



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE
SANTANA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOTECNOLOGIA**



LUIZ GUSTAVO NEVES BRANDÃO

**FERMENTAÇÃO SEMISSÓLIDA PELOS FUNGOS
Lentinus tigrinus E *Trametes villosa* NO PROCESSAMENTO
DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS PARA
ALIMENTAÇÃO ANIMAL**

Feira de Santana, BA
2022

LUIZ GUSTAVO NEVES BRANDÃO

**FERMENTAÇÃO SEMISSÓLIDA PELOS FUNGOS
Lentinus tigrinus E *Trametes villosa* NO PROCESSAMENTO
DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS PARA
ALIMENTAÇÃO ANIMAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, da Universidade Estadual de Feira de Santana como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Raquel Guimarães Benevides

Feira de Santana, BA
2022

Ficha Catalográfica - Biblioteca Central Julieta Carteadó - UEFS

Brandão, Luiz Gustavo Neves
B818f Fermentação semissólida pelos fungos *Lentinus tigrinus* E *Trametes villosa* no processamento de resíduos agroindustriais para alimentação animal. / Luiz Gustavo Neves Brandão.– 2022.
48 f.: il.

Orientadora: Raquel Guimarães Benevides
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Feira de Santana. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Feira de Santana, 2022.

1.Ruminantes. 2.Basidiomicetos. 3.Forragicultura. 4.Enriquecimento proteico. 5.Lignina I.Benevides, Raquel Guimarães, orient. II.Universidade Estadual de Feira de Santana. III. Título.

CDU: 636.084

Maria de Fátima de Jesus Moreira - Bibliotecária – CRB-5/1120

BANCA EXAMINADORA

Marília Lordêlo Cardoso Silva

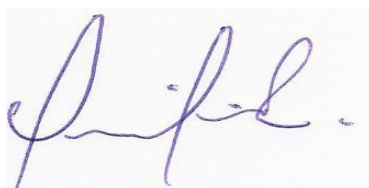
Dr.^a Marília Lordêlo Cardoso Silva
(Universidade Estadual de Feira de Santana)



Dr. Marcelo Franco
(Universidade Estadual de Santa Cruz)



Dr. Rafael da Conceição Simões
(Universidade Federal do Oeste da Bahia)



Dr. Ossival Lolato Ribeiro
(Universidade Federal do Recôncavo da Bahia)



Dr.^a Raquel Guimarães Benevides
(Universidade Estadual de Feira de Santana)

Feira de Santana – BA
2022

Aos meus amados filhos Davi Luiz e Luiz
Gustavo. À minha maravilhosa esposa
Nayana Suzart, dedico

AGRADECIMENTOS

À Universidade do Estado da Bahia - UNEB pela permissão de afastamento para estudo e concessão da bolsa do Programa de Apoio à Capacitação - PAC

À Universidade Estadual de Feira de Santana – UEFS e a todos do PPGBIOTEC pelos ensinamentos e pelas oportunidades.

Aos colegas do LAPEM que me ajudaram, e muito, com novos aprendizados. Sempre pacientes e solícitos me suportaram como puderam.

Aos meus bolsistas de Iniciação Científica Carlos Anuniação e Érica Lima. Vocês foram incríveis!

À minha orientadora Professora Dra. Raquel Guimarães Benevides. A senhora foi brilhante em tudo. Obrigado pela oportunidade, ensinamentos, compreensão e paciência. A Sra. e toda sua família estarão sempre nas minhas orações!

Agradeço a Deus, por me dar forças em todos os momentos, tendo sempre me abençoando com saúde e luz. Muita luz! “Obrigado, Deus! Por tudo que o senhor me deu.”

Aos meus queridos e amados pais, Claudio e Nina, que sempre acreditaram e deram força em todos os momentos da minha vida, colocando sempre na minha educação a honestidade e a família como alicerce para o crescimento. Vocês são a base de tudo.

Ao meu irmão Duda, sua família e seu G11, sempre divertidos e atenciosos. Guardo todos no coração.

Ao meu irmão Kinho, sua família e seu “kantinho”. Sempre bom estar com vocês.

Aos meus “priminhos” mais “resenheiros”!! Estaremos sempre juntos!

Um agradecimento especial ao BregaVet. Meus brutos, guerreiros, amigos e irmãos para sempre! Amo vocês, “rebain”!

À Nayana Suzart, meu grande amor, que me entende, me completa, me apoia e me inspira! Você é um anjo, amor!

Aos meus amados filhinhos, Gustavo e Davi. É tudo por vocês! Sempre por vocês!

Ao meu grande parceiro, fiel escudeiro, auxiliador, amigo e, por vezes, coorientador Matheus Batista. Foi Deus quem te colocou no meu caminho, irmão! Obrigado milhões de vezes!

E aos meus grandes amigos e irmãos de coração: Rousan “Brita”, Léo “Veinho”, Gilvan “Foguinho”, Paulo “Orea”, Thiago “Tchegos”, Denilson “Deni”, Pedro Henrique “PH”, Rodrigo “Gaspar” e Rafael “Rafa”. Vocês são mais importantes do que imaginam. Obrigado pela parceria e paciência de sempre. Amo cada um do jeito que é.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

“Rir muito e com frequência,
ganhar o respeito das pessoas inteligentes
e o afeto das crianças,
merecer a consideração de críticos honestos
e suportar a traição de falsos amigos,
apreciar a beleza,
encontrar o melhor nos outros,
deixar o mundo um pouco melhor
seja por uma saudável criança,
um canteiro de jardim ou uma redimida condição social,
saber que ao menos uma vida respirou mais fácil porque eu vivi.
Isso é ter tido sucesso!!

(Ralph Waldo Emerson)

*Epígrafe também utilizada na dissertação em 2009.

RESUMO

As enzimas ligninolíticas desempenham um papel fundamental na degradação de resíduos lignocelulósicos e muitas dessas enzimas são sintetizadas por fungos. Para obtenção dessas enzimas algumas tecnologias foram desenvolvidas como a fermentação semissólida (FSS). Dois experimentos foram realizados com o objetivo de promover o enriquecimento proteico e/ou a redução de compostos fibrosos de resíduos agroindustriais e viabilizar o uso da inoculação ou do extrato enzimático dos fungos *Lentinus tigrinus* e *Trametes villosa* em resíduos agroindustriais para alimentação animal. No primeiro experimento, realizou-se avaliação qualitativa da produção de enzimas ligninolíticas pelo teste de Remazol Brilliant Blue dye R (RBBR), sendo-a positiva. Para a FSS e obtenção dos extratos enzimáticos foram utilizados biorreatores com bagaço de cana e coproduto do desfibramento do sisal como substrato. Os extratos foram adicionados aos resíduos para posterior análise bromatológica. Os métodos de cultivo utilizados neste experimento foram satisfatórios quanto ao crescimento dos fungos e produção de ligninases no teste em RBBR. Os fungos demonstraram potencial na redução de material lignocelulósico em coprodutos agroindustriais. O segundo experimento consistiu em avaliar os efeitos da FSS com o fungo *Lentinus tigrinus* no enriquecimento proteico e degradação das frações fibrosas de diferentes resíduos agroindustriais para alimentação animal. As fermentações foram realizadas em triplicata num sistema de batelada utilizando-se biorreatores retangulares de plástico e a composição bromatológica realizada no material sem inóculo e após a FSS. Foi observado um enriquecimento proteico nos cinco tipos de resíduos agroindustriais estudados usando 24 h de FSS por *L. tigrinus*. Todos os resíduos avaliados podem ser usados como substrato para o enriquecimento de alimentos para animais tendo em vista seu AP e redução das frações fibrosas. Sugere-se ensaios de digestibilidade *in vitro* de materiais deslignificados com extratos enzimáticos bem como com resíduos enriquecidos após FSS por *L. tigrinus*.

Palavras-chave: Ruminantes. Lignina. Forragicultura. Enriquecimento proteico. Basidiomicetos.

ABSTRACT

Ligninolytic enzymes have an important role in the degradation of lignocellulosic residues and many of these enzymes are synthesized by fungi. Some technologies were developed for enzymes production such as semisolid fermentation. Two experiments were carried with objective promoting protein enrichment and/or the fibrous compounds reduction from agro-industrial residues and enabling the use for inoculation or *Lentinus tigrinus* and *Trametes villosa* enzymatic extract in agro-industrial residues for animal feed. In the first experiment, evaluation production of ligninolytic enzymes was performed by the RBBR test. Primers were designed for the amplification of interest gene and total RNA extraction with subsequent synthesis of cDNA. Bioreactors with sugarcane bagasse and defibration sisal coproduct were used as substrate to obtain enzymatic extracts and semisolid fermentation. The extracts were added in residues for further bromatological analysis. The cultivation methods were satisfactory for fungi growth and ligninases production in the RBBR test. Fungi demonstrated good potential in reducing lignocellulosic material in agro-industrial residues. The second experiment consisted evaluation effects with the fungus *Lentinus tigrinus* on protein enrichment and fiber degradation in different agro industrial residues for animal feed. Fermentations were carried in triplicate a batch system using rectangular plastic bioreactors and the chemical composition was carried in the material without innocuous and after the fermentation. Protein enrichment was observed in the five types of agro-industrial residues studied using fermentation by *L. tigrinus*. All evaluated residues can be used as a substrate for the enrichment of animal feeds in view their protein elevations and fibrous fractions reduction. In vitro digestibility tests of delignified materials with enzymatic extracts are suggested.

Keywords: Ruminant. Protein Enrichment. Lignin. Forage. Basidiomicetos.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL	11
2	REVISÃO DE LITERATURA	12
2.1	REINO FUNGI	12
2.2	FILO BASIDIOMYCOTA E FUNGOS DEGRADADORES	13
2.3	RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS	14
2.4	ENZIMAS LIGNINOLÍTICAS	15
2.5	FERMENTAÇÃO SEMISÓLIDA – FSS	15
2.6	ENRIQUECIMENTO PROTÉICO E BIOREACTORES	16
2.7	OBJETIVO GERAL	17
2.8	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
	CAPÍTULO 1 – USO DO EXTRATO ENZIMÁTICO DOS FUNGOS <i>Lentinus tigrinus</i> e <i>Trametes villosa</i> OBTIDOS POR FERMENTAÇÃO SEMI SÓLIDA NO PROCESSAMENTO DE COPRODUTOS AGROINDUSTRIAIS PARA ALIMENTAÇÃO ANIMAL	18
1.1	INTRODUÇÃO	19
1.2	MATERIAL E MÉTODOS	21
1.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
1.4	CONCLUSÕES	28
	REFERÊNCIAS	29
	CAPÍTULO 2 - ENRIQUECIMENTO PROTEICO DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS POR FERMENTAÇÃO SEMI SÓLIDA A PARTIR DE <i>Lentinus tigrinus</i>	33
2.1	INTRODUÇÃO	34
2.2	MATERIAIS E MÉTODOS	36
2.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
2.4	CONCLUSÕES	42
	REFERÊNCIAS	43
	APÊNDICE	48

1. INTRODUÇÃO GERAL

Resíduos agroindustriais como bagaços, farelos, palhas, cascas e sementes estão entre as maiores fontes de biomassa do mundo, representando uma geração anual média de 40 milhões de toneladas de resíduo lignocelulósico que podem causar consideráveis prejuízos às atividades econômicas do setor agroindustrial e ao meio ambiente (MENEZES; DURRANT, 2008). Estes resíduos estão sendo transformados em compostos químicos e produtos com alto valor agregado como álcool e ácidos orgânicos. A utilização destes resíduos em bioprocessos é uma alternativa racional para produção de substratos e uma ajuda para solucionar o problema da poluição ambiental (PANDEY et al., 2000). Dessa forma, as indústrias produtoras de etanol, por exemplo, têm buscado soluções tecnológicas que fazem uso das enzimas do complexo lignocelulósicos para uma produção mais limpa e barata (VÁSQUEZ *et al.*, 2007). Segundo Mahesh & Mohini, (2013) outras aplicações das enzimas lignocelulolíticas também são viáveis, a exemplo da indústria têxtil, farmacêutica e de rações para animais ruminantes.

A degradação desses compostos lignocelulósicos se dá por um processo multienzimático, composto principalmente por lacases (Lac), manganês peroxidases (MnP) e lignina peroxidases (LiP) segundo diversos autores (LEONOWICZ *et al.*, 1999, SUGIURA *et al.*, 2003). Essas oxidoreduções podem ser produzidas por algumas espécies de fungos Basidiomicetos de degradação branca como o *Lentinus tigrinus*, descrito por Lechner, Papinutti (2006) e Conceição (2010) e o *Trametes villosa* (SILVA, 2014; CARNEIRO *et al.*, 2017) ambos encontrados naturalmente em território baiano.

A preferência pelo uso de enzimas em processos industriais decorre de sua natureza proteica, sua especificidade, o uso em baixas concentrações e sua inocuidade (BON et al., 2008). Quando aplicada na indústria de rações ou alimentação de aves e suínos, as enzimas podem proporcionar melhorias na qualidade e na digestibilidade dos nutrientes, reduzir a viscosidade da digesta e reduzir a excreção de compostos nas fezes (MALEKIAN *et al.*, 2013). Já na nutrição de ruminantes, o papel das enzimas seria potencializar a utilização dos alimentos fibrosos fornecendo energia e aumentando a eficiência do processo de fermentação ruminal (MAHESH & MOHINI, 2013) promovendo melhorias na digestibilidade e aumento de produtividade.

