários foram maximizados, como moduladores negativos nos distintos componentes enzimáticos individuais.
2. As enzimas alostéricas heterotrópicas (celulases de *Trichoderma reesei* e *Aspergillus niger*) são afetadas por diferentes graus de lignificação e cristalinidade dos distintos materiais utilizados no ensaio com substratos naturais (forragens).
3. Os referidos sistemas de *Trichoderma reesei* e *Aspergillus niger* apresentam as diferenças básicas quanto aos componentes beta-endo-glucanase e beta-glucosidase, diferindo em potenciais máximos e mecanismo de inibição por produto final.

4. A metodologia alternativa de análise de parede celular mostra-se efetiva em remover conteúdo celular de forragens conservadas, gramíneas, leguminosas e resíduos agrícolas, podendo ser estendida a outros grupos de alimentos.
5. A covariável avaliada (parede celular) é procedente, principalmente para corrigir as correlações nas avaliações de carboidratos estruturais disponíveis, refletindo a heterogeneidade e especificidade dos materiais em estudo.
6. A matéria seca digestível pode ser obtida por meio enzimático comparável ao método microbiológico, e portanto, às condições *in vivo* com eficiência que varia de 0,60 a 0,90 de coeficientes de determinação, para os distintos grupos de forragens, considerando os testes de covariância e modelos de equações.
7. A enzima 1, de *Trichoderma reesei* mostra-se mais específica para forragens conservadas e leguminosas, enquanto a enzima 2, de *Aspergillus niger* mostra-se mais indicada para gramíneas e resíduos agrícolas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGARWAL, P.K. Heterogeneous denaturation of enzymes: a distributed activation energy model with nonuniform activities. *Biotechnology and Bioengineering*, New York, 27: 1554-63, 1985.
- ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K. WATSON, J.D. *Molecular biology of the cell*. New York, Garland Publishing, 1983. 1146p.
- ALLISON, M. & BORZUCKI, R. Cellulase methods for efficient digestion of grasses and brassicas. *Journal of Science Food and Agriculture*, London, 29: 293-7. 1978.
- ALURRALDE, J. L. & ELLENRIEDER, G. Effect of attached carbohydrates on the activity of *Trichoderma viride* cellulase. *Enzyme and Microbial Technology*, Stoneham, 6: 467-70, 1984.
- AUFRÈRE, J. & MICHALET-DOREAU, B. Comparison of methods for predicting digestibility of feeds. *Animal Feed Science and Technology*, Amsterdam, 20: 203-18, 1988.
- BAILEY, R.W. & JONES, D.I.H. Pasture quality and ruminant nutrition III. Hydrolysis of ryegrass structural carbohydrates with carbohydrases in relation to rumen digestion. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, Wellington, 14: 847-57, 1971.

- BARTON, F.E. Chemistry of lignocellulose; methods of analysis and consequences of structure. *Animal Feed Science and Technology*, Amsterdam, 21: 279-86, 1988.
- BORGMEYER, J.R. & CRAWFORD, D.L. Production and characterization of polymeric lignin degradation intermediates from two different *Streptomyces* spp. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, 49(2): 273-8, 1985.
- BREUIL, C. & SADDLER, J.N. Comparison of the 3,5 dinitro-salicylic acid and Nelson-Somogyi methods of assaying for reducing sugars and determining cellulase activity. *Enzymes and Microbial Technology*, Stoneham, 7: 327-32, 1985a.
- BREUIL, C. & SADDLER, J.N. Limitations of using the D-glucose-oxidase peroxidase method for measuring glucose derived from lignocellulosic substrates. *Biotechnology Letters*, Kew, 7(3): 191-6, 1985b.
- BUGGE, G. A simplified cellulase digestion technique for predicting dry matter digestibility of grasses. *Journal of Agronomy and Crop Science*, Berlin, 149: 206-12, 1980.
- CHIRICO, W.J. & BROWN JR., R.D. Separation of cellooligosaccharides by thin-layer chromatography assay for cellulolytic enzymes. *Analytical Biochemistry*, San Diego, 150: 264-72, 1985.
- CLARK, J. & BEARD, J. Prediction of the digestibility of ruminants feeds from their solubility in enzyme solutions. *Animal Feed Science and Technology*, Amsterdam, 2: 153-9, 1977.
- CLARY, W.P.; WELCH, B.L.; BOOTH, G.D. *In vitro* digestion experiments: importance of variation between inocula do-

- nors. *Journal of Wildlife Management*, Bethesda, 52(2): 358-61, 1988.
- CLESCERI, L.S.; SINITSYN, A.P.; SAUNDERS, A.M.; BUNGAY, H.R. Recycle of the cellulase-enzyme complex after hydrolysis of steam-exploded wood. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, Clifton, 11(6): 433-44, 1985.
- COELHO, M.; HEMBRY, F.G.; BARTON, F.E.; SAXTON, A.M. A comparison of microbial, enzymatic, chemical and near-infrared reflectance spectroscopy methods in forage evaluation. *Animal Feed Science and Technology*, Amsterdam, 20: 219-31, 1988.
- COLBERG, P.J. & YOUNG, L.Y. Anaerobic degradation of soluble fractions of [¹⁴C-lignin] lignocellulose. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, 49(2): 345-9, 1985.
- COTTYN, B.G.; AERTS, J.V.; VANACKER, J.M.; MOERMANS, R.J.; BUYSSE, F.X. The prediction of the net energy value of compound feedstuffs for dairy cattle. *Animal Feed Science and Technology*, Amsterdam, 11: 137-47, 1984.
- COUGHLAN, M.P. The properties of fungal and bacterial cellulases with comment on their production and application. *Biotechnology and Genetic Engineering, Reviews*, Ponteland, 3: 39-109, 1985.
- CRAWFORD, R.L. & CRAWFORD, D.L. Recent advances in studies of the mechanisms of microbial degradation of lignins. *Enzyme and Microbial Technology*, Stoneham, 6: 434-42, 1984.
- CUTTER, E.G. *Plant anatomy: part 1; cells and tissues*. 2. ed. London, Edward Arnold, 1979. 315p.

