

CONSTRUINDO SABERES, FORMANDO PESSOAS E TRANSFORMANDO A PRODUÇÃO ANIMAL

ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE ISOLADOS FÚNGICOS RUMINAIS PROVENIENTES DE OVINOS SANTA INÊS

Thiago Dias SILVA*¹, Isabel Thayse BARBOSA¹, Rafael Ícaro Matos VIEIRA¹,
Jéssica da Silva MENDES¹, Regina Maria de Fátima DIAS¹, Flávia Oliveira
ABRÃO¹, Thais Dias e SILVA², Moisés Sena PESSOA³

*autor para correspondência: thiago.zootecnia@outlook.com

¹Instituto Federal Goiano, Ceres, Goiás, Brasil

²Farmacêutica e Bioquímica, Goiânia, Goiás, Brasil

³Zootecnista, Ceres, Goiás, Brasil

Abstract: The objective of this study was to verify the biotechnological potential of ruminal fungal isolates from Santa Inês sheep fed high grain diets. Twenty-seven fungal isolates were inoculated into starch, cellulose, casein and pectin at three different incubation times (24, 42 and 72 hours). The size of the colony (SC) and the enzymatic halo (EH) of each fungus were measured and the enzymatic activity (EA=EH/SC) was determined. Friedman test was applied to verify the effect of the incubation periods and Kruskal-Wallis to test the source of the substrate on SC, EH and AE. At 72 hours, SC and EH were higher ($P<0.01$) independent of the substrate evaluated. When evaluating each substrate separately, the lowest SC at 24 hours was for pectin ($P<0.01$), while at 48 and 72 hours there was no significant difference ($P>0.05$). At 24 and 48 hours there was higher EH ($P<0.01$) for fungi inoculated in starch and cellulose. At 72 hours the lowest EH ($P<0.01$) was for fungi inoculated in casein. There was higher EA ($P<0.01$) in starch and cellulose, independent of the incubation period evaluated. It is concluded that the ruminal isolates evaluated have potential to be used mainly in the production of exoenzymes.

Palavras-chave: applied microbiology, enzymes, exoenzymes, filament fungi, ruminants

Promoção e Realização:



Apoio Institucional:



Organização:



CONSTRUINDO SABERES, FORMANDO PESSOAS E TRANSFORMANDO A PRODUÇÃO ANIMAL

Introdução

As dietas de alto grão vêm sendo frequentemente empregadas em sistemas de confinamento, uma vez que garante-se rações balanceadas com benefícios ao desenvolvimento dos animais, além de economia na mão de obra aplicada nos setores de produção. Nesses sistemas de arraçamento, apesar da pronta disponibilidade de nutrientes, o animal encontra-se propenso a desenvolvimento de quadros de acidose ou timpanismo ruminal, evidenciando a relevância dos aditivos empregados (Van Der Aar et al., 2017).

Aditivos alimentares, como os probióticos, são adicionados às essas dietas, com o intuito de melhorar o desempenho produtivo, especialmente em condições extremas de alimentação, como as dietas sem volumoso. Todavia, o uso de probióticos fúngicos na nutrição de ruminantes é escasso e, por isso, realizar testes *in vitro* com o intuito de elucidar o potencial biotecnológico de fungos encontrados naturalmente no ambiente ruminal poderá permitir a aplicação destes na alimentação de ruminantes na forma probiótica, prébiotica, na suplementação direta de suas enzimas e/ou em outras áreas.

Esse campo de exploração é extremamente amplo, permitindo também verificar os produtos liberados por esses microrganismos para uso na indústria biotecnológica. Portanto, objetivou-se com este trabalho avaliar a atividade enzimática de isolados fúngicos ruminais provenientes de ovinos Santa Inês arraçados com dieta de alto grão e traçar o potencial biotecnológico destes isolados frente a diferentes substratos (amido, celulose, caseína e pectina).

Material e Métodos

O experimento foi conduzido no laboratório de Microbiologia do Instituto Federal Goiano, Ceres. Selecionou-se vinte e sete fungos, em função das características de morfotipologia. Os fungos foram obtidos em projeto paralelo, sendo oriundos do rúmen de ovelhas arraçadas com alto grão, sem volumoso.

