

PRODUÇÃO DE CELULASES E DE BIOMASSA POR FUNGOS FILAMENTOSOS

Nelson Lima*

SUMÁRIO

O objectivo deste trabalho foi estudar a capacidade de fungos filamentosos por nós isolados UA 1.12, UA 4.2 e UA 5.4 de produzirem extracelularmente CMC'ase, FP'ase e β -glucosidase, bem como, de produzirem biomassa fúngica quando crescidos em meio de carboximetilcelulose a 1%.

PALAVRAS CHAVE: Fungos celulolíticos; Degradação enzimática da celulose; Carboximetilcelulose; CMC'ase; FP'ase; β -Glucosidase; Biomassa fúngica.

1-INTRODUÇÃO

A celulose é o biopolímero natural e renovável mais abundante produzido na Terra. Tem sido estimado que 10^{11} toneladas de material vegetal são anualmente produzidos pelo ciclo de Calvin (Ryu e Mandels, 1980; Hecht et al., 1982), para além de enormes volumes de materiais celulósicos serem acumulados pelas sociedades modernas, como lixos domésticos, causando problemas ecológicos graves.

Por outro lado, a degradação da celulose na natureza é quase exclusivamente feita por microrganismos. Estes microrganismos celulolíticos, incluindo fungos filamentosos, são capazes de originar grandes quantidades de enzimas que podem degradar facilmente a celulose produzindo açúcares solúveis. As celulases são um complexo de enzimas contendo endo- β -1,4-glucanase, EC 3.2.1.4, também designada por CMC'ase ou C_x , exo- β -1,4-glucanase, EC 3.2.1.91, também designada por celobiohidrolase, CBH ou C_1 e, finalmente, β -glucosidase, EC 3.2.1.21 (Fujii, 1991). Para uma hidrólise da celulose insolúvel em pequenas moléculas solúveis de celo-oligossacarídeos (principalmente celobiose) é necessário uma acção sinérgica entre as diferentes componentes de endoglucanases e celobiohidrolases e, subsequentemente, é necessário a acção da β -glucosidase para hidrolisar a celobiose para dar glucose (Mandels et al., 1976; Barnett et al., 1991). A procura de novas estirpes celulolíticas mostrou que muitos microrganismos são capazes de produzir celulases extracelularmente com a possibilidade de variadas aplicações tais como a conversão de resíduos celulósicos para açúcares fermentáveis ou para produzir materiais com valor alimentar (Ryu e Mandels, 1980). Foram objectivos deste trabalho (i) estudar e comparar a capacidade celulolítica relativa e, (ii) estudar e comparar a capacidade de conversão da celulose em biomassa, por três fungos filamentosos isolados do meio ambiente.

* Ciência Integrada, Universidade do Minho, 4719 Braga Codex

2-MATERIAL E MÉTODOS

2.1-Microrganismos

Diferentes fungos filamentosos com a capacidade de degradarem celulose foram isolados a partir de resíduos celulósicos vegetais em várias regiões de Portugal (Lima, 1989). Dentro da nossa colecção foram escolhidos os três fungos que apresentaram maior capacidade relativa de degradarem substratos celulósicos (Lima, 1989). Os isolamentos seleccionados foram UA 1.12, UA 4.2 e UA 5.4. Estas estirpes ainda não foram identificadas.

2.2-Meio de crescimento

O meio de cultura utilizado para o crescimento dos fungos celulolíticos foi o meio desenvolvido por Mandels e Reese (Sternberg, 1976) contendo por litro de água destilada $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1,4g; KH_2PO_4 2,0g; Ureia (Merck) 0,3g; CaCl_2 0,3g; MgSO_4 0,3g; Peptona (Difco) 0,1g; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5,0mg; $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 1,6mg; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1,4mg; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 2,0mg. A fonte de carbono foi carboximetilcelulose (BDH 27649) a 1,0% (p/v). O pH foi inicialmente ajustado a 5,0 pela adição de 0,1N de HCl. Erlenmeyers de 500ml contendo 100,0ml de meio foram esterilizados por autoclavagem a 110°C durante 40 min.