- CZERKAWSKI, J.W. An introduction to rumen studies. Oxford, Pergamon Press, 1986. 236p.
- DANIELS, L.B. & HASHIM, R.B. Evaluation of fungal cellulases in rice hull base diets for ruminants. *Journal of Dairy Science*, Champaign, 60: 1563-7, 1977.
- DAVID, C.; FORNASIER, R.; THIRY, P.H. Utilization of waste cellulose VI. Pretreatment of lignocellulosic materials with sodium hypochlorite and enzymatic hydrolysis by *Trichoderma viride*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, Clifton, 11: 351-65, 1985.
- DEBOER, G.; MURPHY, J.J.; KENNELLY, J.J. A modified method for determination of in situ rumen degradation of feedstuffs. *Canadian Journal of Animal Science*, Ottawa, 67: 93-102, 1987.
- DEBOEVER, J.L.; COTTYN, B.G.; ANDRIES, J.I.; BUYSSE, F.X.; VANACKER, J.M. The use of a cellulase technique to predict digestibility, metabolizable and net energy of forages. *Animal Feed Science and Technology*, Amsterdam, 19: 247-60, 1988.
- DEBOEVER, J.L.; COTTYN, B.G.; BUYSSE, F.X.; WAINMAN, F.W.; VANACKER, J. M. The use of an enzymatic technique to predict digestibility, metabolizable and net energy of compound feedstuffs for ruminants. *Animal Feed Science and Technology*, Amsterdam, 14: 203-14, 1986.
- DEKKER, R.F.H. Bioconversion of hemicellulose: aspects of hemicellulase production by *Trichoderma reesei* QM 9414 and enzymic saccharification of hemicellulose. *Biotechnology and Bioengineering*, New York, 25: 1127-46, 1985.

- DEKKER, R.F.H. Kinetic, inhibition and stability properties of a commercial β -D-glucosidase (celobiase) preparations from *Aspergillus niger* and its suitability in the hydrolysis of lignocellulose. *Biotechnology and Bioengineering*, New York, 28: 1438-42, 1986.
- DESHPANDE, M.V. & ERIKSSON, K.E.R. Reutilization of enzymes for saccharification of lignocellulosic materials. *Enzyme and Microbial Technology*, Stoneham, 6: 338-40, 1984.
- DONEFER, E.; NIEMANN, P.J.; CRAMPTON, E.W.; LLOYD, L.E. Dry matter disappearance by enzyme and aqueous solutions to predict the nutritive value of forage. *Journal of Dairy Science*, Champaign, 46: 965-70, 1963.
- DOWMAN, N.G. & COLLINS, F.C. The use of enzymes to predict the digestibility of silages using cellulase. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, London, 28: 1071-4, 1977.
- DOWMAN, N.G. & COLLINS, F.C. The use of enzymes to predict the digestibility of animal feeds. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, London, 33: 689-96, 1982.
- DURAND, H.; SOUCAILLE, P.; TIRABY, G. Comparative study of cellulase and hemicellulase from four fungi: mesophiles *Trichoderma reesei* and *Penicillium* sp. and thermophiles *Thielavia terrestris* and *Sporotrichum cellophilum*. *Enzyme and Microbial Technology*, Stoneham, 6: 175-80, 1984.
- ENARI, T. Microbial cellulases. In: FOGARTY, W.M., ed. *Microbial enzymes and biotechnology*. London, Applied Science Publishers, 1983. cap. 4, p. 183-223.
- ESAU, K. *Anatomy of seed plants*. 2^d ed. New York, John Wiley & Sons, 1977. 550p.

- FAISON, B.D. & KIRK, T.K. Factors involved in the regulation of a ligninase activity in *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, 49(2): 299-304, 1985.
- FOX, D.J.; GRAY, P.G.; DUNN, N.W.; MARSDEN, W.L. An explanation of the discrepancy between the results of h.l.p.c. and DNS assays in the analysis of lignocellulosic hydrolysates. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, Osney Mead, 34B: 171-5, 1984.
- FUJJI, M. & KAWAMURA, Y. Synergistic action of α -amylase and glucoamylase on hydrolysis of starch. *Biotechnology and Bioengineering*, New York, 27: 260-5, 1985.
- FUJJI, M. & SHIMIZU, M. Synergism of endoenzyme and exoenzyme on hydrolysis of soluble cellulose derivatives. *Biotechnology and Bioengineering*, New York, 28: 878-82, 1986.
- FUJII, M.; MURAKAMI, S.; YAMADA, Y.; ONA, T.; NAKAMURA, T. A kinetic equation for hydrolysis of polysaccharides by mixed exo and endoenzyme systems. *Biotechnology and Bioengineering*, New York, 23: 1393-8, 1981.
- GABRIELSEN, B.C.; VOGEL, K.P.; KNUDSEN, D. Comparison of in vitro dry matter digestibility and cellulase digestion for deriving near infrared reflectance spectroscopy calibration equation using cool-season grasses. *Crop Science*, Madison, 28: 44-7, 1988.
- GOEL, S. & RAMACHANDRAN, K. B. Comparison of the rates of enzymatic hydrolysis of pre-treated rice-straw and bagasse with cellulases. *Enzyme and Microbial Technology*, Stoneham, 5: 281-4, 1983.

