

OBTENÇÃO DE UM FUNGO COM ALTO PODER HIDROLÍTICO SOBRE BAGAÇO DE CANA PRÉ TRATADO

L.S.S. Vitti ¹
D.M. Silva ²
D.M.S.S. Vitti ¹

INTRODUÇÃO

A celulose e derivados constituem uma fonte relevante de energia acumulada pelos vegetais que pode ser utilizada para o atendimento das necessidades humanas como alimentação, produção de combustíveis, produtos químicos e solventes.

No Brasil são obtidos diversos subprodutos e resíduos celulósicos que após prévia hidrólise e fermentação poderiam gerar produtos de alto interesse agrícola ou industrial. Portanto pesquisas visando a obtenção de enzimas celulolíticas vêm sendo realizadas em inúmeros laboratórios com o objetivo de obter hidrólise enzimática bastante eficiente de subprodutos agrícolas. A fim de se encontrar fungos com alta capacidade celulolítica um "screening" entre diversas espécies de fungos foi realizado no laboratório de Fitovirologia e Microscopia do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA-USP).

Este programa de pesquisa foi desenvolvido visando especialmente encontrar fungos com alto nível celulolítico capazes de hidrolisar bagaço de cana com tratamento prévio.

¹ Centro de Energia Nuclear na Agricultura, USP, Piracicaba

² Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", USP, Piracicaba.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Resultados obtidos por inúmeros pesquisadores justificam uma contínua pesquisa de novas fontes de enzimas celulolíticas entre os microrganismos.

MANDELS & WEBER, em GOULD (1969) compararam diversos fungos com relação à atividade celulolítica, sendo que entre eles *Trichoderma viride* QM6a foi o melhor produtor de um complexo estável da celulose.

MENEZES *et alii* (1976) compararam a atividade celulolítica entre cinquenta e uma linhagens de microrganismos. Os filtrados das culturas de três linhagens de fungos, duas de basidiomiceto e uma não identificada, apresentaram elevada atividade Cx. Como indutores de celulase foram utilizados carboximetilcelulose, papel de filtro e três resíduos agroindustriais. Dentre eles o bagaço de cana proporcionou maior rendimento seguido de carboximetilcelulose e papel de filtro.

Em trabalho posterior, MENEZES *et alii* (1976) verificaram que entre diversas linhagens de fungos isolados, produtores de celulase, o basidiomiceto 50F mostrou ser uma boa fonte do complexo celulolítico Cl-Cx, comparável ao obtido por linhagens altamente produtivas de *Trichoderma viride*.

STERNBERG *et alii* (1977) fizeram um "screening" para selecionar um microrganismo com produção relativamente alta de β -glicosídase. Das duzentas linhagens de fungos e quinze de bactérias testadas, os organismos mais promissores foram *Aspergillus niger* QM 877 e *A. phoenicis* QM 329.

PYE *et alii* (1977) testaram a produção de enzimas celulolíticas em doze culturas de fungos pertencentes aos gêneros *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Chaetomium*, *Stachybotrys* e *Hypocrea*, sendo que todos foram capazes de degradar xilano, avicel e carboximetilcelulose.

GINTEROVÁ *et alii* (1981) verificaram a produção de celulases em quatro culturas de fungos superiores (*Agrocybe cylindracea*, *Lentinus tigrinus*, *Pleurotus ostreatus* e *Ramaria formosa*), cultivados em vários substratos sob diferentes condições. Entre os fungos testados *L. tigrinus* foi o melhor produtor de enzimas celulolíticas.

SADLER (1982) fez uma comparação entre cem linhagens de fungos da podridão da madeira quanto à produção

de celulases extracelulares. *Trichoderma viride* E 58 demonstrou uma maior hidrólise em carboximetilcelulose e celulose ácida.

WASE & VAID (1983) fizeram um "screening" entre diversos isolados de microrganismos e entre eles obtiveram uma linhagem com alta capacidade celulolítica sendo descrito como um *Aspergillus fumigatus*.

MATERIAIS E MÉTODOS

Quatorze linhagens de fungos foram testados quanto sua capacidade para degradar bagaço de cana, sendo eles cinco fungos isolados de bagaço de cana, denominados com a sigla Bg mais os números 1,2,3,4,5, um Hymenomiceto, *Phellinus gilvus*, *Lenzites trabea*, *Fomes conatus*, *Trichoderma lignorum*, *T. reesei* QM 9414, *Lentinus edodes*, *Chaetomium* sp. e um isolado denominado F₂.

O meio básico líquido utilizado para a produção do complexo celulolítico foi composto por NaNO₃, 2,0g; KH₂PO₂ 2,0g; KCl 0,5g; MgSO₄.7H₂O 0,5g; FeSO₄.7H₂O 0,01 g; proteose peptona 1,0g; uréia 0,3g; extrato de levedura 1,0g; Tween 80 1ml; bagaço de cana tratado 1,0g; água destilada 1.000 ml.