2.3-Inóculo e recolha do meio

O inóculo foi preparado fazendo crescer os fungos em placas de meio agarizado de batata e dextrose durante 7 dias. Retirou-se de cada uma destas placas dez discos de 12mm de diâmetro que foram colocados em 50,0ml de água destilada. Com a ajuda de um ultra-turax e durante 10s foi feita uma suspensão uniforme da qual se retirou 10,0ml para inocular os Erlenmeyers com o meio de cultura. Cada fungo em estudo foi incubado durante 7, 14, 21 ou 28 dias a 25°C sem agitação.

Depois da incubação, todo o meio de cultura foi centrifugado a 15000rpm durante 40 min numa centrífuga Cryofuge 20-3 (Haraeus-Christ). O sobrenadante dos diferentes fungos obtidos foram guardados a 4°C com 0,1% de NaN_3 (p/v) até à realização dos ensaios analíticos e enzimáticos. Os micélios dos diferentes fungos depois de lavados três vezes com água destilada foram colocados em cadinhos tarados e colocados numa estufa a 60°C para se determinar o peso seco da biomassa fúngica.

2.4-Ensaio analíticos

O conteúdo da proteína solúvel presente no meio de cultura foi determinado pelo método de Folin-Ciocalteu (Lowry et al., 1951). Albumina sérica bovina foi usada como proteína padrão.

O conteúdo dos açúcares totais e dos açúcares redutores foram determinados respectivamente pelo método do ácido sulfúrico-fenol (Dubois et al., 1956) e pelo método do ácido dinitrossalicílico (Sumner e Somers, 1944). Para ambos os métodos foi usado a glucose como açúcar padrão.

2.5- Ensaio enzimáticos

Para determinar a actividade da carboximetilcelulase (CMA'ase) adicionou-se 0,2ml de sobrenadante a 4,5ml de solução de carboximetilcelulose a 1,0% (p/v) (feita em tampão citrato 0,05M a pH 4,8) e a 0,3ml de tampão citrato 0,05M a pH 4,8. Incubou-se a solução durante 120 min a 50°C. Os açúcares redutores libertados foram determinados segundo o método anteriormente

descrito. As unidades de actividade enzimática representam o número de μ moles de glucose libertada por minuto e por mililitro de sobrenadante (Garg e Neelakantan, 1982).

Para determinar a actividade do papel de filtro (FP'ase) retirou-se 0,4ml de sobrenadante e adicionou-se a 0,6ml de tampão citrato 0,05M a pH 4,8 e a uma tira de 1x6cm de papel de filtro Whatman n°1 (50mg) e incubou-se durante 120 min a 50°C. Os açúcares redutores libertados foram determinados segundo o método anteriormente descrito. As unidades de actividade enzimática representam o número de μ moles de glucose libertada por minuto e por mililitro de sobrenadante (Garg e Neelakantan, 1982).

Para determinar a actividade da β -glucosidase adicionou-se 1,0ml de sobrenadante a 1,0ml de tampão acetato 0,2M a pH 4,0, a 1,0ml de água e a 1,0ml de o-nitrofenil β -D-glucosido 5mM. A solução foi incubada durante 60 min a 37°C. Acabada a incubação adicionou-se 4,0ml de tampão glicina-NaOH 0,4M a pH 10,8. A libertação do o-nitrofenol foi medida espectrofotometricamente a 430nm. A unidade de actividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para libertar 25 μ g de o-nitrofenol dentro das condições definidas para o ensaio (Wood, 1968).