- GOTO, I. & MINSON, D.J. Prediction of the dry matter digestibility of tropical grasses using a pepsina-cellulase assay. *Animal Feed Science and Technology*, Amsterdam, 2: 247-53, 1977.
- GRETHLEIN, H.E. Pretreatment for enhanced hydrolysis of cellulosic biomass. *Biotechnology Advances*, Elmsford, 2: 43-62, 1984.
- GRIFFIN, H.; DINTZIS, F.R.; KRULL, L.; BAKER, F.L. A microfibril generating factor from the enzyme complex of *Trichoderma reesei*. *Biotechnology and Bioengineering*, New York, 26: 296-300, 1984.
- GROUS, W.; CONVERSE, A.; GRETHLEIN, H.; LYND, L. Kinetics of cellobiose hydrolysis using cellobiase composites from *Trichoderma reesei* and *Aspergillus niger*. *Biotechnology and Bioengineering*, New York, 27:463-70, 1985.
- GUSAKOV, A. V.; SINITSYN, A. P.; KLYOSOV, A. A. Kinetics of the enzymatic hydrolysis of cellulose: 2. A mathematical model for the process in a plug-flow column reactor. *Enzyme and Microbial Technology*, Stoneham, 7: 383-8, 1985.
- GUSAKOV, A.V.; SINITSYN, A.P.; KLYOSOV, A.A. A theoretical comparison of the reactors for the enzymatic hydrolysis of cellulose. *Biotechnology and Bioengineering*, New York, 29: 898-900, 1987.
- HADJIPANAYIOTOU, M.; HADJIDEMETRION, D.; HADJILOUCA, T. Determination of roughage digestibility in vivo, in vitro and with an enzymatic method. *Nutrition Reports International*, Stoneham, 35(5): 957-61, 1987.

- HALLIWELL, G. & GRIFFIN, M. The nature and mode of action of the cellulolytic component C1 of *Trichoderma koningii* on native cellulose. *Biochemical Journal*, Colchester, 135: 587-94, 1973.
- HARTLEY, R.D.; JONES, E.C.; FENLON, J.S. Prediction of digestibility of forages by treatment of their cell walls with cellulolytic enzymes. *Journal of Science and Food and Agriculture*, London, 25: 947-54, 1974.
- HOMMA, H. Cellulase activities of bacteria in liquid and solid phases of the rumen digesta of buffaloes and cattle. *Japanese Journal of Zootechnical Science*, Tokyo, 57(4): 336-41, 1986.
- HOPSON, J.D.; JOHNSON, R.R.; DEHORITY, B.A. Evaluation of the dacron bag technique as a method for measuring cellulose digestibility and rate of forage digestion. *Journal of Animal Science*, Albany, 22: 448-53, 1963.
- ISRAELEN, M.; REXEN, B.; THOMSEN, V. Cellulase insoluble fibre as a measure of inavailable organic matter in cattle compounds containing alkali-treated straw. *Animal Feed Science and Technology*, Amsterdam, 3: 227-34, 1978.
- JACOB, F. & MONOD, J. Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *Journal of Molecular Biology*, London, 3: 318-56, 1961.
- JARRIGE, R. & THIVEND, P. Action d'une cellulase fongique sur les membranes et son intérêt pour prévoir la digestibilité des plantes fourragères. *Annales de Biologie Animale Biochimie Biophysique*, Montrouge, 9(2): 171-90, 1969.
- JARRIGE, R.; THIVEND, P.; DEMARQUILLY, C. Development of a cellulolytic enzyme digestion for predicting the nutriti-

- ve value of forages. In: INTERNATIONAL GRASSLAND CONGRESS, 11, Queensland, 1970. Proceedings, p.762-6.
- JONES, D.I.H. & HAYWARD, M.V. A cellulase digestion technique for predicting the dry matter digestibility of grasses. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, London, 24: 1419-26, 1973.
- JONES, D.I.H. & HAYWARD, M.V. The effect of pepsina pretreatment of herbage on the prediction of dry matter digestibility from solubility in fungal cellulase solutions. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, London, 26: 711-8, 1975.
- KAWAMORI, M.; MORIKAWA, Y.; SHINSHA, Y.; TAKAYAMA, K.; TAKASAWA, S. Preparation of mutants resistant to catabolite repression of *Trichoderma reesei*. *Agricultural and Biological Chemistry*, Tokyo, 49(10): 2875-9, 1985.
- KELLEY, R.L. & REDDY, A.C. Purification and characterization of glucose-oxidase from lignolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *Journal of Bacteriology*, Washington, 166(1): 269-74, 1986.
- KELLNER, R.J. & KIRCHGESSNER, M. Estimation of forage digestibility by a cellulase method. *Zeitschrift fuer Tierphysiologie, Tierernaehrung und Futtermittelkunde*, Hamburg, 39: 9-16, 1977.
- KIRCHGESSNER, M. & KELLNER, R.J. Estimation of digestibility, metabolizable energy and net energy of forage by a cellulase method. *Livestock Production Science*, Amsterdam, 5: 373-7, 1978.
- LEHNINGER, A.L. *Princípios de bioquímica*. São Paulo, Sarvier, 1988. 725p.

- LIN, K.W.; PATTERSON, J.A.; LADISCH, M.R. Anaerobic fermentation: microbes from ruminants. *Enzyme and Microbial Technology*, Stoneham, 7: 98-107, 1985.
- LOBARZEWSKI, J. & PASZCZYŃSKI, A. Lignocellulose biotransformation with immobilized cellulase, D-glucose oxidase and fungal peroxidases. *Enzyme and Microbial Technology*, Stoneham, 7: 564-6, 1985.
- LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, Bethesda, 193: 265-75, 1954.
- MCCLUSKEY, J.G.; ALLISON, M.J.; DUNCAN, H.J.; JARVIS, M.C. Isolation of anatomically defined cell walls from fodder kale, and their contributions to determining the in vitro cellulase digestibility of the whole plant. *Journal of Agricultural Science*, Cambridge, 103: 347-52, 1984.
- MCLEOD, M.N. & MINSON, D.J. The accuracy of the pepsinase-cellulase technique for estimating the dry-matter digestibility in vivo of grasses and legumes. *Animal Feed Science and Technology*, Amsterdam, 3: 277-87, 1978.
- MCLEOD, M.N. & MINSON, D.J. Accuracy of predicting digestibility by the cellulase technique: the effect of pretreatment of forage samples with neutral detergent or acid-pepsin. *Animal Feed Science and Technology*, Amsterdam, 7: 83-92, 1982.
- MCLEOD, M.N. & MINSON, D.J. A note on Onozuka 3S cellulase as replacement for Onozuka SS (P1500) cellulase when estimating forage digestibility in vitro. *Animal Feed Science and Technology*, Amsterdam, 5: 347-50, 1980.