Nesse aspecto, dentre os processos usados para a produção de enzimas, a fermentação semi-sólida (FSS), definida como aquela que envolve o crescimento de um microrganismo sobre um substrato sólido com mínima quantidade de água livre entre as

partículas (BEHERA ; RAY, 2016; PANDEY, 2002), é atrativa devido a muitas vantagens, principalmente, pelo uso de meio a base de resíduos sólidos agrícolas e agroindustriais para o crescimento microbiano (MARQUES *et al.*, 2019). Uma das grandes vantagens desse método segundo Moura, (2011) é que, ao invés de produzir apenas uma enzima, o processo de FSS permite ao fungo produzir um complexo natural de enzimas específico para os substratos encontrados nos diferentes alimentos, aumentando, assim, o espectro de ação do complexo enzimático. Dessa forma, a FSS, além de promover a degradação de compostos lignocelulósicos, visa elevar os teores proteicos dos resíduos mediante o uso de microrganismos com requerimentos nutricionais simples (ABOSIADA *et al.* 2018).

Objetiva-se com este estudo viabilizar o uso da fermentação semi-sólida com os fungos *Lentinus tigrinus* e/ou *Trametes villosa* para enriquecimento proteico de resíduos agroindustriais bem como a obtenção de um extrato enzimático que permita melhoria da qualidade de resíduos agroindustriais para alimentação animal.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 REINO FUNGI

O reino dos fungos é composto por seres eucariontes heterótrofos, que compreende uma enorme taxa de diversidade, com vários tipos de ciclo de vida, ecologia e morfologia que variam de leveduras unicelulares a grandes cogumelos (LIM *et al.*, 2020). Os fungos são um grupo de organismos pouco estudado e biotecnologicamente valiosos. Devido à imensa variedade de habitats que os fungos habitam, e a consequente necessidade de competir contra uma ampla variedade de outros fungos, bactérias e animais, os fungos desenvolveram numerosos mecanismos de sobrevivência (HYDE *et al.*, 2019).

Desde tempos antigos os fungos eram usados como fermentadores e alimentos, porém, com as novas pesquisas no campo da micologia, esses organismos podem ser potencialmente utilizados na biotecnologia, na área de medicamentos, na produção industrial de diversos produtos e na agricultura (HYDE *et al.*, 2019; LIM *et al.*, 2020). A busca pela biodiversidade de fungos e a construção de uma coleção viva desses organismos têm um potencial econômico incrível na sua utilização (HYDE *et al.*, 2019).

Na natureza, os fungos são decompositores de material orgânico sendo de grande importância no ciclo do carbono global e na reciclagem de nutrientes (GADD, 2017). Sem as atividades dos fungos sapróbios, o crescimento de plantas em muitos habitats logo

cessaria, pois os resíduos não decompostos se amontoariam e o solo se tornaria improdutivo (KENDRICK, 2001).

A classificação do reino fungi tem sido atualizada continuamente, com a inclusão frequente de dados de sequências de DNA em estudos recentes; além disso, o recolhimento de táxons históricos e neo ou epitíficos usando material e culturas frescas também é uma prática cada vez mais comum entre os micologistas, embora ainda não seja facilmente realizada em alguns grupos (WIJAYAWARDENE *et al.*, 2020). Tedersoo *et al.* (2018), baseando nas estimativas de filogenias e tempo de divergência, organizou o reino em 18 filós: *Aphelidiomycota*, *Ascomycota*, *Basidiobolomycota*, *Basidiomycota*, *Blastocladiomycota*, *Calcarisporiellomycota*, *Caulochytriomycota*, *Chytridiomycota*, *Entomophthoromycota*, *Glomeromycota*, *Kickxellomycota*, *Monoblepharomycota*, *Mortierellomycota*, *Mucoromycota*, *Neocallimastigomycota*, *Olpidiomycota*, *Rozellomycota* and *Zoopagomycota*, fornecendo, dessa forma, uma classificação mais natural e com melhor precisão taxonômica e filogenética em análises ecológicas evolutivas e de biodiversidade.

2.2 FILO BASIDIOMYCOTA E FUNGOS DEGRADADORES

O filo dos basidiomicetos é o segundo maior filo em número de espécies descritas (atrás apenas dos ascomicetos) e são fungos que incluem os cogumelos, orelhas de pau, puffballs, mas também alguns microfungos, como ferrugens, fitopatológicos e leveduras (WIJAYAWARDENE *et al.*, 2020). Tradicionalmente, Basidiomicetos são tipicamente caracterizados pela presença de basídios e basidiósporos (ZHAO *et al.*, 2017).

O filo é tipicamente caracterizado pela presença de basídios que são células terminais inchadas de hifas contendo esporos sexuais; além disso, muitas espécies da classe Agaricomycetes, produzem corpos de frutificação conspicuos e provavelmente foram usados como alimento nos primórdios da civilização (SADARGO *et al.*, 2019).

Dependendo do tipo de componentes que são degradados pelos fungos, esses podem ser classificados como: Fungos de degradação macia, fungos de degradação marrom e fungos de degradação branca.

O termo "degradação macia" é usado para designar qualquer penetração e crescimento característicos de hifas dentro das paredes celulares da madeira, causando o amolecimento da superfície (evidenciado ou não) e é causada por vários microfungos (membros dos Ascomicetes) ou por alguns fungos imperfeitos. Essa degradação parece ocorrer em toda a madeira velha que foi exposta a condições de umidade (LEVY, 1966).

Os fungos da degradação marrom metabolizam ativamente a fração de carboidratos, bem como uma porção menor de lignina, deixando a lignina quimicamente modificado. Com isso, a madeira perde resistência nos estágios iniciais de degradação devido à despolimerização da fração celulósica, exibindo, dessa forma uma aparência cúbica, quebradiça e marrom com pouca resistência residual (GOODELL, 2003).

Os fungos da degradação branca são principalmente basidiomicetos e algumas espécies relevantes incluem *Pleurotus ostreatus*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes versicolor*, *Ganoderma lucidum* e *Irpex lacteus*. Eles exibem capacidade de decomposição e são os únicos responsáveis pela degradação da lignina e dos polissacarídeos na biomassa vegetal (MIR-TUTUSAUS *et al.*, 2018). Os fungos de podridão branca quebram a lignina para liberar mais facilmente carboidratos metabolizados de hemicelulose e celulose. Para isso, eles contam com uma combinação de enzimas extracelulares, ácidos orgânicos, mediadores e enzimas acessórias e uma característica ousada deste maquinário enzimático é a sua não especificidade, devido à sua ação via geração de radicais. (MIR-TUTUSAUS *et al.*, 2018).

2.3 RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS

As indústrias alimentícias, agroindustriais e florestais geram grandes volumes de resíduos, que são compostos principalmente por carboidratos complexos e proteínas brutas que podem ser úteis como nutrientes para o crescimento microbiano e produção de enzimas ou outros metabólitos; porém, o descarte desses resíduos sem o tratamento adequado leva à poluição ambiental e efeitos negativos à saúde (LEITE *et al.*, 2020; ROSA *et al.*, 2019). Várias estratégias de reaproveitamento desses resíduos e obtenção de produtos de valor agregado são estudadas para minimizar a pressão sobre os recursos naturais, além disso, sua reutilização correta, ajuda a mitigar os efeitos negativos e prejudiciais e produzir compostos de valor agregado, contribuindo para a implantação da economia e sua valorização em escala industrial (LEITE *et al.*, 2020).

O resíduo de cana de açúcar é bastante usado e pesquisado em biotecnologia, uma vez que a cana-de-açúcar é uma das principais culturas do mundo, cultivada em mais de 100 países, mas Brasil e Índia juntos geram pouco mais da metade de toda a cana produzida mundialmente (sendo um dos principais materiais ligninocelulósicos nas regiões tropicais), portanto, seu resíduo tornou-se uma importante matéria-prima de alto valor econômico (CARPIO *et al.*, 2017; PENG *et al.*, 2009).

2.4 ENZIMAS LIGNINOLÍTICAS

As enzimas ligninolíticas desempenham um papel fundamental na degradação e desintoxicação de resíduos lignocelulósicos no meio ambiente e muitas dessas proteínas, como a lacase, manganês peroxidase e lignina peroxidase, sintetizados por fungos, foram aplicadas recentemente na produção de biocombustíveis de segunda geração (KUMAR; CHANDRA, 2020) dentre outras aplicações como na indústria têxtil, farmacêutica e de rações para animais ruminantes (MAHESH & MOHINI, 2013).

A manganês peroxidase (MnP, EC 1.11.1.13) é a peroxidase modificadora de lignina mais comum produzida por quase todos os basidiomicetos que colonizam a madeira, causando podridão-branca e vários fungos que colonizam o solo e podem decompor o lixo. Múltiplas formas desta proteína heme glicosilada com pesos moleculares normalmente de 40 a 50 kDa são secretadas por fungos em seu ambiente. Lá, o MnP oxida preferencialmente íons manganês (Mn^{2+}), sempre presentes na madeira e no solo, em Mn^{3+} altamente reativo, que é estabilizado por quelantes fúngicos como o ácido oxálico. O Mn^{3+} quelatado, por sua vez, atua como mediador redox difusível de baixo peso molecular que ataca as estruturas da lignina fenólica, resultando na formação de radicais livres que tendem a se desintegrar espontaneamente. MnP é capaz de oxidar e despolimerizar ligninas naturais e sintéticas, bem como lignoceluloses inteiras (palha moída ou madeira, polpa) em sistemas livres de células (*in vitro*) (HOFRICHTER, 2002).

2.5 FERMENTAÇÃO SEMISÓLIDA (FSS)

Para a Bioquímica, a fermentação é definida como uma conversão anaeróbia de compostos orgânicos complexos em moléculas mais simples, porém para a microbiologia industrial, a fermentação é definida como qualquer processo onde ocorre formação de biomassa microbiana. Existem dois tipos básicos de processos fermentativos: submerso, caracterizado pela presença de água livre no meio de cultivo e fermentação em estado sólido, também conhecido como fermentação semissólida (FSS), realizado na ausência ou quase ausência de água livre (POLIDORO, 2009).

Foi através da FSS que nas décadas de 50 e 60 algumas pesquisas envolvendo a transformação de esteroides e, nas décadas de 60 e 70, a produção de micotoxinas, fizeram com que esse tipo de fermentação passasse a ter lugar de destaque em diversas pesquisas. Outro processo que passou a ser bastante difundido foi o enriquecimento proteico de produtos agroindustriais para alimentação de animais ruminantes, utilizando esse tipo de fermentação

(SINGHANIA et al., 2009). A partir de então, FSS vem sendo amplamente utilizada para o desenvolvimento de processos que utilizam células vegetais, animais ou microrganismos para recuperação de áreas poluídas; decomposição de compostos e retirada de substâncias potencialmente tóxicas de resíduos (SINGHANIA et al., 2009). Dentre os produtos agroindustriais que podem ser utilizados como substrato para enriquecimento nutricional ou obtenção de bioprodutos com alto valor agregado podemos citar gramíneas, bagaços, farelos, serragem, polpa e casca de frutas (CASCIATORI et al., 2014).

A FSS é o processo onde o microrganismo se desenvolve em um ambiente com pouca ou sem água disponível. Este processo se revela como uma ótima alternativa para a produção de enzimas principalmente por causa do baixo custo de produção (BEHERA E RAY, 2016) e a possibilidade do uso de resíduos que são fontes de carbono e nutrientes necessários para o crescimento dos microrganismos (MARQUES *et al*, 2019). A FSS apresenta uma série de vantagens em comparação com a clássica fermentação submersa; entre elas está a redução do volume de meio por massa de substrato e redução dos riscos de contaminação (ALVES et al, 2001).

Com a possibilidade de síntese destas enzimas através da FSS, os estudos a descreve como ótima alternativa para ser utilizada na melhoria da qualidade e digestibilidade dos alimentos para animais ruminantes uma vez que elas agem, segundo Mahesh; Mohini, (2013), reduzindo os efeitos antinutricionais e potencializando a utilização do conteúdo fibroso com conseqüente melhoria da eficiência na fermentação ruminal. A proposta então é utilizar destes processos biotecnológicos para obtenção de coprodutos agroindustriais com maiores teores proteicos que visem incrementar a pecuária no semiárido e a produção de alimentos como leite e carne e seus derivados.

2.6 ENRIQUECIMENTO PROTEICO E BIORREATORES

Uma alimentação pobre em proteínas e energia pode acarretar problemas nutricionais em seres vivos. As proteínas podem ser encontradas sob três formas em alimentos: como proteína verdadeira, nitrogênio não proteico ou nitrogênio indisponível. A proteína verdadeira compõe de 60 a 80% do nitrogênio total das plantas (OLIVEIRA et al., 2011).

Em forrageiras, o principal fator a ser considerado é a quantidade de proteína bruta (PB), que compreende tanto a proteína verdadeira quanto o nitrogênio não proteico, sendo que a quantidade de proteína verdadeira depende de uma série de fatores, incluindo a maturidade da planta, podendo representar até cerca de 70% da PB em forragens verdes. Existe, ainda, uma pequena proporção de nitrogênio não proteico insolúvel, associado à

lignina da parede celular dos vegetais, que representam cerca de 5 a 10% nas plantas forrageiras (DIAS, 1997). Geralmente esses vegetais possuem baixo teor de PB, ocorrendo uma diminuição desse teor em épocas secas, por isso há necessidade de enriquecê-las.