3-RESULTADOS E DISCUSSÃO

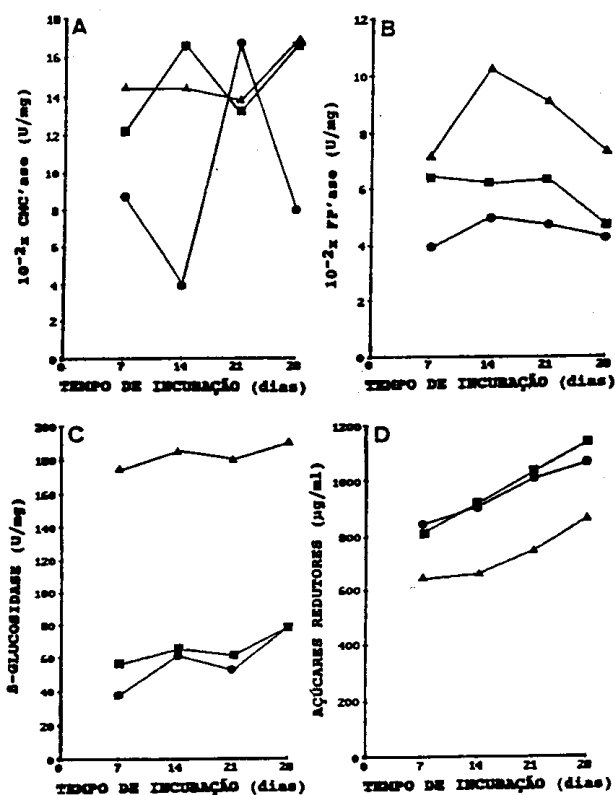


Fig. 1 - Evolução das actividades específicas da CMC'ase (A), FP'ase (B) e β -glucosidase (C) e, da concentração de açúcares redutores (D) ao longo do tempo de incubação dos isolamentos UA 1.12 (●), UA 4.2 (▲) e UA 5.4 (■).

Os resultados obtidos ao longo do crescimento descontínuo com 1,0% de carboximetilcelulose com incubação sem agitação a 25°C para as actividades específicas da CMC'ase, FP'ase e β -glucosidase, bem como, para a produção de açúcares redutores estão apresentados na Fig. 1.

Observámos para a actividade específica da CMC'ase um aumento global durante os 28 dias de incubação dos isolamentos UA 4.2 e UA 5.4 (Fig. 1-A). Para o isolamento UA 1.12 a máxima actividade específica da CMC'ase foi aos 21 dias.

A actividade específica máxima da FP'ase foi observada no isolamento UA 4.2 (Fig. 1-B). Observámos que para os isolamentos UA 1.12 e UA 4.2 o dia 14 apresentava os picos de máxima actividade da FP'ase, ao passo que, para o isolamento UA 5.4 encontramos um plateau entre os dias 7 e 21 (Fig. 1-B). Relacionámos o decréscimo da actividade específica da FP'ase a partir do dia 14, para o primeiro caso, e do dia 21 para o segundo caso, com o aumento de açúcares redutores (Fig. 1-D) livres no sistema e, conseqüente, inibição da actividade da FP'ase.

O fungo UA 4.2 apresentou a maior actividade específica de β -glucosidase durante todo o tempo de incubação (Fig. 1-C). Todos os isolamentos mostraram um aumento gradual da actividade específica da β -glucosidase (Fig. 1-C) o que estará intimamente relacionado com a acumulação de açúcares redutores que foram determinados ao longo do tempo de incubação (Fig. 1-D).

A Tabela I mostra-nos a relação entre o peso seco e os açúcares totais ao longo do tempo de incubação para os diferentes isolamentos. Tomando todos os valores do peso seco e dos açúcares totais encontramos uma correlação negativa ($r=-0,56$). O isolamento UA 1.12 foi o fungo que apresentou maior factor de correlação ($r=-0,95$). Estes dados demonstram que houve conversão do substrato em biomassa fúngica.

TABELA I: Peso seco e concentração de açúcares totais para os diferentes tempos de incubação dos três isolamentos.

Fungos	Tempo de incubação (dias)	$10^{-2} \times$ Peso seco (mg/ml)	Açúcares totais (mg/ml)
UA.1.12	7	68.5	2.7
	14	67.9	2.6
	21	45.0	2.8
	28	31.8	3.0
UA.4.2	7	53.1	2.4
	14	44.5	2.7
	21	61.3	2.5
	28	68.2	2.8
UA.5.4	7	51.7	2.5
	14	43.4	3.2
	21	34.3	3.0
	28	56.1	2.5

4-CONCLUSÃO

As características celulolíticas destes isolamentos, bem como a sua capacidade de produzirem elevadas quantidades de biomassa fúngica torna estes isolamentos atractivos candidatos para um melhor aprofundamento das suas capacidades hidrolíticas em relação à celulose e para uma identificação taxonómica.