- MCLEOD, M.N. & MINSON, D.J. Sources of variation in the *in vitro* digestibility of tropical grasses. *Journal of British Grassland Society*, Oxford, 24: 244-9, 1969.
- MCQUEEN, R. & VAN SOEST, P.J. Fungal cellulase and hemicellulase prediction of forage digestibility. *Journal of Dairy Science*, Champaign, 58: 1482-91, 1975.
- MALOSSINI, F.; PACE, V.; SETTINERI, D. Valutazione della digeribilit dei foraggi mediante enzimi. *Zootecnica e Nutrizione Animale*, Bologna, 8: 107-13, 1982.
- MANDELS, M.; ANDREOTTI, R.; ROCHE, C. Measurement of saccharifying cellulase. In: GARDEN JUNIOR, E.L.; MANDELS, M.H.; REESE, E. T.; SPANO, L. A., ed. *Enzymatic conversion of cellulosic materials: technology and applications*. New York, John Wiley, 1976. p. 21-33 (Biotechnology and bioengineering symposium, 6).
- MANONMANI, H. K. & SREEKANTIAH, K. R. Saccharification of sugar-cane bagasse with enzymes from *Aspergillus ustus* and *Trichoderma viride*. *Enzyme and Microbial Technology*, Stoneham, 9: 484-8, 1987.
- MARSDEN, W.L.; GRAY, P.P.; DUNN, N.W. Alternative pathway for glucose production from using *Trichoderma reesei* QM9414 cellulase. *Biotechnology Letters*, Kew, 4(9): 589-94, 1982a.
- MARSDEN, W.L.; GRAY, P.P.; NIPPARD, G.J.; QUINLAN, M.R. Evaluation of the DNS method for analysing lignocellulosic hydrolysates. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, Osney Mead, 32: 1016-22, 1982b.
- MARTEN, G.C. Chemical, *in vitro* and nylon bag procedure for evaluating forage in the U.S.A. In: WHEELER, J.L. &

- MOCHRIE, R.D. ed. Forage evaluation: concepts and techniques. Lexington, American Forages and Grassland Council; Melbourne, CSIRO, 1981. p. 39-56.
- MASAOKA, Y. & TARUMOTO, I. Influence of cellulase concentrations and incubation period on in vitro digestibility of fresh sorghum leaf by simple cellulase digestion method. *Journal of the Japanese Society of Grassland Science*, Tokyo, 24: 337-44, 1979.
- MERTENS, D.R. & ELY, L.O. A dynamic model of fiber digestion and passage in the ruminant for evaluating forage quality. *Journal of Animal Science*, Albany, 49(4): 1085-95, 1979.
- MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, Washington, 31(3): 426-8, 1959.
- MINSON, D.J. An Australian view of laboratory techniques for forage evaluation. In: WHEELER, J.L. & MOCHRIE, R.D. ed. Forage evaluation: concepts and techniques. Lexington, American Forages and Grassland Council; Melbourne, CSIRO, 1981. p.57-74.
- MINSON, D.J. Effect of chemical composition on feed digestibility and metabolizable energy. *Nutrition Abstracts and Reviews*, Series B, Wallingford, 52(10): 591-615, 1982.
- MINSON, D.J. & HAYDOCK, K.P. The value of pepsin dry matter solubility for estimating the voluntary intake and digestibility of six *Panicum* varieties. *Australian Journal of Experimental Agriculture and Animal Husbandry*, Melbourne, 11: 181-5, 1971.

- MULLINGS, R. & PARISH, J.H. New reducing sugar assay for the study of cellulases. *Enzyme and Microbial Technology*, Stoneham, 6: 491-6, 1984.
- MURPHY, M.R.; BALDWIN, R.L.; ULYATT, M.J. An update of a dynamic model of ruminant digestion. *Journal of Animal Science*, Albany, 62: 1412-22, 1986.
- MURRAY, W.D. Effects of cellobiose and glucose on cellulose hydrolysis by both growing and resting cells of *Bacteroides cellulosolvens*. *Biotechnology and Bioengineering*, New York, 29: 1151-4, 1987.
- NARASIMHALU, P. A comparison of laboratory method involving single or two-stage cellulase and two-stage rumen-inoculum with pepsin treatment for prediction digestibility and intake of hays in sheeps. *Animal Feed Science and Technology*, Amsterdam, 12: 101-7, 1984.
- OSBOURN, D.F. Principles governing the use of chemical methods for assessing the nutritive value of forages: a review. *Animal Feed Science and Technology*, Amsterdam, 3: 265-75, 1978.
- PACE, V.; BARGE, M.T.; SETTINERI, D.; MALOSSINI, F. Comparison of forage digestibility in vitro with enzymic solubility. *Animal Feed Science and Technology*, Amsterdam, 11: 125-36, 1984.
- PEIJI, G.H. A simple method for estimating cellobiase activity by determination of reducing sugar. *Biotechnology and Bioengineering*, New York, 29: 903-5, 1987.
- POULSEN, O.M. & PETERSEN, L.W. A standard formula for the determination of the initial rate of hydrolysis of carboxymethylcellulose. *Biotechnology and Bioengineering*, New York, 27: 409-14, 1985.

- REES, M.C. & MINSON, D.J. The validity of in vitro techniques using rumen fluid or cellulase for predicting changes in the dry matter digestibility of grasses caused by fertilizer calcium, sulphur, phosphorus and nitrogen. *Grass and Forage Science*, Oxford, 34: 19-25, 1979.
- REESE, E.T.; SIU, R.G.H.; LEVINSON, H.S. The biological degradation of soluble cellulose derivatives and its relationship to the mechanism of cellulose hydrolysis. *Journal of Bacteriology*, Washington, 59: 485-97, 1950.
- REEVES, J. B. Chemical assays for fiber, lignin and lignin components: interrelationships and near infrared reflectance spectroscopic analysis results. *Journal of Dairy Science*, Champaign, 71(11): 2976-85, 1988.
- REXEN, B. Enzyme solubility - a method for evaluation the digestibility of alkali-treated straw. *Animal Feed Science and Technology*, Amsterdam, 2: 205-18, 1977.
- REXEN, B. Use of enzymes for improvement of feed. *Animal Feed Science and Technology*, Amsterdam, 6: 105-14, 1981.
- ROUGHAN, P.G. & HOLLAND, R. Predicting in vivo digestibilities of herbage by exhaustive enzymic hydrolysis of cell walls. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, London, 28: 1057-64, 1977.
- ROLZ, C.; CABRERA, S. de; VALDEZ, M.J.; ARRIOLA, M.C. de; VALLADARES, J. Biodegradation of pretreated ex-fermented sugar cane chips by fungal enzymes and mixtures of anaerobic bacteria. *Biotechnology Progress*, New York, 2(3): 120-30, 1986.
- RYU, D.D.Y. & MANDELS, M. Cellulases: biosynthesis and applications. *Enzyme and Microbial Technology*, Stoneham, 2: 91-102, 1980.