Diversos microrganismos podem ser cultivados em biorreatores como fonte de proteína para consumo humano e animal (VENDRUSCOLO, 2005). Oliveira (2007) cita algumas características que fazem com que seja bastante vantajoso o uso desses microrganismos para produzir proteína: eles se multiplicam rapidamente, em substratos que podem ser obtidos a um baixo custo; são capazes de utilizar os nutrientes em sua forma mais simples; os fatores ambientais e climáticos não interferem grandemente em sua produção.

Biorreator, reator bioquímico ou reator biológico é o reator no qual ocorrem fermentações, catalisadas por células vivas, microrganismos ou enzimas produzidas a partir de células vivas, transformando substratos em produtos de maior valor agregado. Os dois principais parâmetros que variam em FSS são a agitação e a aeração, e baseando-se nisso, Mitchell et al. (2006) apud Polidoro (2009), separam os biorreatores em quatro grupos: biorreatores com aeração superficial e sem agitação (bandejas, sacos plásticos hermeticamente fecháveis, estufas de bancada e câmaras climatizadas); biorreatores com aeração forçada e sem agitação (leitos empacotados); biorreatores com aeração superficial e com agitação: (tambores, que podem ser rotativos ou agitados) e biorreatores com aeração forçada e com agitação: (biorreatores de coluna são os mais utilizados).

2.7 OBEJTIVO GERAL

Viabilizar o uso da fermentação semisólida com os fungos *Lentinus tigrinus* e/ou *Trametes villosa* para enriquecimento proteico e degradação das frações fibrosas de resíduos agroindustriais bem como a obtenção de extrato enzimático destes fungos que permita a melhoria da qualidade de resíduos para alimentação animal.

2.8 OBEJTIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o uso dos extratos de *L. tigrinus* e *T. villosa* produzidos através de FSS no processamento do coproduto do desfibramento do sisal e bagaço de cana.
- Avaliar os efeitos da FSS com *L. tigrinus* no aumento proteico e degradação das frações fibrosas de diferentes resíduos agroindustriais para alimentação animal.
- Identificar resíduos agroindustriais que obtenham enriquecimento proteico a partir de bioprocessos com os fungos *Lentinus tigrinus* e *Trametes villosa*.

USO DO EXTRATO ENZIMÁTICO DOS FUNGOS *Lentinus tigrinus* e *Trametes villosa* OBTIDOS POR FERMENTAÇÃO SEMI SÓLIDA NO PROCESSAMENTO DE COPRODUTOS AGROINDUSTRIAIS PARA ALIMENTAÇÃO ANIMAL

RESUMO

A produção de enzimas ligninolíticas de diferentes fungos Basidiomicetos em diversos substratos demonstram o potencial biotecnológico destes microrganismos sobre coprodutos agroindustriais. O objetivo desse estudo foi avaliar o uso dos extratos enzimáticos de *Lentinus tigrinus* e *Trametes villosa* produzidos através de fermentação semisólida (FSS) no processamento do coproduto do desfibramento do sisal (CDS) e bagaço de cana (BC). As cepas foram avaliadas em teste RBBR para confirmação da produção das enzimas e posteriormente repicadas por 7 dias até crescimento visível do micélio. Para a FSS foram utilizados 48 erlenmeyers distribuídos em diferentes tratamentos. O extrato enzimático foi obtido a partir desta FSS, e adicionados aos frascos contendo BC e CDS para posterior análise Bromatológica. Os métodos de cultivo utilizados foram satisfatórios quanto ao crescimento dos fungos e produção de ligninases no teste em RBBR. Os fungos demonstraram bom potencial na redução de material lignocelulósico em coprodutos agroindustriais. O comportamento de síntese enzimática dos fungos apresentou-se de forma diferente, demonstrando ser nos dias iniciais para o *L. tigrinus* e aos 14 dias para o *T. villosa*.

Palavras-chave: Basidiomicetos. Ruminantes. Lignina. Forragicultura. Celulose.

ABSTRACT

Ligninolytic enzymes from different Basidiomycete fungi on different substrates demonstrate microorganisms biotechnological potential on agro-industrial byproducts. The aim of this study was to evaluate the use of enzymatic extracts of *Lentinus tigrinus* and *Trametes villosa* produced by semi-solid fermentation (SSF) for processing sisal coproduct and sugarcane bagasse. The strains were evaluated for RBBR test to confirm enzymes production and subsequently subcultured for 7 days until visible growth of the mycelium. For the SSF, 48 Erlenmeyers distributed in different treatments were used. The enzymatic extract was obtained and added in BC and CDS for further Bromatological analysis. The cultivation methods used were satisfactory in terms growth fungal and ligninase production from RBBR test. The fungi showed good potential in agro-industrial by-products lignocellulosic reduction. The enzyme synthesis behavior of the fungi was different, demonstrating to be in the initial days for *L. tigrinus* and at 14 days for *T. villosa*.

Keywords: Basidiomicetos. Ruminant. Lignin. Forage. Cellulose.

INTRODUÇÃO

O agronegócio tem sido reconhecido como um vetor crucial do crescimento econômico brasileiro e em 2019, a soma de produtos e serviços gerados no agronegócio chegou a R\$ 1,55 trilhão ou 21,4% do PIB nacional (BRASIL, 2020). Paralelamente a esta elevada produção de alimentos, tem-se a geração de resíduos e/ou coprodutos agroindustriais. Por definição, resíduo é qualquer substância que resta após uma operação ou manipulação industrial, podendo ser posteriormente reaproveitada (FERREIRA, 2010). Já os coprodutos possuem uma finalidade, principalmente na alimentação animal, e elevam o status dos resíduos tratados, dando-lhes maior valorização (OLIVEIRA et al., 2013). Dessa forma, materiais oriundos da agroindústria quando tratados como resíduos, podem representar perda de biomassa e de nutrientes, além de aumentar o potencial poluidor ambiental (ROSA et al., 2011).

Diversos autores (SANTOS et al., 2013; MANERA et al., 2014; SANTOS; SILVA, 2017) descrevem que a utilização de coprodutos agroindustriais possui grande potencial para alimentação animal, sendo possível incorporá-los na dieta de ruminantes. No entanto, é importante que estes coprodutos não apresentem toxicidade, compostos nocivos e possuam bom valor nutricional.

Nacionalmente, a cultura do sisal (*Agave sisalana*) na Bahia é referência (SANTOS; SILVA, 2017). Neste território, a cadeia produtiva do sisal confere grande importância social e econômica seja na produção de fibra ou dos seus coprodutos para alimentação de ruminantes (ANDRADE et al., 2009). Contudo, os estudos avaliando os coprodutos do desfibramento do sisal para alimentação animal confirmam sua elevada porção fibrosa (lignocelulósica) e consequente baixa digestibilidade e aproveitamento dos seus nutrientes (BRANDÃO et al, 2011; SANTOS, 2013; SILVA ;BELTRÃO, 1999).

Com semelhante porção fibrosa na sua composição, o bagaço da cana de açúcar (*Saccharum sp*) também se destaca como um coproduto de elevada importância econômica. A cana-de-açúcar é a segunda maior cultura de bioenergia do mundo e responde por 80% da produção mundial de açúcar (YANG, 2021). A produção de bagaço de cana é de aproximadamente 2,5 mil toneladas por dia no Brasil (CONAB, 2018) e representa uma elevada disponibilidade de biomassa celulósica de baixo custo (BASSO et al., 2010).

A celulose é o principal constituinte da parede celular da planta possuindo suas unidades de glicose unidas por meio de ligação β -1,4-glicosídica. Para quebrar esta

ligação e liberar as moléculas de glicose, é necessária a ação de um grupo de enzimas (GHAZANFAR et al., 2019 ; NAZIR et al., 2019) que são sintetizadas por microrganismos durante seu desenvolvimento. Assim, destacam-se os fungos Basidiomicetos de decomposição branca, principalmente o *Trametes villosa* e o *Lentinus Tigrinus* por serem capazes de sintetizar as enzimas Manganês Peroxidase, Lignina Peroxidase e lacase que são responsáveis pela degradação da lignina (SILVA, 2014; CARNEIRO et al, 2017) e consequente liberação da celulose para degradação pelas celulases, também produzidas por estes microrganismos (CONIGLIO et al., 2019).

A fermentação semi-sólida (FSS) por fungos Basidiomicetos se revela como uma ótima alternativa para a produção de enzimas ligninolíticas principalmente pelo baixo custo de produção. Além disso, o processo apresenta vantagens em comparação à fermentação líquida, como a redução do volume de meio por massa de substrato e menores riscos de contaminação por bactérias devido ao baixo teor de água livre (ALVES et al., 2001). Ressalte-se que a diferentes espécies de fungos geralmente necessitam de umidade baixa, entre 40 e 60%, para realizar a FSS. Segundo Basso et al. (2010) a seleção do substrato é importante pois depende de fatores relacionados principalmente ao custo e à disponibilidade. Neste sentido, vários autores estudaram a produção de lignases de diferentes fungos Basidiomicetos em diversos substratos como palha de arroz (KANG et al., 2004), bagaço de cana de açúcar, casca de coco, fibra de sisal (SILVA et al., 2014), farelo de trigo (CAMASSOLA ; DILLON, 2007), sementes de algodão ceda (ZAHRA et al., 2020), jaca (MARQUES et al., 2019) e demonstraram o potencial biotecnológico destes microrganismos sobre coprodutos agroindustriais.

Segundo Oliveira et al. (2013), o emprego de coprodutos na alimentação animal, especialmente na nutrição de ruminantes, apresenta diversas vantagens com relação aos ingredientes tradicionais e dentre elas podemos citar o menor custo dos coprodutos, o potencial de utilização durante os períodos de estiagem e escassez de pasto bem como a minimização de impactos ambientais com a deposição indevida de resíduos. Dessa forma, os dados de utilização dos extratos enzimáticos em coprodutos *in natura* para alimentação animal merecem ser estudados.

O objetivo desse estudo foi avaliar o uso dos extratos enzimáticos de *Lentinus tigrinus* e *Trametes villosa* produzidos através de fermentação semisólida (FSS) no processamento do coproduto do desfibramento do sisal (CDS) e bagaço de cana (BC).

MATERIAL E MÉTODOS

Os fungos *Lentinus tigrinus* CCMB553 e *Trametes villosa* CCMB561 utilizados pertencem à coleção de culturas do Laboratório de Pesquisa em Microbiologia da Universidade Estadual de Feira de Santana. As cepas foram repicadas em ágar contendo 8g de ágar I (HiMedia); 8 g de bagaço de cana obtido após extração do caldo em lanchonete da região; 2 g de sulfato de amônio e 400 ml de água destilada, e posteriormente incubadas a 27° (\pm 2°C) por 7 dias até crescimento visível do micélio para proceder com a fermentação semisólida (FSS) nos substratos do CDS e BC.

Para a avaliação qualitativa da produção de enzimas ligninolíticas, foi feito um teste de RBBR (Remazol Brilliant Blue dye R). Para isso, foi colocado um *plug* de cada fungo reativado em uma placa de Petri contendo 10g de ágar, juntamente com 2,5g de extrato de malte, 8 g de bagaço de cana e 1g de corante RBBR, misturado em 500 mL de água destilada. O meio solidificado com o fungo foi submetido a uma temperatura de 27°C.

Para a FSS foram utilizados 48 erlenmeyers (250 ml) como biorreatores (24 para cada substrato) distribuídos em diferentes tratamentos, em triplicata, conforme tabela 1.

Tabela 1. Tratamentos utilizados em triplicata para obtenção dos extratos enzimáticos dos fungos *L. tigrinus* e *T. villosa* através de Fermentação Semi Sólida (FSS)

TRATAMENTO	FUNGO	COMPOSIÇÃO (em 400 ml)	TEMPO DE FERMENTAÇÃO
Bagaço de cana (BC)	<i>L. tigrinus</i>	20 g de BC; NH ₄ SO ₄ e MgSO ₄ 0,01% (p/v) e água	1, 7, 10 e 14 dias
	<i>T. villosa</i>	20 g de BC; NH ₄ SO ₄ e MgSO ₄ 0,01% (p/v) e água	1, 7, 10 e 14 dias
Coproduto do desfibramento do sisal (CDS)	<i>L. tigrinus</i>	20 g de CDS; NH ₄ SO ₄ e MgSO ₄ 0,01% (p/v) e água	1, 7, 10 e 14 dias
	<i>T. villosa</i>	20 g de CDS; NH ₄ SO ₄ e MgSO ₄ 0,01% (p/v) e água	1, 7, 10 e 14 dias

Os 48 biorreatores contendo os substratos previamente triturados e enriquecidos com solução de NH₄SO₄ 1% (p/v) e MgSO₄·7H₂O 0,01% (p/v) e água estéril (50% de umidade) foram esterilizados em autoclave vertical a 121°C por 15 minutos. Para o resfriamento, o material foi disposto em cabine de segurança biológica sob a incidência de luz ultravioleta (Fluxo laminar vertical-Filterflux). Procedeu-se com a inoculação de

cinco discos do micélio (5 mm de diâmetro) para cada biorreator os quais permaneceram com 80% de umidade, após correção, em pH 9,4 (sob adição de tampão) e incubado a 20°C segundo recomendações de SILVA et al. (2014) para uma maior produção enzimática. Os extratos enzimáticos de cada tratamento foram colhidos nos tempos de 1, 7, 10 e 14 dias sendo T1, T2, T3 e T4, respectivamente.