Promoção e Realização:



Apoio Institucional:



Organização:



CONSTRUINDO SABERES, FORMANDO PESSOAS E TRANSFORMANDO A PRODUÇÃO ANIMAL

Todos os vinte e sete isolados fúngicos foram avaliados quanto à atividade enzimática em função de três tempos de incubação (24, 42 e 72 horas) a 37°C. Mediu-se o tamanho da colônia (TC) e tamanho do halo enzimático (TE) com o auxílio de um paquímetro. Adotou-se o delineamento inteiramente ao acaso e cada fungo constituiu uma repetição, perfazendo 81 parcelas. O índice de atividade enzimática (IE) foi determinado pela relação TE/TC.

Os fungos foram reativados em meio de cultura padrão (Ágar Sabouraud), posteriormente realizou-se microcultivo dos isolados, e, por conseguinte, a sua identificação até gênero. Observou-se no microscópio óptico a pigmentação, formas dos esporos, hifas e esporângio. Para preparação dos meios, utilizou-se o meio Yeast Nitrogen Base (YBN) acrescido de 1% de substrato (amido, celulose, pectina cítrica ou caseína).

Para verificação de produção de amilases e celulasas, adicionou-se corante Vermelho Congo em meios contendo amido e celulose, após os períodos de incubação, para auxílio na leitura dos halos. Já para produção de proteases e pectinases, adicionou-se o corante Lugol Fraco (1%) uma hora após o tratamento com ácido clorídrico (2%), para pectina e, ácido acético (5%) para caseína.

O software estatístico R (versão i386 3.3.0) foi utilizado para análise dos dados. Após análise exploratória, para verificar a normalidade e homocedasticidade, aplicou-se o teste de Friedman ($\alpha=1\%$) para analisar o efeito dos períodos de incubação (24, 48 e 72 horas), e o teste Kruskal-Wallis ($\alpha=1\%$) para verificar a influência da fonte do substrato (amido, celulose, caseína ou pectina) sobre as variáveis medidas.

Resultados e Discussão

Os isolados avaliados eram pertencentes aos gêneros *Absidia* (3,7%), *Aspergillus* (37,04%), *Aureobasidium* (14,82%), *Rhizomurcor* (18,52%), *Rhizopus* (22,22%) e *Scopulariopsis* (3,7%). Como era esperado, o tamanho médio das

CONSTRUINDO SABERES, FORMANDO PESSOAS E TRANSFORMANDO A PRODUÇÃO ANIMAL

colônias fúngicas e dos halos enzimáticos foram superiores no tempo de 72 horas de incubação ($P < 0,01$) (Tabela 1), uma vez que com o passar do tempo às cepas tendem a crescer e a degradar cada vez mais o substrato ofertado.

Tabela 1. Tamanho médio da colônia (TC) e tamanho médio do halo enzimático (TE) em milímetros e, índice de atividade enzimática (IE) em função do período de incubação e do substrato disponível.

Substrato	Variável	Período de Incubação (horas)								
		24			48			72		
		TC	TE	IE	TC	TE	IE	TC	TE	IE
Amido	TC	7,07 Ac			18,41 Ab			23,33 ABa		
	TE	23,52 Aa			53,85 Ab			77,5 Ac		
	IE	3,81 ABa			3,13 Aa			3,53 Aa		
Celulose	TC	5,67 Abc			16,04 Ab			20,78 Ba		
	TE	24,52 Ac			53,74 Ab			64,93 Aba		
	IE	5,12 Aa			3,75 Ab			3,50 Ab		
Caseína	TC	4,78 Abc			17,04 Ab			26,08 Aa		
	TE	13,37 Bc			27,04 Bb			60,73 Aba		
	IE	3,25 Ba			1,71 Bb			2,42 Ba		
Pectina	TC	4,09 Bc			17,77 Ab			22,00 Aba		
	TE	6,68 Bc			22,73 Bb			37,00 Ba		
	IE	1,67 Ca			1,41 Ba			1,72 Ba		

Letras diferentes minúsculas nas linhas indicam diferença significativa pelo teste não paramétrico de Friedman ($\alpha = 1\%$) e maiúsculas nas colunas pelo teste de Kruskal-Wallis ($\alpha = 1\%$).

Contudo, ao avaliar isoladamente cada período de incubação em função dos substratos, o TC foi inferior às 24 horas somente para as cepas inoculadas em pectina ($P < 0,01$), enquanto que as 48 e 72 horas de incubação não houve diferença significativa para TC entre os diferentes substratos ($P > 0,05$). As 24 e 48 horas, as cepas avaliadas apresentaram maior TE em meio amido e celulose ($P < 0,01$) e às 72 horas em meio amido, celulose e caseína ($P < 0,01$).