- SNEDECOR, G.W. & COCHRAN, W.G. Statistical methods. 6th ed. Ames, The Iowa State University Press, 1972. 593p.
- STEWART, C.M. & FOSTER, R.C. X-ray diffraction studies related to forest products research. Appita, Victoria, 29(6): 440-8, 1976.
- STONE, J.E.; SCALLAN, A.M.; DONEFER, E.; AHLGREN, E. Digestibility as a simple function of a molecule of similar size to a cellulase enzyme. In: HAJNY, G.J. & REESE, E.T., ed. Cellulase and their applications. Washington, American Chemical Society, 1965. p. 219. (Advances in chemistry series, 95).
- TAKAGI, M. Inhibition of cellulase by fermentation products. Biotechnology and Bioengineering, New York, 26: 1506-7, 1984.
- TAKAGI, M. Pretreatment of lignocellulosic materials with hydrogen peroxide in presence of manganese compounds. Biotechnology and Bioengineering, New York, 29: 165-70, 1987.
- TERRY, R.A.; MUNDELL, D.C.; OSBOURN, D.F. Comparison of the two in vitro procedures using rumen liquor-pepsin or pepsin-cellulase for predicting of forage digestibility. Journal of the British Grassland Society, Oxford, 33: 13-18, 1978.
- TIEN, M. & KIRK, T.K. Lignin-degrading enzyme from the hyphenomycete *Phanerochaete chrysosporium*, Burds. Science, Washington, 12(6): 61-2, 1983.
- TILLEY, M.A. & TERRY, R.A. A two-stage technique for the in vitro digestion of forage crops. Journal of British Grassland Society, Oxford, 18: 104-11, 1963.

- TJERNELD, F.; PERSSON, I.; ALBERTSSON, P.; HAHN-HAGERDAL, B.
Enzymatic hydrolysis of cellulose in aqueous two-phase systems. I. Partition of cellulases from *Trichoderma reesi*. *Biotechnology and Bioengineering*, New York, 27: 1036-43, 1985a.
- TJERNELD, F.; PERSSON, I.; ALBERTSSON, P.; HAHN-HAGERDAL, B.
Enzymatic hydrolysis of cellulose in aqueous two-phase systems. II. Semicontinuous conversion of a model substrate, Solka Floc BW 200. *Biotechnology and Bioengineering*, New York, 27: 1044-50, 1985b.
- UDEN, P.; PARA, R.; VAN SOEST, P.J. Factors influencing reliability of the nylon bag technique. *Journal of Dairy Science*, Champaign, 57(1): 622, 1974.
- ULYATT, M.J. The feeding value of herbage. In: BUTLER, G.W. & BAILEY, R.W. *Chemistry and biochemistry of herbage*, London, Academic Press, 1973, p. 131-78.
- VALDES, E.V. & JONES, E.G. A comparison of in vitro and in vivo dry matter digestibility techniques for the evaluation of forage quality. *Canadian Journal of Animal Science*, Ottawa, 67: 573-6, 1987.
- VANDERHAEGHE, S. & BISTON, R. Estimation in vitro de la digestibilite des herbages. Adaptation de la methode pepsine-cellulase au systeme Fibertec Enzymatique. *Bulletin des Recherches Agronomiques de Gembloux, Gembloux*, 22(3): 209-19, 1987.
- VAN SOEST, P.J. Limiting factors in plant residues of low biodegradability. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, Amsterdam, 6: 135-43, 1981.
- VAN SOEST, P.J. *Nutritional ecology of the ruminant*. Oregon, O&B Books, 1982, 374p.

- VAN SOEST, P.J. The uniformity and nutritive availability of cellulose. *Federation Proceedings*, Bethesda, 32(7): 1804-8, 1973.
- VAN SOEST, P. & ROBERTSON, J.B. Systems of analysis for evaluation fibrous feeds. In: PIGDEN, W.J.; BALCH, C.C.; GRAHAM, M. ed. *Standardization of analytical methodology for feeds*. Ottawa, IDRC, 1980. p. 49-60.
- VAN SOEST, P.J.; WINE, R.H.; MOORE, L.A. Estimation of the true digestibility of forages by the in vitro digestion of cell walls. In: *INTERNATIONAL GRASSLAND CONGRESS*, 10., Helsinki, 1986. *Proceedings*, p.438-41.
- VAN TILBEURGH, H.; PETTERSSON, G.; BHIKABHAI, R.; DE BOECK, H.; CLAEYSSSENS, M. Studies of the cellulolytic system of *Trichoderma reesei* QM9414. *European Journal of Biochemistry*, Berlin, 148: 329-34, 1985.
- VARGA, G.A. & HOOVER, W.H. Rate and extent of neutral detergent fiber degradation of feedstuffs in situ. *Journal of Dairy Science*, Champaign, 66: 2109-15, 1983.
- WALDO, D.R. Model of cellulose disappearance from the rumen. *Journal of Dairy Science*, Champaign, 55(1): 125-9, 1972.
- WALKER, H.G.; MACKAY, B.E. ; MONTAGUE JR, W.C. Composition and enzymatic digestibility of oregon grass-straw. *Animal Feed Science and Technology*, Amsterdam, 9: 283-90, 1983.
- WEIMER, P.J. & WESTON, W.M. Relationship between the fine structure of native cellulose and cellulose degradability by the cellulase complexes of *Trichoderma reesei* and *Clostridium thermocellum*. *Biotechnology and Bioengineering*, New York, 27: 1540-7, 1985.