O extrato enzimático foi obtido por maceração dos micélios ao final do respectivo tempo em água destilada fria estéril, seguido por filtração a vácuo em um Funil de Buchner e centrifugação a $3.000 \times g$. O sobrenadante, extrato enzimático, foi preservado em banho de gelo para posterior avaliação da atividade lignocelulolítica através da composição bromatológica dos coprodutos, realizada antes e após o tratamento com os extratos.

Para avaliação da atividade lignocelulolítica os extratos enzimáticos foram adicionados aos frascos contendo 2 g dos resíduos de BC e CDS, e homogeneizados a 150 rpm e 39°C por oito horas para posterior análise Bromatológica. Os coprodutos tratados bem como *in natura* (sem uso do extrato) foram analisados quanto aos teores de Fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente ácido (FDA), celulose (CEL) e lignina (LIG) segundo Silva & Queiroz (2002) bem como Hemicelulose (HEM) que foi obtida por diferença (FDN – FDA).

Os dois coprodutos foram avaliados separadamente quanto à cepa de fungo e tempo de fermentação utilizando-se um delineamento experimental inteiramente casualizado em esquema fatorial $2 \times 4 \times 3$, com dois fungos, quatro tempos de fermentação e três repetições para cada substrato. As médias foram comparadas pelo teste Tukey 5% utilizando-se o software Statistica (6.0).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise dos fungos em meio Remazol Brilliant Blue R (RBBR) apresentou-se positiva para ambos os fungos em estudo com a descoloração esperada como mostra a figura 1.

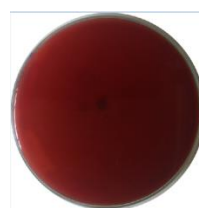




FIGURA 1: Descoloração do meio Remazol Brilliant Blue R (RBBR) sob ação dos fungos *Trametes villosa* (acima) e *Lentinus tigrinus*.

A capacidade de descoloração do corante RBBR por fungos ocorre devido a produção das enzimas lignolíticas, como a lacase e as peroxidases (CONCEIÇÃO, 2010). O método de cultivo em RBBR se mostra como uma alternativa simples e rápida para a identificação de fungos com atividade ligninolítica de corantes poliméricos, semelhantes ao polímero da lignina. Estes corantes são usados como substrato para o sistema degradador da lignina e também podem determinar o começo do metabolismo secundário nos fungos ligninolíticos (PASTI ;CROWFORD, 1991).

Teixeira et al. (2016) analisando a produção de enzimas ligninolíticas por fungos em resíduos agroindustriais verificaram que fungos do gênero *Lentinus* foram capazes de descolorir o meio RBBR. Já Costa (2011) verificaram degradação total do meio RBBR pelo fungo *T. villosa* confirmando o potencial ligninolítico deste fungo também já descritos por Yamanaka et al. (2010) e Oliveira et al. (2010). Os dados obtidos no presente trabalho corroboram os já relatados por diversos autores (ZHOU et al., 2013; VARELA et al., 2000; CONCEIÇÃO, 2010) o que confirma a produção e ação das enzimas ligninolíticas dos espécimes de fungos analisados.

Segundo Karp et al. (2013) o bagaço de cana de açúcar (BC) apresenta em torno de 32-44% de celulose (CEL), 27-32% de hemicelulose (HEM) e 19-24% de lignina (LIG). Missio (2016) compilando vários dados deste coproduto confirma esta variação. Já Brandão et al. (2013) e Santos et al. (2013) avaliando o coproduto do desfibramento do sisal (CDS) relataram teores médios de 35% de FDN, 26% de FDA, 9% de HEM e 11% de LIG. Assim, os dados das frações fibrosas encontrados para o BC e CDS *in natura* no presente trabalho corrobora a literatura (tabela 3).

Na tabela 3 observa-se que houve diferença significativa ($p < 0,05$) para os valores de FDN dos tratamentos com relação aos coprodutos *in natura*. Isso demonstra que o uso do extrato enzimático permitiu a degradação de componentes da parede celular posto que, segundo Silva, Neumann (2012), a FDN é constituída basicamente por celulose, porção de nitrogênio ligado à fibra, hemicelulose e lignina.

Os menores teores de FDN, em ambos os coprodutos, foram encontrados para os tempos T1 e T4 para *L. tigrinus* e *T. villosa*, respectivamente. A maior degradação da fibra no BC observada com extrato de *T. villosa* com 14 dias de fermentação corrobora com o encontrado por Silva (2014) que avaliando a ação da Manganês Peroxidase (MnP) deste fungo sobre resíduos agroindustriais observou ótimas condições enzimáticas aos 15 dias de fermentação com temperatura de 20° C e pH 9,38, condições estabelecidas no presente estudo para os coprodutos avaliados.

Redução nos teores de fibra foram relatados por Kundu et al. (2005) que descrevem que fungos da podridão parda e doce também são capazes de reduzir a FDN, todavia utilizam mais a celulose e hemicelulose para seu crescimento, deixando para trás compostos de baixa digestibilidade como a lignina. Jung et al. (1992) também notaram comportamentos semelhantes avaliando cinco basidiomicetos de decomposição branca cultivados em palha de aveia e caules de alfafa e observaram que os polissacarídeos da parede celular foram removidos de ambos substratos. Ramirez-Bribiesca et al. (2010) relataram que o tratamento com *Pleurotus ostreatus* por 15 dias na palha de milho reduziram a FDN em 14,5%.

No presente estudo os valores de FDN do CDS foram significativamente reduzidos ($P < 0,05$) com o extrato de *T. villosa* aos 14 dias e *L. tigrinus* no 1° dia sugerindo comportamentos diferentes entre os processos fermentativos. Observou-se que os resultados do extrato de *L. tigrinus* aos 14 dias (T4) não foram satisfatórios. Silva, (2014) cita que é consenso entre os pesquisadores que o tipo e composição do substrato, bem como as condições estabelecidas, interferem no crescimento do fungo e atividade lignolítica. No entanto, os baixos valores de FDN com *L. tigrinus* no T1, 57,5% e 26,0% no BC e CDS, respectivamente, sugerem ser comportamento do próprio fungo uma maior produção enzimática nos primeiros dias demandando mais pesquisas neste sentido.

A viabilização de coprodutos fibrosos na alimentação animal prevê o aumento na digestibilidade da FDN e, conseqüentemente, maior disponibilidade dos nutrientes da planta (KOTSAMPASI et al., 2017). Entretanto a degradação da fibra potencialmente digestível pode estar relacionada em parte com a redução na quantidade de lignina. Dessa forma, incrustações da lignina aos carboidratos da parede devem ser consideradas (GRABBER, 2005) e a redução nos valores de FDN não pode ser observada isoladamente tendo em vista as diferentes taxas de degradabilidade dos seus constituintes no rúmen (SILVA et al., 2013). Dessa forma, torna-se relevante a análise das atividades

enzimáticas dos extratos bem como mensurações das frações da fibra (celulose, hemicelulose e lignina) nos coprodutos.

Tabela 3. Valores de fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente ácido (FDA), celulose (CEL), hemicelulose (HEM) e lignina (LIG) em %MS do bagaço de cana (BC) e coproduto do desfibramento do sisal (CDS) *in natura* e após utilização do extrato enzimático de *L. tigrinus* e *T. villosa* obtidos por FSS nos tempos de 1, 7, 10 e 14 dias

		<i>L. tigrinus</i>				<i>T. villosa</i>				CV%
		T1	T2	T3	T4	T1	T2	T3	T4	
	BC <i>in natura</i>	1	7	10	14	1	7	10	14	
FDN	68,8a	57,5c	61,8b	61,6b	65,0ab	60,8b	61,3b	61,3b	58,5c	3,6
FDA	54,7a	45,2d	49,9b	49,2b	52,6ab	48,4c	49,1b	49,7b	43,7d	3,8
LIG	21,4a	16,2b	17,2b	17,7b	19,2a	16,5b	16,9b	17,1b	15,2c	7,5
HEM	14,2a	12,3a	11,9a	12,3a	12,3a	12,4a	12,2a	11,6a	14,8a	10,2
	CDS <i>in natura</i>	1	7	10	14	1	7	10	14	
FDN	32,1a	26,0b	27,9ab	28,1ab	27,8ab	28,2ab	27,9ab	28,0ab	25,2b	5,9
FDA	23,3a	18,3b	20,3ab	20,5ab	20,5ab	20,6ab	20,8ab	20,2ab	17,9b	7,2
LIG	9,6a	6,2b	8,2ab	8,2ab	8,5ab	8,5ab	8,5ab	8,1ab	6,1b	13,9
HEM	8,8a	7,6a	7,1a	7,7a	7,2a	7,7a	7,4a	7,7a	7,4a	12,8

Médias seguidas de letras diferentes na mesma linha diferem entre si ($P < 0,05$) pelo teste Tukey

Comportamento semelhante à FDN foi observado nos teores de FDA ($P < 0,05$). O primeiro e último dia de fermentação para o *L. tigrinus* e *T. villosa*, respectivamente, demonstraram ser mais interessantes no que se refere à síntese de enzimas ligninolíticas e, conseqüentemente, redução na FDA. Ressalte-se que, segundo Silva e Neumann (2012), a FDA contém basicamente as porções de celulose e lignina da célula vegetal, ou seja, a degradação da hemicelulose é a responsável pela diferença entre FDN e FDA. Nota-se então que a degradação da HEM ocorreu de forma semelhante nos dois coprodutos, não diferindo significativamente ($P > 0,05$) do material *in natura*.

Em extensa revisão sobre fungos lignocelulolíticos, Andlar et al. (2018), relata que a hidrólise da hemicelulose exige ação cooperativa de vários tipos de enzimas trabalhando em diferentes níveis da matriz hemicelulítica e justifica ainda que esta atividade sinérgica é necessária, não apenas por causa da complexidade da hemicelulose, mas também por causa de sua conexão com os outros componentes da parede celular vegetal. Aliado a isso, Jaramillo et al. (2015) relata que a combinação de hemicelulose e

lignina forma uma barreira protetora ao redor da celulose, que deve ser modificada (ou removida) antes da hidrólise da celulose. No entanto, a remoção de lignina é um desafio fundamental para aumentar acesso de enzimas à hemicelulose e celulose. Essas observações explicam a manutenção ($P>0,05$) dos níveis de HEM após o uso do extrato enzimático no CDS e BC.

Considerando o uso dos coprodutos na alimentação animal, como a lignina é um composto que tem a função de proteger a estrutura vegetal contra ataques químicos e biológicos (Gonzalo et al., 2016) e a celulose está mais susceptível a incrustações, fica, então, a hemicelulose como polímero mais disponível para degradação das bactérias ruminais. A disposição cruzada das ligações dos polímeros que formam a hemicelulose dá menor resistência à degradação desse carboidrato em nível ruminal, quando comparado à celulose (VAN SOEST, 1994). Isso confirma que a utilização dos extratos enzimáticos dos fungos analisados em coprodutos permite a redução da FDA, porção indigestível para ruminantes, mantendo hemicelulose e carboidratos não fibrosos no alimento. Com isso é possível prever que os extratos utilizados permitiriam um incremento na degradabilidade ruminal dos coprodutos tratados sugerindo-se técnicas de digestibilidade *in vitro* para confirmação.

Uma melhoria na digestibilidade da fibra deve ser o objetivo da FSS quando o produto se destina a nutrição de ruminantes segundo Kamra e Zadražil (1988). Os autores afirmam ainda que esta melhoria deve ser caracterizada por decomposição marcante da lignina e liberação de nutrientes da matriz lignocelulósica com acúmulo de frações digestíveis e redução do consumo de sacarídeos. Esses relatos foram confirmados por Mahesh e Mohini (2013) numa longa revisão sobre tratamentos biológicos de resíduos para alimentação de ruminantes. Cabe ressaltar que paralelamente às reduções das frações fibrosas, a utilização de extratos enzimáticos pode colaborar com o enriquecimento do produto final no que se refere à proteína bruta (Villas-Bôas et al., 2002) devido a adição de enzimas nos coprodutos.

Houve diferença significativa ($p<0,05$) para os valores de LIG entre os tratamentos. Como já observados nos teores de FDN e FDA, os constituintes fibrosos dos coprodutos foram degradados principalmente no T1 e T4, dos extratos de *L. tigrinus* e *T. villosa*, respectivamente. Os menores teores de LIG no CDS foram 6,1% com extrato de *T. villosa* no T4 e 6,2% com o extrato de *L. tigrinus* no T1, uma redução de 32% com relação ao CDS *in natura*. Esses dados sugerem que uma maior síntese enzimática (MnP,

LiP e Lacase) pelo *L. tigrinus* pode ocorrer no início do seu processo fermentativo e um pouco mais tardia para o *T. villosa*.