CONSTRUINDO SABERES, FORMANDO PESSOAS E TRANSFORMANDO A PRODUÇÃO ANIMAL

Houve maior índice de atividade enzimática (IE), em meio amido e celulose, independente do período de incubação avaliado ($P < 0,01$). Estes índices indicam que todos os isolados avaliados possuem a habilidade de degradar todos os substratos, com diferentes intensidades nos períodos de incubação.

A alta atividade celulolítica de determinadas cepas permitem a aplicabilidade destas associadas a outras cepas com habilidade de degradação de complexo lignolítico, aumentando a eficácia e aproveitamento da biomassa forrageira (rica em lignina) em sistemas extensivos de criação (Dollhofer et al., 2015).

Todavia, os presentes resultados não corroboram com Zhang et al. (2015), que encontraram maior atividade proteolítica (caseína) que amilolítica e celulolítica de microrganismos ruminais de novilhos. As proteases podem ser utilizadas na alimentação de ruminantes com o intuito de aumentar a degradação de proteínas e liberação de aminoácidos (Silva et al., 2017).

A baixa atividade pectinolítica dos isolados estudados não impede a aplicação destes na indústria biotecnológica. Estudos devem ser feitos visando verificar condições ótimas de produção dessa enzima pelos isolados.

Segundo Garg et al. (2016), pectinases podem ser empregados no processamento de frutas, reduzindo a viscosidade e clareando o suco, podendo também ser usados na extração de óleo vegetal, na indústria de bio-branqueamento de polpa kraft, além da reciclagem de papel. Ademais, podem ser adotadas no processamento da ração animal, pois essas enzimas diminuem a viscosidade da alimentação, aumentando a absorção dos nutrientes e reduzindo a quantidade de fezes (Hoondal et al., 2002).

Conclusão

Os fungos facultativos ruminais destacam-se na produção de enzimas que degradam amido e celulose, principais carboidratos de origem vegetal. Todas as cepas fúngicas avaliadas produzem amilase, celulase, pectinase e protease,

Promoção e Realização:



Apoio Institucional:



Organização:



CONSTRUINDO SABERES, FORMANDO PESSOAS E TRANSFORMANDO A PRODUÇÃO ANIMAL

portanto podem ser empregados em diversos campos de indústrias biotecnológicas, em especial àquelas voltadas a nutrição animal.

Agradecimentos

Agradecemos ao IF Goiano pela bolsa PIBIC e aos que colaboraram com a execução da pesquisa.

Referências Bibliográficas

- Dollhofer, V.; Podmirseg, S. M.; Callaghan, T. M.; Griffith, G. W. and Fliegerová, K. 2015. Anaerobic fungi and their potential for biogas production. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* 151:41–61.
- Garg, G.; Singh, A.; Kaur, A.; Singh, R.; Kaur, J. and Mahajan, R. 2016. Microbial pectinases: an ecofriendly tool of nature for industries. *3 Biotech* 6(1):47.
- Hoondal, G. S.; Tewari, R. P.; Tewari, R.; Dahiya, N. and Beg, Q. K. 2002. Microbial alkaline pectinases and their industrial applications: a review. *Applied Microbiology and Biotechnology* 5:409–418.
- Silva, R. R.; Peduzzi, R. and Souto, T. B. 2017. Exploring the bioprospecting and biotechnological potential of white-rot and anaerobic Neocallimastigomycota fungi: peptidases, esterases, and lignocellulolytic enzymes. *Applied Microbiology and Biotechnology* 101:3089-3101.
- Van Der Aar, P.J.; Molist, F. and Van Der Klis, J. D. 2017. The central role of intestinal health on the effect of feed additives on feed intake in swine and poultry. *Animal Feed Science and Technology* 233:64-75.
- Zhang, Y. L.; Liu, Q.; Wang, C.; Pei, C. X.; Li, H. Y.; Wang, Y. X.; Yang, W. Z.; Bai, Y. S.; Shi, Z. G. and Liu, X. N. 2015. Effects of supplementation of Simmental steers with 2-methylbutyrate on rumen microflora, enzyme activities and methane production. *Animal Feed Science and Technology* 199:84-92.