O inóculo consistiu de micélio o qual foi inoculado no meio básico líquido e incubado por 6 dias em agitador rotativo a 30°C. As culturas foram filtradas separando-se a parte líquida do micélio. O filtrado foi liofilizado e utilizado como extrato enzimático. O micélio foi tratado e o extrato obtido testado quanto a atividade enzimática.

A avaliação da atividade enzimática foi feita usando bagaço de cana tratado por processos físicos como substrato e os açúcares redutores formados após a hidrólise foram determinados pelo método do ácido dinitro salicílico (DNS), segundo MILLER (1959).

Proteína foi determinada pelo método de Kjeldahl, sendo que a porcentagem de proteína bruta foi dada pelo produto nitrogênio X6,25.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A seguir foram reunidos em uma tabela os valores das atividades celulolíticas expressas em termos de açúcares por miligrama de proteína dos fungos investigados. No quadro 1 constam as atividades celulolíticas encontradas no meio de cultura e no micélio de cada microrganismo.

QUADRO 1 - Relação dos fungos estudados como fonte de ên zimos do complexo celulolítico e atividades es pecíficas no meio de cultura e micélio.

Fonte de <u>ên</u> zimo	Meio de cultura	Micélio
	Atividade <u>es</u> pecífica	
<i>T. reesei</i>	162,01	5,75
Bg 1	32,43	3,16
Bg 2	160,76	45,03
Bg 3	11,24	3,46
Bg 4	17,90	3,69
Bg 5	165,61	23,96
<i>Chaetomium</i> sp.	17,97	7,52
<i>Fomes conatus</i>	27,80	9,45
F2	31,91	3,18
<i>Lentinus edodes</i>	18,45	4,04
<i>Lenzites trabea</i>	28,37	15,04
<i>T. lignorum</i>	26,52	5,55
Hymenoceto	50,20	21,77
<i>P. gilvus</i>	48,59	9,09

Atividade específica = $AR \times 10^2$ mg/mg de proteína
AR = açúcares redutores formados.

Utilizando como substrato para o ênzimo bagaço de cana, os fungos Bg2 e Bg5 apresentaram atividade específica extracelular semelhantes *T. reesei* QM414, fungo este considerado padrão em muitos trabalhos com igual objetivo.

Os fungos Bg2 e Bg5 apresentaram atividade intracelular superior aos demais fungos testados, inclusive a do *T. reesei* QM 9414.

Estudos a respeito dos fungos Bg2 e Bg5 estão sendo realizados com o objetivo de melhorar a produção do complexo celulolítico. Dentro dessa meta há também especial interesse em pesquisas melhor as atividades dos componentes do sistema celulolítico dos micélios bem como a viabilidade de incorporação dos mesmos junto ao sistema enzimático liberado no meio de cultura.

Como pode ser observado as atividades específicas dos enzimas intracelulares dos fungos Bg2 e Bg5 são em geral comparáveis às atividades dos enzimas encontrados no meio de cultura dos demais fungos.

SUMMARY

This paper deals with investigations about cellulolytic activities of 14 fungus on sugar cane bagass.

The activities are expressed as mg of reducing sugar by mg of fungus protein (specific activity).

The results obtained based on specific activity showed that the isolated fungus Bg2 and Bg5 have practically the same as the *T. reesei* QM 9414, this one with cellulolytic activity considered standard by several authors.

LITERATURA CITADA

- GINTEROVÁ, A., O. JANOTKOVÁ & L. FINDOVÁ, 1981. Effect of cultivation conditions on cellulase activity of higher fungi. *Folia Microbiol.* 26(2): 133-136.
- MANDELS, M. & WEBER, 1969. The production of cellulases, in GOULD, R.F. Cellulases and their applications. *Advances in chemistry*, series 95, American Chemical Society, Washington, D.C., 391-414.
- MENEZES, T.J.B., P.R. DE LAMO & T. ARAKAKI, 1976. Isolamento e seleção de microrganismos produtores de celulase. *Col. Ital* 7: 83-90.
- MENEZES, T.J.B., T. ARAKAKI & P.R. DE LAMO, 1976. Produção do complexo celulolítico Cl-Cx por microrganismos. *Col. Ital* 8: 91-96.

- MILLER, G.L., 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. **Anal. Chem.** 31(3): 426-428.
- PYE, R.A. FICCHTER & E. GALÁS, 1977. The production of cellulolytic enzymes by fungal cultures. **Eur. J. Microbiol.** 4: 151-158.
- SADLER, J.N., 1982. Screening of highly cellulolytic fungi and the action of their cellulase enzyme systems. **Enzyme Microbiol Technol.** 4(6): 414-418.
- STENBERG, D., VIJAYAKUMAR & E.T. REESE, 1977. β -glucosidase: Microbial production and effect on enzymatic hydrolysis of cellulose. **Can. J. Microbiol.** 33: 130-147.
- WASE, D.A.J. & A.K. VAID, 1983. Isolation and mutation of a highly cellyolytic strain of *Aspergillus fumigatus*. **Process. Biochem.** 18(6): 35-37.

AGRADECIMENTOS

A srta. Márcia Cristina da Silva e aos Srs. José Elias Gomes e José Cleto da Silva F^o, pelo auxílio na execução de parte prática deste trabalho.