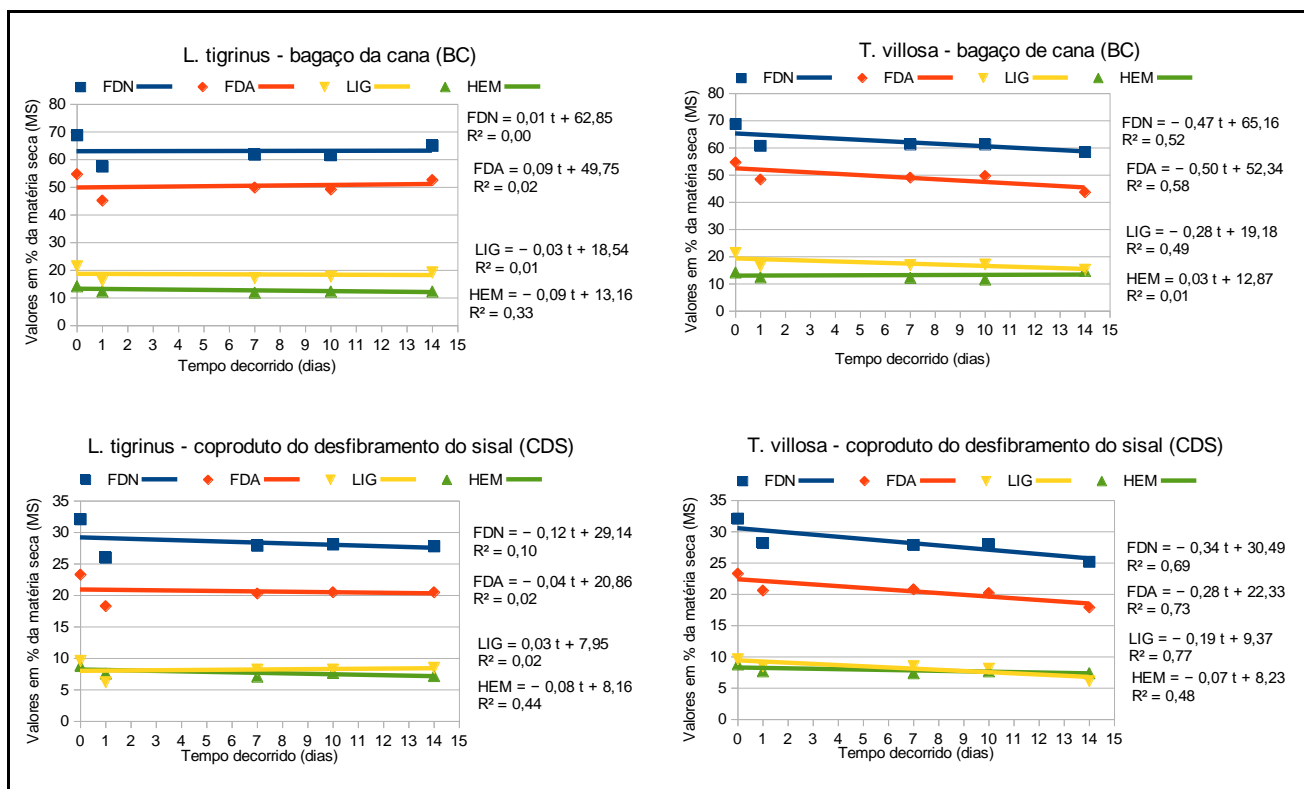
Zavarzina et al (2018) avaliando enzimas ligninolíticas em cepas de *L. tigrinus* identificaram lacases e MnP no início do desenvolvimento do microrganismo. Isikhuemhen et al, (2012) avaliando o potencial de enzimas ligninolíticas do fungo *Lentinus squarrosulus* através de FSS, encontraram o máximo da atividade enzimática aos seis dias de cultivo. Singh & Chen (2008) relatam que atividades de MnP e LiP em muitos fungos de degradação branca aparecem quando uma fonte de nutrientes disponível é limitada ou esgotada. Dessa forma, estudos da atividade enzimática do *L. tigrinus* em FSS nos 7 primeiros dias são importantes.

Já no BC os valores de LIG nos tempos de T1 e T4 para *L. tigrinus* e *T. villosa*, respectivamente, foram de 16,4% e 14,9%; chegando a uma redução de 26,0 (± 3) % desse componente nos resíduos. Assim, os dados de LIG comprovam que as maiores reduções dos componentes da parede celular se devem as degradações deste componente nos dois coprodutos, destacando-se o extrato do *T. villosa* no T4 do BC. Com este mesmo tempo de fermentação, 14 dias, o extrato de *L. tigrinus* possibilitou as menores taxas de deslignificação nos coprodutos, abaixo de 2%.

Analisando degradação da fibra do caroço de algodão por *Pleurotus ostreatus*, Li et al. (2001) observou que após 45 dias de incubação o teor de lignina diminuiu de 17% para 11%, uma redução de 35%. Já utilizando palha de trigo como substrato para *Fusarium concolor*, Li et al (2008) observaram remoção de 13,07% da lignina após 5 dias de incubação. Deswal et al, (2013) observaram 7,9% de degradação da lignina em bagaço de cana e Silva et al (2014) mostraram que o extrato enzimático bruto de *T. villosa* foi capaz de reduzir o teor de lignina em 35,0% para o bagaço de cana e 63,1% para a fibra de sisal. Os dados do presente estudo apresentam-se na média observada na literatura. Ainda que não tenha se atingido a deslignificação dos coprodutos como já relatada por outros autores, observou-se uma valiosa redução dos componentes fibrosos e a viabilidade da utilização dos fungos estudados.

A figura 2 mostra o comportamento de degradação das frações fibrosas dos substratos avaliados com a utilização dos extratos enzimáticos obtidos nos diferentes períodos e suas respectivas equações de regressão.

Figura 2. Valores de fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente ácido (FDA), celulose (CEL), hemicelulose (HEM) e lignina (LIG) em %MS do bagaço de cana (BC) e coproduto do desfibramento do sisal (CDS) *in natura* e após utilização do extrato enzimático de *L. tigrinus* e *T. villosa* obtidos por FSS nos tempos de 1, 7, 10 e 14 dias



Para todos os valores (BC) avaliados a maior variação diária (e negativa) ocorreu nas primeiras 24 h o que permite inferir que para ambos os fungos a síntese proteica inicial é mais intensa e pode ir reduzindo com o tempo. Após o primeiro dia, os extratos de *L.tigrinus* e *T.villosa* demonstraram ter efeitos diferentes pois, tanto para BC quanto para CDS, as degradações ocorreram mais acentuadamente após o dia 7 com *T. villosa*. Já com o extrato do *L.tigrinus* os valores de FDN, FDA, LIG, HEM parecem manter-se após o 7º dia de fermentação sendo mesmo mais significativa antes desse período.

CONCLUSÕES

O método de cultivo utilizado para *L. tigrinus* e *T. villosa* foram satisfatórios quanto ao desenvolvimentos e produção de ligninases confirmada no teste RBBR.

L. tigrinus e *T. villosa* mostraram potencial para utilização em FSS e redução de lignocelulose. O comportamento de síntese enzimática apresentou-se de forma diferente, demonstrando ser nos dias iniciais para o *L. tigrinus* e após 7 dias para o *T. villosa*.

Sugere-se ensaios de digestibilidade *in vitro* de materiais deslignificados com extratos enzimáticos do *L. tigrinus* bem como a quantificação enzimática destes extratos uma vez que o período de síntese enzimática demonstrou ser mais rápida com este microrganismo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABOSIADA, OSAMA & NEGM, M & BASIOUNY, M & FOUAD, M & ELAGROUDY, SHERIEN. Protein Enrichment of Agro-Industrial Waste by *Trichoderma harzianum* EMCC 540 through Solid State Fermentation for Use as Animal Feed. *Journal of Geography, Environment and Earth Science International*. 13. 1-12. 10.9734/JGEESI/2017/39019. (2018)
- ANDLAR, M., REZIĆ, T., MARĐETKO, N., et al. Lignocellulose degradation: An overview of fungi and fungal enzymes involved in lignocellulose degradation. *Eng. Life Sci.*, 18: 768-778. 2018
- ALVES, J. R. et al . Efeito de inoculante ectomicorrízico produzido por fermentação semi-sólida sobre o crescimento de *Eucalyptus dunnii* Maiden. *Pesq. agropec. bras.*, Brasília , v. 36, n. 2, p. 307-313, Feb. 2001
- BASSO, T. P. et al. Atividade celulolítica de fungos isolados de bagaço de cana-de-açúcar e madeira em decomposição. *Pesq. agropec. bras.* [online]. 2010.
- BRANDÃO, L. G. N. et al. Valor nutricional de componentes da planta e dos coprodutos da *Agave sisalana* para alimentação de ruminantes. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 63, n. 6, p. 1493-1501, 2011.
- BRANDÃO, L. G. N. et al. Efeito de aditivos na composição bromatológica e qualidade de silagens de coproduto do desfibramento do sisal. *Semina: Ciências Agrárias*, v. 34, n. 6, p. 2991-2999, 2013.
- BRASIL, Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil (CNA e Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada (CEPEA/USP). Disponível em <https://www.cnabrazil.org.br/cna/panorama-do-agro>
- CARNEIRO, R. T. O., LOPES, M. A., SILVA, M. L. C., et al. *Trametes villosa* Lignin Peroxidase (TvLiP): Genetic and Molecular Characterization. *Journal of Microbiology and Biotechnology* , 2017
- CONIGLIO, R. O. et al. Optimization of cellobiohydrolase production and secretome analysis of *Trametes villosa* LBM 033 suitable for lignocellulosic bioconversion, *Arab Journal of Basic and Applied Sciences*, 26:1, 182-192. 2019.
- DESWAL, D., GUPTA, R. NANDAL, P., KUHAD, R.C. Fungal Pretreatment Improves Amenability of Lignocellulosic Material for Its Saccharification to Sugars. *Carbohydrate Polymers*, 99, 264-269. 2013
- FERREIRA, A. B. H. *Novo Dicionário Eletrônico Aurélio*. Versão eletrônica 7.0. 5ª ed. Curitiba: Positivo, 2010.
- GHAZANFAR, Misbah et al. Role of bioprocess parameters to improve cellulase production: part I. In: *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering*. Elsevier, 2019. p. 63-76.

GOLDBECK, R.; ANDRADE, C. C. P.; RAMOS, M. M.; PEREIRA, G.A.G.; MAUGERI FILHO, F. Identification and characterization of cellulases produced by *Acremonium strictum* isolated from Brazilian biome. *International Research Journal of Microbiology*, v. 4, n. 66, p. 135-146, 2013.

GRABBER, J. H. How do lignin composition, structure, and cross-linking affect degradability? A review of cell wall model studies. *Crop Science*, vol. 45, p. 820 – 831, 2005.

ISIKHUEMHEN, O.S., MIKIASHVILI, N.A., ADENIPEKUN, C.O. et al. The tropical white rot fungus, *Lentinus squarrosulus* Mont.: lignocellulolytic enzymes activities and sugar release from cornstalks under solid state fermentation. *World J Microbiol Biotechnol* 28, 1961–1966. 2012.

JARAMILLO, P. M. D., GOMES, H. A. R., MONCLARO, A. V., SILVA, C. O. G. et al, Lignocellulosedegrading enzymes: An overview of the global market, in: Gupta, V. K., Mach, R. L. and Sreenivasaprasad, S. (Eds.), *Fungal Biomolecules: Sources, Applications and Recent Developments*, John Wiley & Sons, Ltd., Chichester, UK 2015, pp. 73–85.

JAYASEKARA, Sandhya; RATNAYAKE, Renuka. Microbial cellulases: an overview and applications. *Cellulose*, v. 22, 2019.

JUNG H. G, et al. Effect of white-rot basidiomycetes on chemical composition and *in vitro* digestibility of oat straw and alfalfa stems. *J. Anim. Sci.* 70:1928- 1935. 1992

KAMRA D. N, ZADRAŽIL, F. Microbiological improvement of lignocellulosics in animal feed production: a review. In: F Zadražil, P Reiniger (Eds.), *Treatment of Lignocellulosics with White-Rot Fungi*. Elsevier, Essex, UK, pp. 56–63. 1988

KARP, S.G.; et al. Pretreatment strategies for delignification of sugarcane bagasse: a review. *Braz Arch Biol Techn*, 56: 679-689. 2013

KOTSAMPASI, B.; CHRISTODOULOU, C.; TSIPLAKOU, E.; et al. Effects of dietary pomegranate pulp silage supplementation on milk yield and composition, milk fatty acid profile and blood plasma antioxidant status of lactating dairy cows. *Animal Feed Science and Technology*, v.234, p.228-236, 2017.

LI, X., PANG, Y., ZHANG, R., Compositional changes of cottonseed hull substrate during *P. ostreatus* growth and the effects on the feeding value of the spent substrate. *Bioresour. Technol.* 2001, 80, 157–161

KUNDU S. S., MOJUMDAR A. B., SINGH K. K. Improvement of poor quality roughages. In: SS Kundu, SK Mahanta, S Singh, PS Pathak (Eds.) *Roughage Processing Technology*, Satish serial publishing house, Delhi, India. 2005 pp. 193-209

LI, L., LI, X. Z., TANG, W. Z., ZHAO, J. et al., Screening of a fungus capable of powerful and selective delignification on wheat straw. *Soc. Appl. Microbiol. Lett. Appl. Microbio.* 2008, 47, 415–420.