APÊNDICE

Tabela 1 - Valores e significância do F, coeficientes de determinação e erro padrão da estimativa ($\sqrt{QMR}$) para o estudo do potencial hidrolítico em função de tempo de reação e concentração enzimática, nos três sistemas celulolíticos.

1A: Variável 1 (Obs.: médias de três repetições)

AR	E1C1	E1C2	E1C3	E2C1	E2C2	E2C3	E3C1	E3C2	E3C3
M1	138.19	89.65	84.88	112.34	174.31	106.69	83.25	73.17	97.56
M2	0.8897	0.8391	0.8315	0.8675	0.9107	0.8614	0.8287	0.8094	0.8303
M3	0.78	0.94	0.99	0.75	0.65	0.79	1.02	1.19	1.09
M4	944.43	401.89	310.58	496.97	369.03	199.55	256.62	149.35	149.05
M5	0.9823	0.9593	0.9479	0.9669	0.9558	0.9211	0.9376	0.8972	0.8970
M6	0.06	0.09	0.11	0.09	0.11	0.14	0.15	0.21	0.21
M7	349.17	152.71	176.14	307.30	230.84	118.04	134.98	136.97	104.10
M8	0.9762	0.9469	0.9537	0.9730	0.9643	0.9323	0.9403	0.9412	0.9238
M9	0.36	0.54	0.52	0.34	0.41	0.55	0.60	0.66	0.78
M10	6.75	5.73	5.09	5.56	7.01	6.14	5.46	4.32	5.20
M11	0.2528	0.2177	0.1940	0.2116	0.2612	0.2311	0.2080	0.1633	0.1982
M12	0.40	0.41	0.44	0.47	0.44	0.45	0.55	0.61	0.58

M1 ==> Linear
 M2 ==> Logaritmico
 M3 ==> Quadratico
 M4 ==> Gompertz
 AR ==> Acucar redutor

E1C1 ==> Enzima 1, concentracao 1
 E1C2 ==> Enzima 1, concentracao 2
 E1C3 ==> Enzima 1, concentracao 3
 E2C1 ==> Enzima 2, concentracao 1
 E2C2 ==> Enzima 2, concentracao 2
 E2C3 ==> Enzima 2, concentracao 3
 E3C1 ==> Enzima 3, concentracao 1
 E3C2 ==> Enzima 3, concentracao 2
 E3C3 ==> Enzima 3, concentracao 3

* ==> 0.01<p<0.05 ==> significativo
 ns ==> p>0.05 ==> nao significativo
 obs.: Todos os demais sao altamente significativo

1B: Variável 2 (Obs.: médias de três repetições)

CS	E1C1	E1C2	E1C3	E2C1	E2C2	E2C3	E3C1	E3C2	E3C3
	137.17	124.12	148.25	124.71	73.76	110.82	60.78	77.64	68.07
M1	0.8890	0.8787	0.8965	0.8792	0.8106	0.8659	0.7786	0.8185	0.7978
	5.79	5.64	5.21	5.78	7.62	7.55	8.54	7.59	8.18
	369.79	444.32	332.74	296.52	137.41	98.15	115.21	311.87	352.37
M2	0.9559	0.9631	0.9513	0.9456	0.8892	0.8511	0.8704	0.9482	0.9539
	0.07	0.06	0.07	0.10	0.16	0.32	0.15	0.08	0.07
(2)									
	202.07	249.80	156.98	165.23	80.66	79.48	77.72	157.35	162.55
M3	0.9594	0.9670	0.9483	0.9508	0.9036	0.9023	0.9003	0.9484	0.9500
	3.50	2.94	3.68	3.69	5.44	6.44	5.73	4.04	4.07
	7.51	7.39	8.62	6.88	5.31	5.21	4.86	5.65	5.27
M4	0.2768	0.2731	0.3096	0.2572	0.2023	0.1985	0.1852	0.2150	0.2006
	0.30	0.26	0.25	0.36	0.43	0.74	0.37	0.31	0.29

M1 ==> Linear
 M2 ==> Logaritmico
 M3 ==> Quadratico
 M4 ==> Gompertz
 CS ==> Celulose solubilizada

E1C1 ==> Enzima 1, concentracao 1
 E1C2 ==> Enzima 1, concentracao 2
 E1C3 ==> Enzima 1, concentracao 3
 E2C1 ==> Enzima 2, concentracao 1
 E2C2 ==> Enzima 2, concentracao 2
 E2C3 ==> Enzima 2, concentracao 3
 E3C1 ==> Enzima 3, concentracao 1
 E3C2 ==> Enzima 3, concentracao 2
 E3C3 ==> Enzima 3, concentracao 3

* ==> 0.01<p<0.05 ==> significativo
 ns ==> p>0.05 ==> nao significativo
 obs.: Todos os dados sao altamente significativo

1C: Variável 3 (Obs.: médias de três repetições)

ATESP	E1C1	E1C2	E1C3	E2C1	E2C2	E2C3	E3C1	E3C2	E3C3
ug	124.18	74.70	70.53	98.99	117.76	72.05	70.96	74.34	16.10
	0.8787	0.8126	0.8202	0.8522	0.8729	0.8069	0.8045	0.8118	0.4704
AR	101.32	129.76	62.39	137.25	66.30	43.79	86.74	53.20	54.05
	837.36	233.36	330.26	385.94	261.97	114.42	193.03	137.68	35.98
/	0.9805	0.9318	0.9509	0.9377	0.9388	0.8696	0.9248	0.8894	0.6730
	0.06	0.12	0.11	0.11	0.13	0.19	0.17	0.22	0.37
ng	227.47	90.89	137.64	179.56	100.11	57.40	90.83	139.61	19.77
	0.9638	0.9136	0.9414	0.9346	0.9210	0.8690	0.9136	0.9422	0.6883
PROT	99.08	88.10	35.61	76.09	52.27	36.07	57.68	29.48	41.46
/	6.72 *	5.53 *	5.10 *	5.50 *	6.86 *	5.71 *	5.34 *	4.26 *	1.33 ns
m1	0.2519	0.2104	0.1942	0.2093	0.2565	0.2170	0.2032	0.1612	0.0192
	0.40	0.42	0.44	0.47	0.45	0.46	0.56	0.61	0.63

