

10^o

FEPEG FÓRUM

ENSINO • PESQUISA
EXTENSÃO • GESTÃO

RESPONSABILIDADE SOCIAL: INDISSOCIABILIDADE
ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO UNIVERSITÁRIA



ISSN 1806-549 X

Autor(es): PRÍCILA JULIETA DANTAS ROCHA, HENRIQUE MAIA VALERIO, EDUARDO ROBSON DUARTE, RENATHA ALVES SILVA, JANETE MARIA DA SILVA ALVES

DEGRADABILIDADE DE MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS POR *Aspergillus terreus* ISOLADOS DO RÚMEN DE BOVINOS

INTRODUÇÃO

No período de seca os ruminantes se alimentam de materiais com alto conteúdo de carboidratos lignificados de baixa digestibilidade, sendo a microbiota autóctone do rúmen responsável pela degradação e digestibilidade desses resíduos. A biomassa lignocelulósica, representa um material natural, renovável e de fácil obtenção como fonte alternativa para o crescimento microbiano visando à produção de complexos enzimáticos. (DA SILVA *et al.*, 2005). Fungos filamentosos isolados do rúmen são capazes de produzir enzimas extracelulares que degradam açúcares simples em temperatura e pH ruminal. (BAUCHOP 1989; PAUL *et al.*, 2010). O gênero *Aspergillus* é promissor para a produção de celulases e xilanases, ambas de alto interesse biotecnológico (SANCHEZ, 2009). O grande potencial de mercado, o significativo papel das celulases nos processos biotecnológicos e a sua ampla aplicação representam motivação para pesquisa e desenvolvimento contínuo de tecnologias fermentativas para melhoramento de todo o processo de obtenção de enzimas por diferentes isolados. Nesta pesquisa avaliou-se a degradação de materiais lignocelulósicos em diferentes pHs e fontes de nitrogênio por *Aspergillus terreus* isolado do fluido ruminal de bovinos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Neste estudo foram avaliados cinco isolados de *Aspergillus terreus* provenientes do rúmen de bovinos de corte criados em pastagens lignificadas do Norte de Minas Gerais. Os fungos foram conservados pelo método de Castellani e estocados no Laboratório de Micologia do Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Minas Gerais, onde foram realizados todos os experimentos deste estudo. O repique dos isolados foi realizado em meio BDA – *Batata, Dextrose, Agar* (Acumedia®, Brasil), a 38 °C por 4 dias. Os materiais lignocelulósicos foram moídos em moinho de facas Willy com granulometria de 1-3 mm, abrigados ao alcance do sol e da umidade até a realização do experimento. Em seguida foram pesados em balança analítica e acondicionados em saquinhos de *nylon* com dimensões de 2 x 4 cm e gramatura de 100 µm. Após o período de crescimento, os isolados foram inoculados em meio líquido contendo glicose e peptona de carne, nas concentrações de 20 g/L e 10 g/L respectivamente, durante 6 dias a 38 °C. Utilizando fermentação submersa, o inóculo contendo aproximadamente 400 UFC/mL foi distribuído em 2 mL em três repetições em tubos previamente autoclavados contendo 30 mL de meio líquido (meio c) acrescido 5 g/L de sulfato de amônio, 1 g/L de fosfato monobásico de potássio e 0,5 g/L de magnésio heptahidratado e 1% (0,33 gramas) de feno de *Brachiaria decumbens* (Bd) lignificada ou bagaço de cana (Bc) seco, apresentando 91,76% e 93,25% de matéria seca, respectivamente. Para os tubos controle não foram adicionados os inóculos aos tubos. O pH do meio foi ajustado para 6,0 por meio da adição de 200 mL de tampão fosfato de sódio 0,1 M ao volume total de meio preparado. Os fungos foram mantidos em *termoshaker* (NT 715, Novatécnica, São Paulo, Brasil) por 216 horas, a 38 °C e 150 rpm. Os dados de pH da fermentação submersa foram coletados nos tempos 0, 72, 144 e 216 horas e aferidos no pHmetro digital (PG1800, Gehaka, São Paulo, Brasil). Após o período de incubação, o material foi centrifugado para separação das massas fúngicas, que foram secas juntamente com os saquinhos, em placas de Petri, em estufa de circulação forçada a 40 °C até obter peso constante para mensurar a matéria seca dos substratos degradados em determinador de Umidade (MOC63u Shimadzu, Quioto, Japão). As placas foram pesadas antes e depois do período de secagem, para obtenção do peso real de massa fúngica. O fermentado foi reservado e mantido em Ultrafreezer a -86 °C para posteriores dosagens enzimáticas. O experimento foi conduzido com três repetições para cada tratamento, comparando-se 5 isolados além do controle, sem a presença de microrganismo. As variáveis observadas foram pH, massa fúngica, peso seco dos resíduos dos materiais lignocelulósicos e taxa de degradação de matéria seca dos substratos. Para o pH, utilizou-se o delineamento em parcela subdivida 5X4 (5 isolados e 4 intervalos de tempo) para cada substrato. Para a massa fúngica e taxa de degradação, utilizou-se o fatorial 2X5 (2 substratos e 5 isolados). Após teste de normalidade e homogeneidade, os dados foram submetidos à análise de variância e comparados com o controle, as médias foram comparadas a 5% de significância pelo teste de Duncan. Os dados foram analisados utilizando-se o Sistema para Análises Estatísticas, SAEG, Versão 9.1.