LINSHENG Y., et al. Global direct nitrous oxide emissions from the bioenergy crop sugarcane (*Saccharum* spp. inter-specific hybrids), *Science of The Total Environment*, Volume 752, 2021

MANERA, D. B.; VOLTOLINI, T.V.; YAMAMOTO, S. et al. Desempenho produtivo de ovinos em pastejo suplementados com concentrados contendo coprodutos do processamento de frutas. *Semina: Ciências Agrárias*, v. 35, n. 2, p. 1013-1022, mar./abr. 2014.

MARQUES, G., SILVA, T., LESSA, et al. Production Of Xylanase And Endoglucanase By Solid-State Fermentation Of Jackfruit Residue. *Revista Mexicana De Ingeniería Química*, 18(2), 673-680. 2019

MISSIO, R. L. Tratamento do bagaço de cana-de-açúcar para alimentação de ruminantes. *Archivos de zootecnia*, v. 65, n. 250, p. 267-278, 2016.

MAHESH, M. S.; MOHINI, Madhu. Biological treatment of crop residues for ruminant feeding: A review. *African Journal of Biotechnology*, v. 12, n. 27, 2013.

NAZIR, S., IRFAN, M., NADEEM, et al. Utilização de *Bombyx ceiba* Seed Pods: Um novo substrato para a produção de celulase através da fermentação em estado sólido usando metodologia de superfície de resposta. *Punjab Univ. J. Zool.*, 34 : 213-219. 2019

OLIVEIRA, R. L. *et al.* Alimentos alternativos na dieta de ruminantes. **Revista Científica de Produção Animal**, v. 15, n. 2, p. 141-160, 2013

RAMIREZ-BRIBIESCA JE, SOTO-SANCHIEZ A, HERNANDEZ-CALVA LM, et al. Influence of *Pleurotus ostreatus* spent corn straw on performance and carcass characteristics of feedlot Pelibuey lambs. *Indian J. Anim. Sci.* 80:754-757. 2010

RIBEIRO, G.D. *Fruticultura Tropical: Uma Alternativa Para A Agricultura De Rondônia*. Porto Velho, RO: Embrapa Rondônia, 2006. 12p.

ROSA, M. F.; SOUZA FILHO, M S. M.; FIGUEIREDO, M. C. B.; MORAIS, J. P. S.; SANTAELLA, S. T. LEITÃO, R. C. Valorização de resíduos da agroindústria. II Simpósio Internacional sobre Gerenciamento de Resíduos Agropecuários e Agroindustriais – II SIGERA 15 a 17 de março de 2011

SANTOS, R. D. Dos. Et Al. Coprodutos Do Desfibramento Do Sisal Como Alternativa Na Alimentação De Ruminantes. *Circular Técnica 102, EMBRAPA*, P. 1–6, 2013.

SILVA, S.P.; RODRIGUES M. T.; VIEIRA, R. A. M.; SILVA, M. M. C. In Vitro Degradation Kinetics Of Protein And Carbohydrate Fractions Of Selected Tropical Forages. *Bioscience Journal*, V. 29, N. 5, P. 1300-1310, 2013

SILVA, D.J.; QUEIROZ, A.C. *Análises de alimentos (métodos químicos e biológicos)*. 3.ed. Viçosa, MG: Editora UFV, 2002. 235p.

SILVA, O. R. R. DA & BELTRÃO, N. E. De M. *O agronegócio do sisal no Brasil*. Brasília: Embrapa – SPI, Campina Grande - CNPA, 1999, 205p.

SILVA, M. , SOUZA, V. , SANTOS, V. , KAMIDA, H. et al. Production of Manganese Peroxidase by *Trametes villosa* on Unexpensive Substrate and Its Application in the Removal of Lignin from Agricultural Wastes. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 5, 1067-1077. 2014

ZAHRA, T. et al. Produção de celulase por *Trichoderma viride* em fermentação submersa usando metodologia de superfície de resposta. *Punjab Univ. J. Zool .*, 35 (2): 223-228. 2020

ZAVARZINA, A. G., LISOV, A. V., & LEONTIEVSKY, A. A. The role of ligninolytic enzymes laccase and a versatile peroxidase of the white-rot fungus *Lentinus tigrinus* in biotransformation of soil humic matter: Comparative in vivo study. *Journal of Geophysical Research*:. 2018.

ENRIQUECIMENTO PROTEICO DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS POR FERMENTAÇÃO SEMI SÓLIDA A PARTIR DE *Lentinus tigrinus*

RESUMO

Seleção de diferentes microrganismos e substratos são importantes desafios para viabilizar potenciais resíduos para alimentação animal. Diante disso, objetivou-se avaliar os efeitos da fermentação semissólida (FSS) com o fungo *Lentinus tigrinus* no enriquecimento proteico e degradação das frações fibrosas de diferentes resíduos agroindustriais para alimentação animal. As cepas foram repicadas por 7 dias até crescimento visível do micélio e posteriormente inoculadas nos substratos. Cinco tipos de resíduos agroindustriais foram usados como substrato: Bagaço de cana (BC), coproduto do desfibramento do sisal (CDS), feno do CDS, resíduo seco de cervejaria (RCS) e resíduo úmido de cervejaria (RUC). Amostras do substrato sem inócuo e após a FSS foram coletadas para análise bromatológica em triplicata. Os teores de MS não apresentaram grandes índices de perdas durante o período de 24 horas, mantendo um valor muito próximo ao inicial em todos os resíduos. Foi observado um enriquecimento proteico nos cinco tipos de resíduos agroindustriais estudados usando FSS por *L. tigrinus* com destaque para o resíduo úmido de cervejaria, 50%. Foi também neste substrato que houve significativa redução de lignina (17%) sob as condições estabelecidas. Todos os resíduos deste estudo podem ser usados como substrato para o enriquecimento protéico e destinados como alimentos para animais. Todavia, o resíduo de cervejaria e o coproduto do desfibramento do sisal, nas diferentes formas avaliadas, se destacaram.

Palavras-chave: Basidiomicetos. Ruminantes. Lignina. Forragicultura. Celulose.

ABSTRACT

Selection different microorganisms and substrates are important challenges to enable potential residues for animal feed. Therefore, the aim of study was to evaluate semisolid fermentation (SSF) effects from fungus *Lentinus tigrinus* on protein enrichment and fibrous fractions degradation in different agro-industrial residues for animal feed. The strains were subcultured for 7 days until visible mycelium growth and subsequently substrates inoculated. Five types of agro-industrial residues were used as substrate: sugarcane bagasse, sisal coproduct, sisal coproduct dry, dry brewery residue and wet brewery residue. Substrate samples without innocuous and after FSS were collected for bromatological analysis in triplicate. The Dry Matter contents did not show great loss rates during the 24-hour period, maintaining a value very close to the initial one in all residues. A protein enrichment was observed in the five types of agro-industrial residues studied using SSF by *L. tigrinus*, with emphasis on the wet brewery residue, 50%. It was also in this substrate that there was a significant lignin reduction (17%) under the established conditions. All residues from this study can be used as a substrate for protein enrichment and animal feed destined. However, the brewery residue and the sisal coproduct, in the different evaluated forms, stood out.

Keywords: Basidiomicetos. Ruminant. Lignin. Forage. Cellulose.

INTRODUÇÃO

A utilização de microrganismos para decomposição de substratos sólidos, como resíduos agroindustriais, sob condições controladas visando obter um produto de melhor qualidade pode ser definida como Fermentação Semissólida (FSS) (MITCHELL et al., 2002). Esta biotecnologia, segundo Bhanu et al., (2008) é uma das mais utilizadas para enriquecer os teores proteicos de resíduos agroindustriais utilizados na alimentação animal. Cabe ressaltar também que, durante a FSS, tem-se a degradação de compostos lignocelulósicos dos substratos, permitindo assim uma melhor utilização das suas frações fibrosas (MAHESH & MOHINI, 2013) e, segundo CONCEIÇÃO et al., (2010) os principais agentes de degradação destas frações estão entre os fungos basidiomicetos, sendo o *Lentinus tigrinus* uma opção.

Segundo Tang et al., (2015), viabilizar o uso de um maior número de resíduos e subprodutos agroindustriais como substratos para crescimento microbiano em FSS não só oferece benefícios econômicos (substratos mais baratos), como também ajuda na proteção ao meio ambiente. Além disso, pode levar a benefícios na produção animal quando destinados a alimentação de ruminantes (MAHESH E MOHINI, 2013) e gerar sustentabilidade com o enriquecimento de grandes volumes de biomassa.

Dentre os resíduos agroindustriais com elevada produção de biomassa, a cana de açúcar se destaca (*Saccharum sp*) sendo a segunda maior cultura de bioenergia do mundo (Yang, 2021). Segundo BRASIL, (2016) a produção nacional de cana de açúcar foi de 691 milhões de toneladas e que 27% dessa massa representa a quantidade de resíduo de bagaço de cana após o processo de produção das usinas de açúcar e álcool.

Já o sisal (*Agave sisalana*), uma planta originária da América Central, é bastante cultivada para produção de fibras no semiárido baiano (TREJO-TORRES, GANN e CHRISTENHUSZ, 2018) e segundo o IBGE, (2021) durante o ano de 2020 a Bahia produziu 81.124 toneladas de sisal em uma área correspondente a 93.376 hectares destinados a colheita, o que coloca esta cultura como grande produtora de biomassa reaproveitável.

Outra fonte abundante de resíduo agroindustrial com grande produção nacional é o resíduo de cervejaria. O Brasil é o terceiro maior produtor de cerveja no mundo de acordo com o Sindicato Nacional da Indústria da Cerveja (2021), e em 2020 a produção foi de 14,1 bilhões de litros. Após o processo de fabricação da cerveja, além da bebida, obtém-se o resíduo de cerveja úmido (SANTOS e RIBEIRO, 2005) e este resíduo já é

utilizado na alimentação animal (GILAVERTE et al., 2011) sobretudo se levado a um processo de secagem e enriquecimento.

Vários estudos demonstram o potencial da FSS como alternativa no enriquecimento proteico de resíduos (SANTOS et al., 2015; DAWISH et al., 2012) e alguns autores já relataram resultados mais acentuados nas primeiras 24 h da FSS, sob a temperatura média de 35°C, utilizando diferentes substratos e microrganismos. De França Silva (2020) encontrou um incremento proteico de 30% para o maxixe bravo em 24 h de FSS bem como Araújo et al, (2008) que registraram um incremento proteico de 100% no mesmo período de fermentação da palma forrageira, ambos utilizando *Saccharomyces cerevisiae*. Já Campos et al. (2005), estudando a FSS no bagaço do pedúnculo do caju ratifica que o tempo de fermentação necessário para a máxima conversão dos carboidratos solúveis do bagaço foi em torno de 24 horas. Foi também com 24 h de fermentação com *Bacillus subtilis* que Seo et al, (2016) encontrou os melhores valores para o perfil proteico do farelo de soja.

Sabe-se que, além do tempo de fermentação, pH e da temperatura, tem-se a necessidade de controlar outras variáveis na FSS e Thomas (2013) coloca que a seleção do microrganismo e do substrato também são desafios, uma vez que o substrato é o nutriente consumido pelo microrganismo no processo fermentativo para a síntese de proteínas (ARAUJO et. al., 2017) ressaltando a importância de se avaliar mais substratos para este fim. Aliado a isso, conhecer a potencialidade de diferentes resíduos após um curto período de fermentação, aumenta ainda mais as alternativas alimentares em áreas de pouca oferta de alimentos.

Vários estudos analisam o enriquecimento proteico de resíduos através da FSS, no entanto as avaliações de enriquecimento proteico associadas a degradação dos componentes da fibra são escassos e estes podem refletir ganhos consideráveis na alimentação animal.

O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da FSS com o fungo *Lentinus tigrinus* no enriquecimento proteico e degradação das frações fibrosas de diferentes resíduos agroindustriais para alimentação animal.

MATERIAL E MÉTODOS

As cepas de *Lentinus tigrinus* CCMB553 utilizadas pertence à coleção de culturas do Laboratório de Pesquisa em Microbiologia da Universidade Estadual de Feira de Santana - BA. Os fungos foram repicados em ágar contendo 8 g de ágar I (HiMedia); 8 g de bagaço de cana obtido após extração do caldo em lanchonete da região; 2 g de sulfato de amônio e 400 ml de água destilada, e posteriormente incubadas a 27° ($\pm 2^\circ\text{C}$) por 7 dias até crescimento visível do micélio para proceder com a FSS.

Cinco tipos de resíduos agroindustriais foram usados como substrato: Bagaço de cana (BC), coproduto do desfibramento do sisal (CDS), feno do CDS, resíduo seco de cervejaria (RCS) e resíduo úmido de cervejaria (RUC). O BC foi obtido após extração do caldo em lanchonete da região. O CDS e feno do CDS foram coletados em propriedades rurais no município de Valente – BA. Os resíduos de cervejaria, seco e úmido, foram obtidos em indústrias produtoras na cidade de Alagoinhas – BA. Os materiais coletados foram acondicionados em bags estéreis e levados ao laboratório para serem submetidos ao processo fermentativo.

As fermentações foram realizadas em triplicata num sistema de batelada utilizando-se biorreatores retangulares de plástico, com dimensões de 10 x 27 x 9 cm. Para cada 1000 g de substrato foi adicionada a concentração de 30 g (3%) de fungos, em base úmida. Após a inoculação, os biorreatores foram devidamente identificados para cada tipo de substrato e posteriormente dispostos em estufa de circulação de ar forçado, na temperatura de $35 \pm 2^\circ\text{C}$, durante um período de 24 h de fermentação.

