

## FUNGOS AERÓBIOS FACULTATIVOS DO RÚMEN COMO PRODUTORES DE ENZIMAS CELULOLÍTICAS E XILANOLÍTICAS A PARTIR DE *BRACHIARIA decumbens*

Cíntia Chaves Rodrigues<sup>1</sup>; Cláudio Eduardo Silva Freitas<sup>2</sup>; Mara Lúcia Albuquerque Pereira<sup>3</sup>, Eduardo Robson Duarte<sup>4</sup>

**Resumo:** Objetivou-se quantificar a produção de enzimas celulolíticas e xilanolíticas de fungos aeróbios facultativos do rúmen. Avaliou-se o efeito da fermentação em estufa de CO<sub>2</sub> nos tempos de 24, 48, 72 e 96h. Foram selecionados dois fungos filamentosos e dois leveduriformes, os fungos foram cultivados em meio de cultura contendo *Brachiaria decumbens* como única fonte de carbono. A atividade celulolítica e xilanolítica foi estimada pela capacidade hidrolítica do extrato enzimático dos fungos cultivados em *Brachiaria decumbens* sobre os substratos carboximetilcelulose e xilanase. Observou-se que a produção enzimática dos fungos filamentosos foi significativamente maior ( $p < 0,05$ ). A utilização da *Brachiaria decumbens* como fonte de carbono se mostrou eficaz para a atividade celulolítica e xilanolítica de fungos isolados do rúmen, indicando potencial biotecnológico para produção dessas enzimas.

**Palavras-chave:** Brachiaria. Celulases. Fungos. Xilanases

### Introdução

Os ruminantes possuem um sistema de pré-estômagos com ampla variedade microbiana (STEWART, 1994). A anaerobiose do rúmen é uma das principais restrições ao crescimento de microrganismos. Deste modo, somente sobrevivem os organismos tolerantes ao meio, o restante é eliminado (KAMRA, 2005). As características enzimáticas de diversos fungos demonstram importância na degradação da lignocelulose (KAMRA, 2005). Na literatura, há poucas descrições sobre as atividades realizadas por fungos aeróbios facultativos no ambiente ruminal. Tendo em vista o potencial biotecnológico da produção enzimática desses microrganismos, este estudo visa a quantificação de enzimas celulolíticas excretadas pelos mesmos.

---

1 Discente do curso Técnico em Química Integrado ao Ensino Médio do IFNMG, Campus Montes Claros. Bolsista do PIC-Jr pelo CNPq na UFGM-ICA. Email: cintia\_chavesr@hotmail.com

2 Doutorando em Zootecnia da UESB, Campus Itapetinga. Email: eduardo-freitasmoc@hotmail.com

3 Docente da UESB, Campus Itapetinga. Email: marauesb@yahoo.com.br

4 Docente da UFGM-ICA. Email: duartevet@hotmail.com

## Material e Métodos

Os microorganismos utilizados para a produção das enzimas do complexo celulolítico e xilanolítico foram isolados do trato digestório de ovinos alimentados com forragens tropicais na região norte do Estado de Minas Gerais.

Os fungos foram inoculados em ágar-batata-dextrose por até sete dias a 37°C. A cultura esporulada foi suspensa em solução de Tween 80 a 0,01%, onde foi efetuada a contagem do número de células em suspensão utilizando câmara de Neubauer com auxílio do microscópio binocular.

Foram avaliadas as atividades enzimáticas de dois isolados de fungos micelianos correspondentes a um *Trichoderma* sp. e um *Aspergillus* sp. e dois fungos leveduriformes provenientes dos grupos de animais amostrados. Cada isolado foi reinoculado em meio contendo 0,5% de sulfato de amônio, 0,05% de sulfato de magnésio heptahidratado e 1% de *Brachiaria decumbens* como substrato.