M1 ==> Linear
 M2 ==> Logarítmico
 M3 ==> Quadrático
 M4 ==> Gompertz
 ATESP ==> Atividade específica

E1C1 ==> Razão 1, concentração 1
 E1C2 ==> Razão 1, concentração 2
 E1C3 ==> Razão 1, concentração 3
 E2C1 ==> Razão 2, concentração 1
 E2C2 ==> Razão 2, concentração 2
 E2C3 ==> Razão 2, concentração 3
 E3C1 ==> Razão 3, concentração 1
 E3C2 ==> Razão 3, concentração 2
 E3C3 ==> Razão 3, concentração 3

* ==> 0.01<p<0.05 ==> significativo
 ns ==> p>0.05 ==> não significativo
 obs.: Todos os demais são altamente significativo

1D: Variável 4 (Obs.: médias de três repetições)

VELOC	E1C1	E1C2	E1C3	E2C1	E2C2	E2C3	E3C1	E3C2	E3C3
1	32.39	43.69	51.86	42.56	28.30	25.69	32.23	39.93	33.82
M1	0.6487	0.7152	0.7495	0.7097	0.6163	0.5923	0.6475	0.6960	0.6588
ug	2.56	2.22	1.99	1.58	2.07	2.27	1.54	1.51	1.76
AR	2101.12	885.56	591.74	744.52	585.67	346.33	210.10	98.10	107.14
M2	0.9920	0.9811	0.9720	0.9776	0.9717	0.9531	0.9403	0.8510	0.8619
/	0.06	0.09	0.11	0.09	0.11	0.14	0.15	0.21	0.21
min	45.65	72.39	96.49	63.97	34.95	26.78	28.27	28.26	26.30
M3	0.8401	0.8936	0.9183	0.8811	0.7998	0.7520	0.7617	0.7623	0.7486
/	1.73	1.36	1.14	1.01	1.49	1.77	1.26	1.33	1.52
m1	10.44	11.21	12.23	12.22	9.83	10.16	12.33	14.07	11.21
M4	0.3572	0.3753	0.3978	0.3977	0.3420	0.3502	0.4000	0.4347	0.3753
/	0.55	0.55	0.52	0.49	0.53	0.54	0.44	0.41	0.44

M1 ==> Linear E1C1 ==> Enzima 1, concentracao 1 ‡ ==> 0.01<p(0.05 ==> significativo
 M2 ==> Logaritmico E1C2 ==> Enzima 1, concentracao 2 ns ==> p>0.05 ==> nao significativo
 M3 ==> Quadratico E1C3 ==> Enzima 1, concentracao 3 obs.: Todos os demais sao altamente significativo
 M4 ==> Gompertz E2C1 ==> Enzima 2, concentracao 1
 VELOC ==> Velocidade E2C2 ==> Enzima 2, concentracao 2
 de reacao E2C3 ==> Enzima 2, concentracao 3
 E3C1 ==> Enzima 3, concentracao 1
 E3C2 ==> Enzima 3, concentracao 2
 E3C3 ==> Enzima 3, concentracao 3

Tabela 2 - Valores e significância de F, coeficientes de determinação e erro padrão da estimativa ($\sqrt{QMR}$) para o estudo de correlações entre os métodos analíticos de parede celular (PCC x PCE).

		F	CD	$\sqrt{QMR}$
FORRAGENS	M1	32.13	0.5344	7.11
CONSERVADAS	M2	47.15	0.6274	0.09
n=10	M3	28.96	0.6821	5.98
GRAMÍNEAS	M1	76.06	0.5317	3.15
n=23	M2	79.10	0.5414	0.04
	M3	37.47	0.5317	3.17
LEGUMINOSAS	M1	69.29	0.6340	4.84
n=14	M2	70.99	0.6396	0.08
	M3	33.95	0.6352	4.90
RESÍDUOS	M1	112.81	0.8368	4.94
AGRICOLAS	M2	111.86	0.8357	0.07
n=8	M3	57.50	0.8456	4.91
TOTAL	M1	410.25	0.7157	5.83
n=55	M2	465.19	0.7405	0.08
	M3	209.66	0.7213	5.79

M1 → linear

M2 → logarítmico

M3 → quadrático

PCC → Parede celular pelo sistema convencional (detergente neutro)

PCE → Parede celular pelo sistema enzimático

CD → Coeficiente de determinação

QMR → Quadrado médio do resíduo

Obs.: Todos os valores de F são altamente significativos ($p < 0.01$)

Tabela 3 - Valores e significância do F para ajustes de modelo, tomando PCC, PCE e PCC x PCE como covariáveis para as avaliações nos distintos grupos de forragens.

			MSD(TT)		MSD(ENZ1)		CED(ENZ1)		MSD(ENZ2)		CED(ENZ2)
F.C.	PCC		38.01 ns		111.27 ns		56.68 **		142.21 ns		20.43 *
n=10	PCE		37.74 ns		111.20 ns		38.85 ns		147.08 ns		19.24 *
	IPCC x PCE		32.97 ns/ns		97.69 ns/ns		49.84 **/ns		192.40 ns/**		20.11 ns/ns
G.	PCC		18.75 ns		24.40 ns		22.17 **		63.32 **		28.90 **
n=23	PCE		22.29 **		28.02 *		19.47 ns		56.62 *		25.43 *
	IPCC x PCE		21.92 ns/**		26.29 ns/*		21.14 */ns		60.60 */ns		27.62 */ns
L.	PCC		31.90 ns		163.29 ns		52.07 ns		294.33 ns		28.21 ns
n=14	PCE		31.53 ns		167.24 ns		51.80 ns		291.51 ns		26.87 ns
	IPCC x PCE		29.06 ns/ns		155.65 ns/ns		46.92 ns/ns		280.63 ns/ns		25.44 ns/ns
R.A.	PCC		107.37 ns		393.90 ns		358.13 ns		962.12 **		161.34 ns
n=8	PCE		90.32 ns		317.51 ns		455.07 ns		404.61 ns		178.40 ns
	IPCC x PCE		96.40 ns/ns		339.15 ns/ns		385.09 ns/ns		803.96 **/ns		148.22 ns/ns
TOTAL	PCC		53.39 ns		171.83 ns		125.05 ns		276.39 ns		56.87 **
n=55	PCE		53.74 ns		182.21 **		122.16 ns		291.48 *		51.65 ns
	IPCC x PCE		52.60 ns/ns		179.77 ns/**		121.86 ns/ns		283.39 ns/*		55.61 ns/**