Amostras do substrato sem inócuo e após a FSS foram coletadas em recipientes plásticos hermeticamente fechados e foram encaminhadas ao laboratório de nutrição para análise bromatológica em triplicata. As determinações de matéria seca (MS), Proteína Bruta (PB), Fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente ácido (FDA), celulose (CEL) e lignina (LIG) foram realizadas segundo Silva & Queiroz (2002). Os teores de Hemicelulose (HEM) foi obtido por diferença (FDN – FDA) como determina Silva & Queiroz (2002). Os teores de carboidratos não fibrosos (CNF) foram calculados pela equação: $\text{CNF} = 100 - (\text{PB}\% + \text{EE}\% + \text{MM}\% + \text{FDN}\%)$, de acordo com Sniffen et al. (1992). A composição bromatológica dos substratos antes da FSS encontram-se na tabela 1.

Tabela 1. Composição Bromatológica dos resíduos agroindustriais *in natura* em % da MS

	BC	CDS	FENO CDS	RUC	RSC
MS	44,3	13,2	88,6	22,7	89,8
PB	2,6	9,3	8,6	21,8	22,1
CNF	12,4	50,3	49,1	17,2	15,7
FDN	59,8	28,1	31,7	63,1	65,2
FDA	40,2	20,1	23,3	25,2	26,5
HEM	19,6	8,0	8,4	37,9	38,7
LIG	10,4	8,4	8,3	14,1	14,7

As determinações do aumento proteico (AP) e da degradação da fibra (DEF) das amostras foram definidas como a diferença dos valores após a fermentação (%) e *in natura* (%) divididas pelo valor *in natura* (%), como descrito na Equação 1.

$$AP \text{ ou } DEF (\%) = \frac{\text{Valor após FSS (\%)} - \text{Valor } in \text{ natura (\%)}}{\text{Valor } in \text{ natura (\%)}} \times 100$$

Obteve-se então a diferença em porcentagem entre os valores, antes e após a fermentação, com a finalidade de avaliar quantitativamente a influência do uso do *L. tigrinus* em diferentes substratos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os teores de MS não apresentaram grandes índices de perdas durante o período de 24 horas, mantendo um valor muito próximo ao inicial em todos os resíduos, demonstrando que o teor de água se manteve muito próximo ao material *in natura* após o período fermentativo, como mostra a tabela 2.

A perda de umidade geralmente ocorre de forma mais acentuada após maiores tempos de fermentação como descrito por Santana Neto et al. (2017), Souza et al. (2021) e França Silva et al. (2020) avaliando a FSS nos resíduos de abacaxi, goiaba e maxixe-bravo, respectivamente. Esses autores observaram uma perda de água de até 60% após 72 h de fermentação e atribuíram isso à evaporação, pelo uso de estufa com circulação de ar e aquecimento do material, bem como pelo consumo de água para a realização das atividades metabólicas do meio e síntese de novas células do microrganismo como descreve Fonseca et al., (2019). Nos mesmos estudos citados, os teores de MS não sofreram grande variação nas primeiras 24 h assim como observado no presente trabalho.

Tabela 2. Valores de matéria seca (MS), proteína bruta (PB) e o aumento proteico (AP) em %MS de resíduos agroindustriais *in natura* e após FSS por *L. tigrinus*

	BC		CDS		FENO CDS		RUC		RSC	
	<i>in natura</i>	FSS	<i>in natura</i>	FSS	<i>in natura</i>	FSS	<i>in natura</i>	FSS	<i>in natura</i>	FSS
MS	44,3	45,3	13,2	16,7	88,6	89,1	22,7	23,8	89,8	90,1
PB	2,6	3,4	9,3	12,4	8,6	12,4	21,8	32,7	22,1	31,8
AP	31%		34%		45%		50%		44%	

É importante ressaltar que na FSS utiliza-se uma quantidade de líquido que possa garantir o crescimento e metabolismo dos microrganismos, porém, a máxima capacidade de ligação da água com a matriz sólida não deve ser excedida (PANDEY, 2003; SINGHANIA et al., 2009). De acordo com Pontes (2009) o limite mínimo para teor de MS seria em torno de 12%, abaixo do qual os microrganismos não se desenvolvem e o limite máximo seria de 80%. A autora ressalta, porém, que é importante levar em consideração o tipo de material que está sendo utilizado. Os teores de MS dos resíduos utilizados estão dentro desta faixa preconizada e podem permitir um bom processo fermentativo.

A manutenção nos teores de MS após a fermentação é um aspecto importante no que tange a utilização destes resíduos na alimentação de ruminantes no semiárido. Segundo Ferreira et al. (2009) alimentos com maiores teores de umidade são utilizadas durante períodos de secas prolongadas como um suporte alimentar dos ruminantes pois, além de suprir parte da demanda nutricional dos animais, podem também suprir parte das exigências de água. Com exceção do Feno do CDS e o RSC, que são alimentos que passam por processos de secagem prévia para facilitar seu armazenamento (FELLOWS, 2006), a manutenção dos teores de MS nos demais resíduos estudados assegurou suas características quanto ao armazenamento de água e possível utilização nos períodos de estiagem.

Os valores de PB antes e após a FSS bem como de aumento proteico (AP) nos resíduos, apresentados na tabela 2, demonstram um AP acima de 30% em todos os alimentos avaliados. O menor AP observado foi para o BC e o maior para o RUC sendo 31 e 50%, respectivamente, estando o AP do CDS (45%), Feno do CDS (45%) e do RSC (44%) próximos aos maiores valores encontrados neste trabalho.

O aumento proteico no BC infere que houve um menor desenvolvimento do microrganismo com este substrato, o que pode ser consequência do menor aporte de nutrientes e carboidratos solúveis neste resíduo em comparação aos demais. Segundo Lima (2009) quando o substrato limita a atividade metabólica, o microrganismo pode desencadear processos como esporulação, crescimento reduzido ou mesmo morte celular. Lareo et al (2006) e Suhet e Fioreze (2011) mostram que a esporulação na FSS ocorre logo após a depleção de glicose no meio. Estes autores corroboram os dados observados no presente estudo tendo em vista os baixos teores de carboidratos disponíveis no BC (tabela 1), o que ratifica a importância do substrato no processo.

O aumento proteico observado após a FSS no CDS, assim como no BC, também não foi acentuado como nos demais substratos. Muito embora o CDS ofereça quantidades de CNF maiores que o BC (tabela 1), o valor de MS do coproduto do sisal, 13,2% pode ter comprometido o processo fermentativo pois está próximo do mínimo preconizado, como já citado. Esta possibilidade pode ser também levantada com o AP de 45% no Feno do CDS (tabela 2). Tendo em vista que ambos, CDS e Feno do CDS, foram submetidos às mesmas condições de fermentação e os dois possuem quantidades semelhantes de nutrientes, os teores divergentes no AP podem ser atribuídos aos teores de MS do feno do CDS que colaboraram substancialmente para a síntese celular no meio.

Segundo Taragano et al (1999), na FSS o alto teor de umidade pode influenciar o estado físico do substrato, a disponibilidade e a difusão de nutrientes e a troca de oxigênio e de CO₂ no meio. Raimbault et al., (1980) relata que o elevado teor de umidade inicial na FSS pode afetar o crescimento do microrganismo, pois a porosidade do meio e a difusão de oxigênio são reduzidas, dificultando a formação do produto. Contudo, Araújo et al. (2005) avaliando diferentes teores de umidade para enriquecimento proteico da palma forrageira, relataram que a umidade desta cactácea deve estar acima de 90%. No entanto, os autores utilizaram a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, microrganismo com características diferentes ao utilizado no presente estudo.

O RUC obteve o maior AP, 50% dentre os substratos. Esses dados são compatíveis com Canedo et al. (2016) que avaliando o enriquecimento proteico do resíduo de cervejaria com o fungo *Rhizopus oligosporus*, encontrou um AP de 50% quando não houve suplementação na FSS. No mesmo estudo, quando a fermentação foi suplementada com Sulfato de Amônia e uréia, os ganhos ultrapassaram 75% de AP. Os autores atribuíram estes ganhos ao bom nível de nutrientes do substrato e a umidade em torno de 70%. Também trabalhando com resíduo de cervejaria, Ogunjobi et al., (2011) obtiveram AP de até 55% quando o fungo *Aspergillus atyzae* foi submetido às melhores condições de fermentação para este microrganismo. Os resultados encontrados no presente estudo confirmam o potencial do RUC para enriquecimento proteico através da FSS com o *L. tigrinus* nas condições aqui avaliadas.

Alguns autores como Joshi e Sandhu (1996) e Alexandre et al. (2013) relatam AP ainda mais elevados para outros resíduos com a FSS. No caso dos primeiros, foi observado um aumento de três vezes no teor de proteína bruta do bagaço de maçã usando três leveduras, *S. Candida utilis* e *Torula utilis*. Já o segundo, utilizando *S. cerevisiae* no enriquecimento do resíduo da casca de abacaxi, verificaram que o resíduo enriquecido apresentou elevado teor de proteína (20,21%) em relação ao resíduo in natura (7,61%) com um AP de aproximadamente 180%. Ressalte-se ainda o aumento proteico encontrado por Santos et al., (2015) de 78% quando utilizou o fungo *Aspergillus niger* na FSS da palma forrageira. Esses autores observaram ainda uma redução nos teores de celulose, HEM e LIG em aproximadamente 40%, 36% e 28%, respectivamente e atribuíram estes resultados à capacidade do fungo de produzir as enzimas que catalisam a hidrólise destes polímeros.

Dentre os microrganismos que produzem enzimas fibrolíticas extracelulares, os fungos são os mais estudados devido à sua capacidade de produzir quantidades

abundantes (KIM et al., 2003). Isso corrobora os valores da tabela 3 quando a FSS utilizando o fungo *L. tigrinus* permitiu a redução de até 22% da FDN e até 17% da lignina nos resíduos estudados.

Tabela 3. Valores de fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente ácido (FDA), hemicelulose (HEM), lignina (LIG) e suas degradações (DEG) em %MS de resíduos agroindustriais após FSS por *L. tigrinus*

	BC		CDS		FENO CDS		RUC		RSC	
	FSS	DEG	FSS	DEG	FSS	DEG	FSS	DEG	FSS	DEG
FDN	47,2	21%	23,6	16%	27,2	14%	49,2	22%	51,5	21%
FDA	32,9	18%	17,2	14%	20,2	13%	20,0	20%	21,2	20%
HEM	15,6	20%	6,8	14%	7,4	11%	32,6	14%	34,4	11%
LIG	8,6	17%	7,56	10%	7,5	9%	12,5	11%	13,0	11%

As maiores degradações das frações fibrosas observadas foram para o BC, RCU e RSC. Nestes substratos as degradações da FDN alcançaram 21, 22 e 21%, respectivamente. A degradação da lignina (LIG) também foi mais acentuada para estes substratos com maior atenção ao BC que atingiu 17%. Já no Feno do CDS os valores foram os menores observados no estudo sendo 14% para FDN e 9% para degradação da LIG. Esses valores não diferiram consideravelmente para o CDS e permite inferir que a utilização dos nutrientes disponíveis no coproduto do sisal foi suficiente para o crescimento do microrganismo sem necessidade de degradação da fibra. Segundo Brandão et al., (2011) o teor de carboidratos não fibrosos é de aproximadamente 45% no CDS, valor próximo ao encontrado neste trabalho (tabela 1) e representa teores acima dos demais substratos.

Hiscox et al., (2010) afirma que a secreção das enzimas fibrolíticas depende de fatores ambientais e é fortemente regulada pela disponibilidade de nutrientes o que também foi confirmado por Fernández-Fueyo et al., (2014). Dessa forma, a menor oferta de açúcares solúveis no BC, RUC e RSC provavelmente possibilitou uma maior degradação da parede celular, incluindo a LIG, nestes substratos.

Segundo Ahmad et al., (2013) algumas das enzimas sintetizadas durante a FSS são Lacase, Manganês Peroxidase e Lignina Peroxidase e estas, por sua vez, são responsáveis pela degradação da lignina nos substratos (SILVA et al., 2014). Além destas enzimas, Santos et al (2013) relata a xilanase que é responsável pela degradação do xilano, importante componente da hemicelulose. Ressalte-se que os fungos, de acordo

com Singh et al., (2009) são potencialmente mais úteis para a produção de xilanase pois secretam enzimas no meio e seus níveis são, geralmente, maiores aos de leveduras e bactérias.

Mukhopadhyay et al., (2011) alcançou elevados níveis, acima de 80%, de degradação da LIG de *Ricinus comunis* aplicando lacase comercial. Silva et al (2014) trabalhando com o extrato enzimático bruto de *T. villosa* após FSS, observou que este foi capaz de reduzir o teor de lignina em 35,0% para o BC e 63,1% para o CDS após 4 horas de fermentação e que nenhuma melhora foi detectada para tempos de reação mais longos. Zavarzina et al (2018) avaliando enzimas ligninolíticas em cepas de *L. tigrinus* identificaram atividades de lacases e MnP no início do desenvolvimento do microrganismo. Assim, a degradação das frações fibrosas, incluindo HEM e LIG, assim como o aumento proteico observado neste estudo pode ser explicado pela ação e produção de enzimas pelo *L. tigrinus* e pela proliferação do microrganismo no meio.