5-REFERÊNCIAS

- Barnett C. C., Berka R. M. e Fowler T. (1991). Cloning and amplification of the gene encoding an extracellular β -glucosidase from *Trichoderma reesei*: evidence for improved rates of saccharification of cellulosic substrates. *Bio/Technology*, 9, 562-567
- Dubois M., Gilles K. A., Hamilton J. K., Rebers P. A. e Smith F. (1956). Colorimetric method for determination of sugar and related substances. *Analytical Chemistry*, 28, 350-356
- Fujii M., Homma T., Ooshima K. e Taniguchi M. (1991). A kinetic model of the synergism of endo- and exoglucanase and β -glucosidase on hydrolysis of cellulose. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 28/29, 145-156
- Garg S. K. e Neelakantan S. (1982). Production of SPC and cellulase by *Aspergillus terreus* from bagasse substrate. *Biotechnology and Bioengineering*, 24, 2407-2417
- Hecht V., Schugerl K. e Scheiding W. (1982). Conversion of cellulose into fungal cell mass. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, 16, 219-222
- Lima N. (1989). *Estudo de fungos celulolíticos - Isolamento, rastreio e caracterização*. Universidade do Minho, Braga
- Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L. e Randall R. J. (1951). Protein measurements with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193, 256-275
- Mandels M., Andreotti R. e Roche C. (1976). Measurement of saccharifying cellulase. *Biotechnology and Bioengineering Symposium*, 6, 21-33
- Ryu D. D. Y. e Mandels M. (1980). Cellulases: biosynthesis and applications. *Enzyme and Microbial Technology*, 2, 91-102
- Sternberg D. (1976). Production of cellulase by *Trichoderma*. *Biotechnology and Bioengineering Symposium*, 6, 35-53
- Sumner J. B. e Somers G. F. (1944). *Laboratory Experiments in Biological Chemistry*. Academic Press, Nova Iorque
- Wood T. M. (1968). Cellulolytic enzyme system of *Trichoderma koningii*: separation of components attacking native cotton. *Biochemical Journal*, 109, 217-227

ISBN: 972-569-022-2
Depósito Legal nº: 51 765/91

Ficha técnica:

Responsável pela edição: Eng^o António José Cardoso
Desenho da capa: Arq^o Pompílio Souto
Composição: Vítor Duarte
Secção de offset:
Fotografia: Adelino Bandeira
Paginação e Montagem: Adelino Bandeira
Transporte: Henrique Taborda
Impressão: Joaquim Felício

Nota explicativa:

Esta publicação contém as comunicações apresentadas na
3ª Conferência Nacional sobre a Qualidade do Ambiente,
realizada na Universidade de Aveiro, de 5 a 7 de Fevereiro de 1992.

Edição da:

COMISSÃO DE COORDENAÇÃO DÁ REGIÃO CENTRO
(CCRC)
R. Bernardim Ribeiro, 80 3000 Coimbra
Telefone: (039) 404044/59/71 Telex: 52185 Fax: (039) 723757