MSD(TT) ==> Materia seca digestivel (Tilley & Terry)

MSD(ENZ1) ==> Materia seca digestivel (ENZIMA 1)

MSD(ENZ2) ==> Materia seca digestivel (ENZIMA 2)

CED(ENZ1) ==> Carboidratos estruturais disponiveis (ENZIMA 1)

CED(ENZ2) ==> Carboidratos estruturais disponiveis (ENZIMA 2)

PCC ==> Parede celular pelo sistema convencional

PCE ==> Parede celular pelo sistema enzimatico

ns ==> $p > 0.05$ ==> nao significativo

* ==> $0.01 < p < 0.05$ ==> significativo

** ==> $p < 0.01$ ==> altamente significativo

F.C. ==> Forragens conservadas

G. ==> Gramineas

L. ==> Leguminosas

R.A. ==> Residuos agricolas

Tabela 4 - Valores e significância do F, coeficientes de determinação para estudos do potencial digestível, por sistemas *in vitro* (microbiológico e enzimático).

MSD(TT) x E16, E1C, E26 e E2C						
E16(MSD) : E1C(CED) : E26(MSD) : E2C(CED)						
FORRAGENS	M1	39.92	23.85	41.82	1.33	ns
		0.5877	0.4600	0.5989	0.0520	
CONSERVADAS	M2	33.97	23.72	41.86	7.70	
		0.5482	0.4587	0.5992	0.2158	
n=10	M3	38.71	12.96	29.69	8.81	
		0.7414	0.4899	0.6874	0.3950	
GRAMINEAS	M1	50.03	8.35	97.62	8.37	
		0.4275	0.1108	0.5930	0.1111	
n=23	M2	41.94	7.09	86.30	11.42	
		0.3850	0.0960	0.5630	0.1456	
LEGUMINOSAS	M3	29.68	5.19	53.88	4.12	*
		0.4736	0.1359	0.6202	0.1111	
n=14	M1	335.17	14.85	193.38	46.49	
		0.8934	0.2708	0.8286	0.5375	
RESIDUOS AGRICOLAS	M2	382.78	11.27	212.71	42.05	
		0.9054	0.2199	0.8417	0.5125	
n=8	M3	184.65	12.17	102.99	28.95	*
		0.9045	0.3842	0.8408	0.5975	
TOTAL	M1	22.47	1.01	66.96	23.61	
		0.5291	0.0480	0.7700	0.5414	
n=55	M2	36.22	7.21	49.85	36.46	
		0.6443	0.2651	0.7137	0.6458	
	M3	13.08	4.78	32.06	14.46	
		0.5793	0.3350	0.7714	0.6063	
	M1	246.95	3.32	411.06	23.95	*
		0.6053	0.0200	0.7186	0.1295	
	M2	285.17	28.46	413.09	52.65	
		0.6392	0.1502	0.7196	0.2464	
	M3	124.85	3.24	209.38	12.33	
		0.6095	0.0390	0.7236	0.1335	

MSD(TT) ==> Materia seca digestível (Tilley - Terry)

E16 ==> MSD, E1, materia seca digestível (ENZ 1)

E1C ==> CED, E1, carboidratos estruturais disponíveis (ENZ 1)

E26 ==> MSD, E2, materia seca digestível (ENZ 2)

E2C ==> CED, E2, carboidratos estruturais disponíveis (ENZ 2)

M1 ==> linear

M2 ==> logarítmico

M3 ==> quadrático

* ==> 0.01 < p < 0.05 ==> Significativo

ns ==> p > 0.05 ==> não significativo

obs.: ==> Todos os demais são altamente significativo

Tabela 5 - Valores e significância de F, coeficientes de determinação para estimativas de matéria seca digestível pelo método colorimétrico através dos sistemas enzimáticos (*in vitro*).

	FORRAGENS CONSERVADAS		GRAMINEAS		LEGUMINOSAS		RESÍDUOS AGRÍCOLAS		
	CHD1	CHD2	CHD1	CHD2	CHD1	CHD2	CHD1	CHD2	
M1	F	0.1820	70.8300	119.1700	304.5400	27.3200	215.3600	44.4700	59.9400
	CD	0.0064	0.7167	0.6401	0.8197	0.4058	0.8434	0.6690	0.7498
	SIG	n.s.							
M2	F	0.3220	71.7000	114.5100	286.5700	28.2800	171.3800	49.2100	74.2900
	CD	0.0114	0.7192	0.6309	0.8105	0.4142	0.8108	0.6910	0.7879
	SIG	n.s.							
M3	F	0.3440	101.4200	64.8800	192.8100	13.4500	237.9600	31.6600	48.2900
	CD	0.0248	0.8825	0.6628	0.8539	0.4083	0.9243	0.7509	0.8356
	SIG	n.s.							

CHD1 ==> Carboidratos estruturais disponíveis (EHZ1)

CHD2 ==> Carboidratos estruturais disponíveis (EHZ2)

M1 ==> LINEAR

M2 ==> LOGARÍTMICO

M3 ==> QUADRÁTICO

n.s. => não significativo

Obs.: Todos os dados são altamente significativo ($p < 0.01$)