Estudos demonstram que alimentos com maiores teores de proteína e menor teores de fibra favorecem o consumo e ganho de peso nos ruminantes. Silva et al. (2002), relatam que ao fornecerem dietas com 14 e 17% de PB na MS, para novilhos na fase de recria, observaram que o consumo aumentou com o incremento de PB na dieta. Santos et al (2015) descrevem um aumento da degradabilidade ruminal estudando palma forrageira enriquecida por FSS. Mertens, (1994) coloca a fibra dos alimentos como limitante do consumo por ruminantes visto ser inversamente relacionada ao conteúdo energético e melhor representar a propriedade dos alimentos em ocupar espaço no trato gastrointestinal. Tendo em vista os ganhos dos resíduos no presente estudo, cabe propor então que a melhoria na qualidade nutricional destes os torna alimentos, possivelmente, mais favoráveis a um maior consumo, maior degradabilidade e, conseqüentemente, maior ganho de peso animal.

CONCLUSÕES

Foi observado um enriquecimento proteico nos cinco tipos de resíduos agroindustriais estudados usando FFS por *L. tigrinus*. Observou-se um aumento proteico de 50% do resíduo úmido de cervejaria e de 17% da lignina sob as condições estabelecidas.

Todos os resíduos deste estudo podem ser usados como substrato para o enriquecimento de alimentos para animais. Todavia, o resíduo de cervejaria e o coproduto do desfibramento do sisal, nas diferentes formas avaliadas, se destacaram.

Recomenda-se estudos de FFS com *L. tigrinus* sob diferentes condições de pH e temperatura no sentido de, possivelmente, otimizar a síntese enzimática pelo fungo. Ensaio de consumo, digestibilidade e ganho de peso em ruminantes alimentados com estes resíduos enriquecidos serão importantes para a sua utilização.

REFERÊNCIAS

- AHMAD, Z; BUTT, M. S; RIAZ, M. Partial Purification and Charactrization of Xylanase produced from *Aspergillus niger* using Wheat Bran. *Pakistan Journal of Agriculture Science*, Faisalabad, v. 50, n. 3, p. 433-437, 2013.
- ALEXANDRE, Hofsky V. et al. Cinética de secagem do resíduo de abacaxi enriquecido. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, v. 17, p. 640-646, 2013.
- ARAÚJO, L. de F. et al. Equilíbrio higroscópico da palma forrageira: Relação com a umidade ótima para fermentação sólida. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, v. 9, p. 379-384, 2005.
- ARAÚJO, L. de F. et al. Enriquecimento protéico da palma forrageira com *Saccharomyces cerevisiae* para alimentação de ruminantes. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 60, p. 401-407, 2008.
- ARAUJO, L. F.; et al. Enriquecimento nutricional da casca da mandioca (*manihot esculenta*, crantz) por processo biotecnológico destinado à alimentação animal. 2017. *Revista Raízes e Amidos Tropicais*. Vol.13, nº1. p.18-30, 2017.
- Bhanu PGV, Padmaja V, Siva KRR. Statistical optimization of process variables for the large-scale production of *Metarhizium anisopliae* conidiospores in solid-state. *Bioresour Technology*. 2008; 99(6):1530–1537
- BRANDÃO, L. G. N. et al. Valor nutricional de componentes da planta e dos coprodutos da *Agave sisalana* para alimentação de ruminantes. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 63, p. 1493-1501, 2011.
- CAMPOS, A. R. N.; SANTANA, R. A. C.; DANTAS, J. P.; OLIVEIRA, L. S. C.; SILVA, F. L. H. Enriquecimento proteico do bagaço do pedúnculo de caju por cultivo semissólido. *Revista de Biologia e Ciência da Terra, Belo Horizonte*, v. 5, n. 2, p. 72-82, 2005.
- CANEDO, Marianny Silva et al. Protein enrichment of brewery spent grain from *Rhizopus oligosporus* by solid-state fermentation. *Bioprocess and biosystems engineering*, v. 39, n. 7, p. 1105-1113, 2016.
- DARWISH, G. A. M. A.; BAKR, A. A.; ABDALLAH, M. M. F. Nutritional value upgrading of maize stalk by using *Pleurotus ostreatus* and *Saccharomyces cerevisiae* in solid state fermentation. *Annals of Agricultural Science, Ain-Shams*, v. 57, n. 1, p. 47–51, 2012.
- DESWAL, D., GUPTA, R. NANDAL, P., KUHAD, R.C. Fungal Pretreatment Improves Amenability of Lignocellulosic Material for Its Saccharification to Sugars. *Carbohydrate Polymers*, 99, 264-269. 2013

FELLOWS P. J. Tecnologia do processamento de alimentos: Princípios e prática. Tradução: Florencia Cladera Oliveira et al – 2º edição – Porto Alegre: Artmed, 2006. 602p.

FERNÁNDEZ-FUEYO, E. et al. Lignolytic peroxidase gene expression by *Pleurotus ostreatus*: differential regulation in lignocellulose medium and effect of temperature and pH. *Fungal Genetics and Biology*, v. 72, p. 150-161, 2014.

FERREIRA, Marcelo de Andrade et al. Estratégias na suplementação de vacas leiteiras no semi-árido do Brasil. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 38, p. 322-329, 2009.

Fonseca, J. V. D. S., Andrade, M. D. L., Nogueira, L. P. D. S., Santos, J. D., & Feitoza, J. V. F. (2019). Enriquecimento proteico de resíduo de frutas através de fermentação semi sólida utilizando *Saccaromyces cerevisiae*. *Hig. Alim.* 32(289), 604-608. https://higienealimentar.com.br/wp-content/uploads/2019_web-2.pdf

FRANÇA SILVA, Aline Priscila et al. Enriquecimento proteico do maxixe-bravo (*Cucumis dipsaceus ehrenb*) por fermentação semissólida. *Brazilian Journal of Development*, v. 6, n. 7, p. 48239-48250, 2020.

HERNÁNDEZ, Arnoldo Flores et al. Fermentación semisólida del nopal (*Opuntia spp*) para su uso como complemento proteico animal. *Revista de Geografía Agrícola*, n. 63, p. 87-100, 2019.

HISCOX, Jennifer et al. Changes in oxidative enzyme activity during interspecific mycelial interactions involving the white-rot fungus *Trametes versicolor*. *Fungal Genetics and Biology*, v. 47, n. 6, p. 562-571, 2010.

JOSHI, V. K^{††}; SANDHU, D. K. Preparation and evaluation of an animal feed byproduct produced by solid-state fermentation of apple pomace. *Bioresource Technology*, v. 56, n. 2-3, p. 251-255, 1996.

KIM, Kyoung-Cheol et al. Isolation and characteristics of *Trichoderma harzianum* FJI producing cellulases and xylanase. *Journal of microbiology and biotechnology*, v. 13, n. 1, p. 1-8, 2003.

Lareo C, Sposito AF, Bossio AL, Volpe DC (2006) Characterization of growth and sporulation of *Mucor bacilliformis* in solid state fermentation on an inert support. *Enzyme Microb Tech* 38:391–399

Lima T (2009) Modelo de inferência para a estimação da umidade do leito de um biorreator de fermentação no estado solido. Master thesis, Universidade Federal do Parana, Curitiba, p 166

MERTENS, D.R. Predicting intake and digestibility using mathematical models of ruminal function. *Journal of Animal Science*, v.64, n.5, p.1548-1558, 1987

Mitchell DA, Tongta A, Stuart DM, Krieger N. The potential for establishment of axial temperature profiles during solid-state fermentation in rotating drum bioreactors. *Biotechnology and Bioengineering*. 2002; 80(1):114-122.

MUKHOPADHYAY, M. et al. Enzymatic depolymerization of *Ricinus communis*, a potential lignocellulosic for improved saccharification. *Biomass and bioenergy*, v. 35, n. 8, p. 3584-3591, 2011.

OGUNJOBI, Adeniyi Adewale; MEJEHA, Obioma Kelechi; FAGADE, Obasola Ezekiel. Protein Enrichment of Brewery Spent Grains Using *Aspergillus atyzae*. 2011.

PANDEY, A. Solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, v.13, n. 2-3, p. 81-84, 2003.

PONTES, C.R. Enriquecimento proteico do bagaço de caju através de fermentação semissólida utilizando *Aspergillus niger*. 2009. 72f. Dissertação (Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2009.

RAIMBAULT, M.; ALAZARD, D. Culture method to stud fungal growth in solid state fermentation. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, v.9, p.199-209, 1980

SANTANA NETO, Deocleciano Cassiano et al. Avaliação do processo de enriquecimento proteico de resíduo de abacaxi. *Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável*, v. 12, n. 1, p. 95-99, 2017.

SANTOS, T. C. et al. Application of response surface methodology for producing cellulolytic enzymes by solid-state fermentation from the puple mombin (*Spondias purpurea* L.) Residue. *Food Science and Biotechnology*, v. 22, n. 1, p. 1-7, 2013.

SANTOS, T. C. et al. Effect of solid state fermentation on nutritional content and evaluation of degradability in cactus pear. *Revista Caatinga*, v. 28, p. 248-254, 2015.

SEO, Sang-Hyun; CHO, Seong-Jun. Changes in allergenic and antinutritional protein profiles of soybean meal during solid-state fermentation with *Bacillus subtilis*. *LWT*, v. 70, p. 208-212, 2016.

SILVA, F.F., V FILHO, S.C., ÍTAVO, L.C., VELOSO, C. M., P, M. F. CECON, P. R., SILVA, P. A. & GALVÃO, R. M. (2002). Desempenho Produtivo de Novilhos Nelore, na Recria e na Engorda, Recebendo Dietas com Diferentes Níveis de Concentrado e Proteína. *Revista Brasileira de Zootecnia*,31, 492-502

SILVA, M. , SOUZA, V. , SANTOS, V. , KAMIDA, H. et al. Production of Manganese Peroxidase by *Trametes villosa* on Unexpensive Substrate and Its Application in the Removal of Lignin from Agricultural Wastes. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 5, 1067-1077. 2014

SINGHANIA, R. R. et al. Recent advances in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, v. 44, p. 13-18, 2009.

SHOJAOSADATI, S.A., R. Faraidouni, A. Madadi-Nouel, I. Mohamadpour, Protein enrichment of lignocellulosic substrates by solid state fermentation using *Neurospora sitophila*, *Resources, Conservation and Recycling* 27 (1999) 73e87

SILVA, D.J.; QUEIROZ, A.C. Análises de alimentos (métodos químicos e biológicos). 3.ed. Viçosa, MG: Editora UFV, 2002. 235p.

SINGH, S. et al. Production of high level of cellulase-poor xylanases by wild strains of white-rot fungus *Coprinellus disseminatus* in solid-state fermentation. *New Biotechnology*, v. 26, n. 3-4, p. 165-170, 2009.

SNIFFEN, C.J.; O'CONNOR, J.D.; VAN SOEST, P.J. et al. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: II. Carbohydrate and protein availability. *J. Anim. Sci.*, v.70, p.3562-3577, 1992.

SOUSA, Sara Morgana Felix de et al. Enriquecimento proteico do resíduo da goiaba (*Psidium guajava* L.) por meio da fermentação semissólida. *Research, Society and Development*, v. 10, n. 14, p. e385101422050-e385101422050, 2021.

Suhet MI, Fioreze R. Produção de proteína unicelular a partir do resíduo da industrialização do abacaxi utilizando fermentação em estado semissólido. *Rev Bras Tecnol Agroind Ponta Grossa* 5(2):584–592, 2011

TANG, Bao et al. Highly efficient rice straw utilization for poly-(γ -glutamic acid) production by *Bacillus subtilis* NX-2. *Bioresource technology*, v. 193, p. 370-376, 2015.

TARAGANO, V. M.; PILOSOF, A. M. R. Application of doehlert designs for water activity, pH, and fermentation time optimization for *Aspergillus niger* pectinolytic activities production in solidstate and submerged fermentation. *Enzyme and Microbiol technology*, v.25, p.411-419, 1999

THOMAS, Leya; LARROCHE, Christian; PANDEY, Ashok. Current developments in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, v. 81, p. 146-161, 2013.

TREJO-TORRES, J. C.; GANN, G. D. & CHRISTENHUSZ, M. J. M., 2018. The Yucatan Peninsula is the place of origin of sisal (*Agave sisalana*, Asparagaceae): historical accounts, phytogeography and current populations. *Botanical Sciences*, v. 96, n. 2, p. 366. Disponível em: . Acesso em 03/10/2021

ZAVARZINA, A. G., LISOV, A. V., & LEONTIEVSKY, A. A. The role of ligninolytic enzymes laccase and a versatile peroxidase of the white-rot fungus *Lentinus tigrinus* in biotransformation of soil humic matter: Comparative in vivo study. *Journal of Geophysical Research*:. 2018.

APÊNDICE



Biorreatores com bagaço de cana e os fungos *L. Tigrinus* e *T. villosa* com diferentes tempos de fermentação



Amostras dos extratos dos fungos *L. Tigrinus* e *T. villosa* para tratamento dos resíduos



Amostras do bagaço de cana tratados com os extratos dos fungos *L. Tigrinus* e *T. villosa* para avaliação bromatológica