10^o

FEPEG FÓRUM

ENSINO • PESQUISA
EXTENSÃO • GESTÃO

RESPONSABILIDADE SOCIAL: INDISSOCIABILIDADE
ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO UNIVERSITÁRIA



ISSN 1806-549 X

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O fungo *Aspergillus terreus* foi eficiente na degradação de ambos os substratos, não havendo diferenças significativas entre a degradabilidade e a massa fúngica para os isolados em Bc e Bd ($p < 0,05$, Teste de Wilcoxon) (Tabela 1). A taxa de degradação não foi influenciada pelos isolados ou substratos utilizados, apresentando média de 19,42% +/- 3,63%. A Bd obteve média de degradabilidade pelo fungo de 30,25% e o bagaço de cana 20,07%, mas não houve diferença significativa entre os isolados avaliados (Tabela 1). Antes de iniciar a fermentação foi observada uma variação do pH logo após adição dos substratos. A variação observada na figura 1 na coluna $t=0$ para o substrato Bc foi de uma leve acidificação do meio, exceto para o isolado 42. Enquanto que para a Bd o pH aumentou, exceto para o isolado 7 (Figura 2). A média final do pH para a fermentação com Bc foi significativamente menor em relação a Bd ($p > 0,05$; Teste de Duncan). A *Brachiaria decumbens* apresenta teor de lignina maior em relação ao bagaço de cana e segundo JEOH e colaboradores (2007), uma das limitações da hidrólise enzimática é o acesso das enzimas às moléculas de celulose uma vez que a lignina presente na parede celular vegetal bloqueia o acesso do complexo enzimático à celulose (NAKATANI *et al.*, 2008). Embora a *Brachiaria decumbens* apresente maior teor de lignina em relação ao bagaço de cana, neste trabalho não se verificou limitações nas hidrólises, como pode ser visto na tabela 1. Os materiais lignocelulósicos submetidos a pré-tratamentos, como a explosão a vapor, sofrem alterações na distribuição topoquímica da lignina na parede celular, sem alterar o teor deste componente (DONOHOE *et al.*, 2008). Ao autoclavar os materiais lignocelulósicos, a 121°C por 15 min e 1 atm, a lignina sofreu alterações em sua estrutura e, de acordo com VÁRNAI e colaboradores (2010), uma simples realocação da lignina é suficiente para obtenção de maiores rendimentos na hidrólise do material.

CONCLUSÕES

Neste estudo, constatou-se boa taxa de degradação dos isolados avaliados. O sulfato de amônio é promissor para a atividade biodegradativa pelo *Aspergillus terreus*. A adição do tampão fosfato de sódio foi de extrema importância para a simulação do ambiente ruminal. Em futuros estudos, estes isolados poderão ser selecionados para produção enzimática e elaboração de aditivos microbianos para melhorar a utilização de forragens lignificadas para os ruminantes.