As fermentações foram realizadas em Erlenmeyers utilizando o meio descrito acima com a adição de 10<sup>7</sup>UFC. Os cultivos foram conduzidos a 37° C em incubadora de CO<sub>2</sub>, com o tempo fermentativo de 24, 48, 72 e 96 horas de incubação. Após o processo fermentativo o extrato enzimático foi recolhido e centrifugado a 14.000rpm a 4°C por 30 minutos, o sobrenadante foi aproveitado como fonte de enzimas microbianas. Para a dosagem das enzimas foi utilizada metodologia por Miller, 1959 e Ghose, 1987.

A atividade da enzima xilanase foi determinada segundo Miller (1959). A reação consiste na mistura contendo 0,5mL de sobrenadante da cultura (extrato enzimático), 0,5mL de solução de 0,25% de xilana em 0,1M de tampão fosfato pH 6,8 e 1 mL da solução de DNS. As amostras foram incubadas a 39°C por 15 minutos e o sistema enzima-substrato foi agitado periodicamente para manter a xilana em suspensão. As leituras das absorbâncias de cada ensaio foram efetuadas em 540nm (Gokhale, 1986). O experimento foi conduzido com delineamento experimental inteiramente casualizado com 4 repetições. Para quantificação enzimática os dados foram submetidos à análise de variância em nível de 5% de probabilidade e posterior análise de regressão. Os dados foram processados no Software SAS (SAS INSTITUTE, 2000).

## Resultados e Discussão

Os quatro micro-organismos cultivados na *Brachiaria decumbens* como fonte de carbono apresentaram atividade celulolítica e xilanolítica. Entretanto, ao comparar a produção enzimática nos diferentes tempos, observou-se que a produção enzimática dos fungos filamentosos foi significativamente maior ( $p < 0,05$ ). Para atividade de xilanase e CMCase o fungo *Thichoderma* sp. produziu respectivamente 10,22 e 47,33nanomol/L com 48 horas de incubação considerado bom índice para produção de enzimas celulolíticas (TEATHER; WOOD, 1982).

Estudos realizados com fungos do gênero *Trichoderma* cultivados a partir do bagaço de cana (BASSO, 2010) e com o gênero *Aspergillus* cultivado em farelo de cacau (DOS SANTOS, 2013) demonstram significativos resultados de suas

atividades enzimáticas. Tais relações com outros exames possibilitam observar que os fungos utilizados neste trabalho também possuem resultados significativos quando cultivados em outras fontes de carbono, o que demonstra sua importância no ambiente ruminal.

## Conclusões

A utilização da *Brachiaria decumbens* como fonte de carbono se mostrou eficaz para a atividade celulolítica e xilanolítica. O uso com fungos filamentosos é promissor para diversas aplicações. Porém, a produção enzimática dos leveduriformes não se mostrou expressiva. É interessante a utilização desses microrganismos em novos ensaios com outras fontes de carbono, assim como, a utilização da *Brachiaria decumbens* para experimentos com outras espécies microbianas, em outras circunstâncias.

## Referências

BASSO, T. P.; GALLO, C. R.; BASSO, L. C. Atividade celulolítica de fungos isolados de bagaço de cana-de-açúcar e madeira em decomposição. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 45, p. 1282-1289, 2010.

GHOSE, T.K. Measurement of cellulase activities. *Pure and Applied Chemistry*, v.59, p.257-268, 1987.

KAMRA, D. N. Rumen Microbial Ecosystem. *Current Science*, v. 89, p. 125- 35, 2005.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylle acid for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

SAS INSTITUTE. **SAS/STAT User's guide**. Version 8. Cary, NC, 2000.

STEWART, C. S. Plant-Animal and Microbial Interactions in Ruminant Fibre Degradation. In: PRINS, R. A., STEWART, C. S. (Ed.). *Micro-organisms in Ruminant Nutrition*. Dalfsen: Nottingham University Press, Cap. 2, p.13-28, 1994.

TEATHER, R. M.; WOOD, P. J. Use of Congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 43, p. 777-780, 1982.

## Agradecimentos

Os autores agradecem ao CNPq e CAPES pelas bolsas de pesquisa concedidas. Agradecem, também, FAPESB e FAPEMIG pelo apoio.