Impresso na Secção de Offset
da Comissão de Coordenação da Região Centro

Janeiro de 1992

Tiragem: 800 exemplares



MINISTÉRIO DO PLANEAMENTO E DA ADMINISTRAÇÃO DO TERRITÓRIO
COMISSÃO DE COORDENAÇÃO DA REGIÃO CENTRO

**3^a CONFERÊNCIA NACIONAL
SOBRE A
QUALIDADE DO AMBIENTE**

Volume II

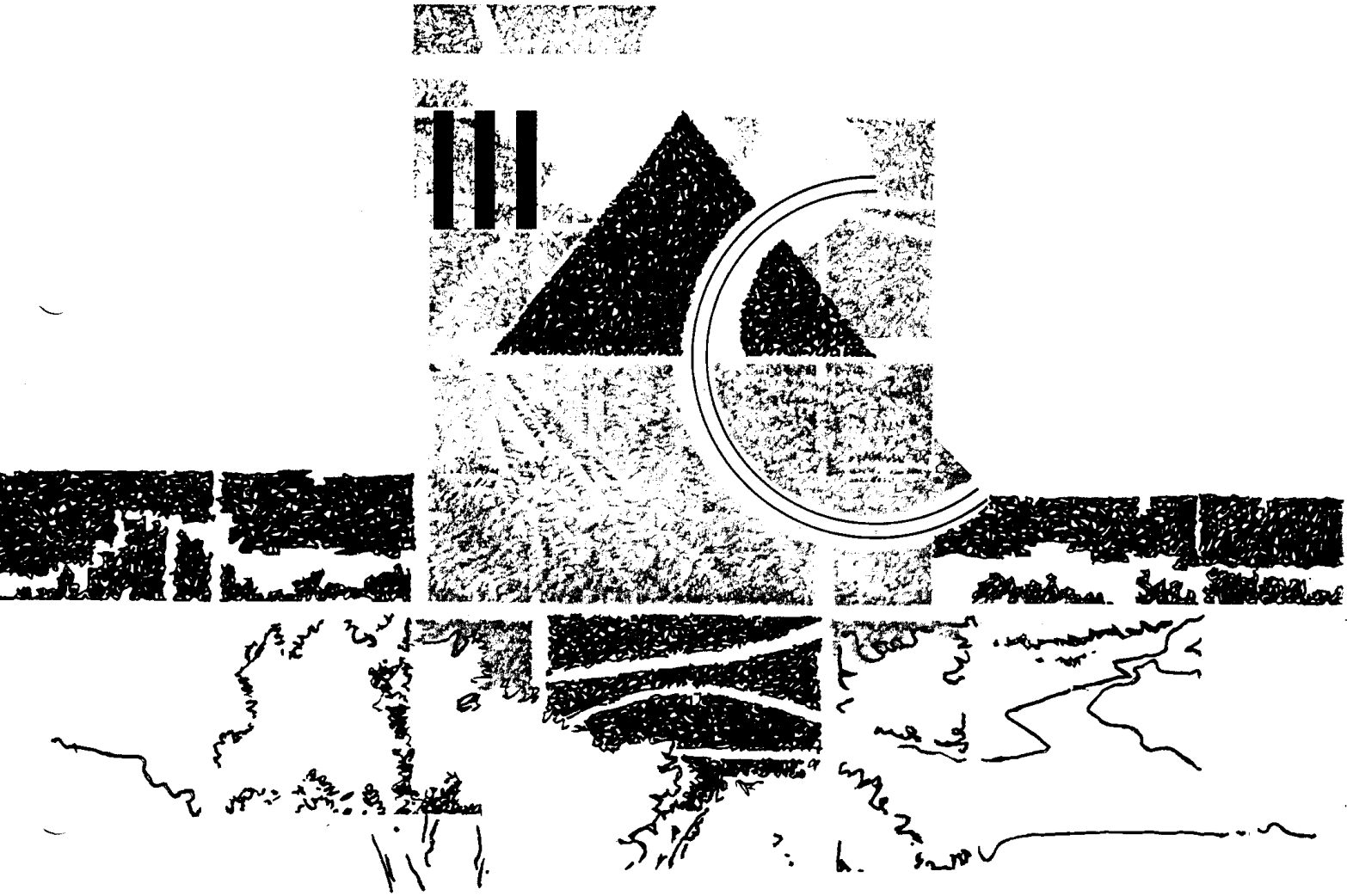
EDITORES: A.Rosa Pires, C.Pio, C.Boia & T.Nogueira

Universidade de Aveiro, 5 a 7 de Fevereiro de 1992



5/7 FEV 92

UNIVERSIDADE DE AVEIRO



CONFERÊNCIA NACIONAL

SOBRE A QUALIDADE DO

AMBIENTE

5/7 FEV 92

Amig