AGRADECIMENTOS: Aos laboratórios de Micologia do ICA - UFMG e Microbiologia Ambiental – UNIMONTES pelo total acesso durante o período de experimentos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- DONOHOE, B.S., *et al.* Visualizing lignin coalescence and migration through maize cell walls following thermochemical pretreatment. **Biotechnology and bioengineering**, v. 101, p. 913-925, 2008.
- FACCHINI, F.D.A.; VICI, A.C.; REIS, V.R.A.; JORGE, J.A.; TERENCE, H.F.; REIS, R.A.; POLIZELI, M.L.T.M. Production of fibrolytic enzymes by *Aspergillus Japonicus* C 03 using industrial residues with potencial application as additives in animal feed. **Bioprocess Biosyst. Eng.** v. 34, p. 347-355, 2010.
- MARTINS, A.S.; VIEIRA, P.F.; BERCHIELLI, T.T.; PRADO, I. N.; GARCIA, J.A.S. "Eficiência de síntese microbiana e atividade enzimática em bovinos submetidos à suplementação com enzimas fibrolíticas". **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, p. 1194-1200, 2006.
- NAKATANI, T. *et al.* Micropore structure of Wood: Change in micropore structure accompanied by delignification. **Journal of Wood Science**, v. 54, p. 252-255, 2008.
- ORDELANDELLI, R.C.; SPECIAN, V.; FELBER, A.C.; PAMPHILE, J.A. "Enzimas de interesse industrial: produção por fungos e aplicações". **SaBios: Rev. Saúde e Biol.**, vol. 7, p. 97-109, 2012.
- SÁNCHEZ, C. Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. **Biotechnology Advances**, v. 27, p. 185-194, 2009.
- SANDRA, J.A.; VAN, K.; ANTON, S.M.; JOHAN, J.P.; BAARS, W.; JOHN, W.C. "Fungal treatment of lignocellulosic biomass: importance of fungal species, colonization and time on chemical composition and in vitro rúmen degradability". **Animal Feed Science and Technology**, v. 209, p. 40-50, 2015.
- VÁRNAI, A.; SIIKA-AHO, M.; VIHKARI, L. Restriction of the enzymatic hydrolysis of steam-pretreated spruce by lignin and hemicellulose. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 46, p. 185-193, 2010.



Tabela 1: Dados da fermentação submersa dos isolados de *Aspergillus terreus* que foram mantidos por 216 horas, 150 rpm e 38°C em meio contendo sulfato de amônio como fonte de nitrogênio e bagaço de cana ou *Brachiaria decumbens* como substratos.

Isolados	pH		Massa do fungo (g)		Degradabilidade do substrato (%)	
	CANA	BRACHIARIA	CANA	BRACHIARIA	CANA	BRACHIARIA
15	5,72 c	6,00 d	0,04 a	0,04 a	21,83 a	19,23 a
22	5,54 d	5,80 e	0,63 a	0,03 a	18,17 a	36,39 a
7	5,91 b	6,19 b	0,29 a	0,10 a	21,61 a	32,79 a
42	5,52 e	6,80 a	0,14 a	0,05 a	17,64 a	33,11 a
79	5,94 a	6,16 c	0,10 a	0,02 a	21,11 a	29,73 a
Coefficiente de variação (%)	3,87	2,35	235,20	235,20	28,445	28,445

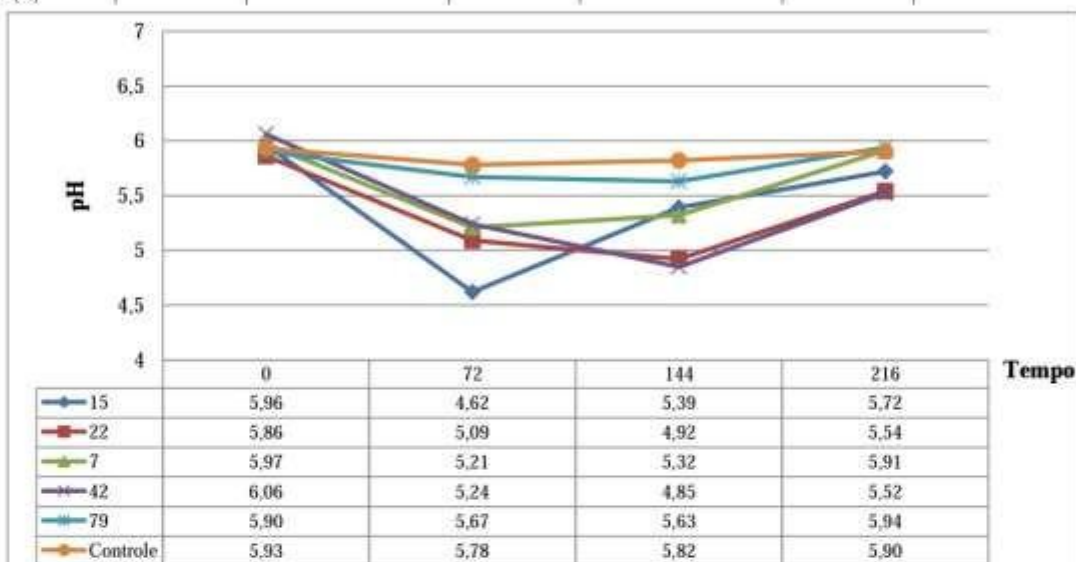


Figura 1: Variação do pH durante as 216 horas de fermentação dos isolados de *Aspergillus terreus* em meio contendo sulfato de amônio como fonte de nitrogênio e bagaço de cana como fonte de carbono (substrato).



Figura 2: Variação do pH durante as 216 horas de fermentação dos isolados de *Aspergillus terreus* em meio contendo sulfato de amônio como fonte de nitrogênio e *Brachiaria decumbens* como fonte de carbono (substrato).