ISOLAMENTO E BIOLOGIA DE NOVOS FUNGOS CELULOLÍTICOS

APARECIDO OSDIMIR BERTOLIN

Orientador: Prof. Dr. JOÃO LÚCIO DE AZEVEDO

Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Agronomia. Área de Concentração: Microbiologia Agrícola.

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Setembro - 1987

À Maria Carōlina,
ao Pedro Augusto,
aos meus pais e amigos

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Manifestamos sinceros agradecimentos a todos aqueles que contribuíram para a realização deste trabalho, especialmente:

- Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo;
- Profª Drª Aline Pizzirani Kleiner;
- Prof. Dr. Flávio C. Almeida Tavares;
- Prof. Dr. Sérgio Echeverrigaray Laguna;
- MS. Maria José Vallerini;
- Coordenadores do Curso de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola;
- Funcionários do Laboratório: Antonio Rocha Campos, Luiz Prospero, Sandra Elisabete Rocha Campos e Carlos Alberto Nolasco;
- Funcionários do Departamento de Genética;
- Colegas do Curso de Pós-Graduação.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização do presente trabalho.

ÍNDICE

	<u>página</u>
RESUMO	v
SUMMARY	vii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	5
3. MATERIAL E MÉTODOS	17
3.1. Material	17
3.2. Métodos	25
4. RESULTADOS	31
4.1. Origem do material e caracterização morfológica dos isolados	31
4.2. Dosagem comparativa da produção de celuloses totais	31
4.3. Ensaio do crescimento dos fungos em diferentes meios e diferentes temperaturas	34
4.4. Produção de esporos	34
4.5. Estudos citológicos	34
4.6. Dosagem da atividade enzimática	42
5. DISCUSSÃO	47
6. CONCLUSÕES	53
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54

ISOLAMENTO E BIOLOGIA DE NOVOS FUNGOS CELULOLÍTICOS

Autor: APARECIDO OSDIMIR BERTOLIN

Orientador: Prof. Dr. JOÃO LÚCIO DE AZEVEDO

RESUMO

Para viabilizar o aproveitamento da celulose, é necessário sua hidrólise obtendo-se resíduos de glicose; esta hidrólise pode ser ácida ou enzimática. A hidrólise enzimática apresenta algumas vantagens sobre a ácida, embora microrganismos utilizados até agora não sejam extremamente eficientes na produção de celulasas. Com o interesse de explorar melhor a nossa microbiota, o presente trabalho se propôs à busca de fungos com alta capacidade de hidrolisar celulose, isolados a partir de duas regiões geográficas diferentes. Foram assim obtidos 20 isolados que foram analisados e comparados com um padrão o *Trichoderma reesei* QM 9414 considerado como alto produtor de celulasas. Foi feito um estudo de aspectos biológicos dos 20 isolados, fixando assim bons parâmetros para estudos posteriores no tocante a classificação e melhoramento genético destes isolados. Especial-

mente um dos isolados classificado como **Trichoderma pseudo coningii** foi considerado promissor por apresentar uma alta taxa de produção de celulasas além de apresentar outras características favoráveis para futuros estudos de genética e melhoramento.

ISOLATION AND BIOLOGY OF NEW CELLULOLYTIC FUNGI

Author: APARECIDO OSDIMIR BERTOLIN

Adviser: Prof. Dr. JOÃO LÚCIO DE AZEVEDO

SUMMARY

For better uses for cellulose it must be partitioned into glucose residues and this can be done by the acid or by enzymatic hydrolysis. Some advantages can be pointed out in using the enzymatic process although strains of microorganisms used until now can still be improved to produce higher amounts of cellulases. The main goal of this work was to explore our microbiota aiming to find out new fungi with high ability in breaking down cellulose. Two different geographic regions were selected and from them 20 isolates were obtained and tested. *Trichoderma reesei* QM 9414 was used as a standard for comparing the performance of the isolated fungi strains. Morphological and biological parameters were established for the 20 strains providing information for future classification and genetic improvement programs. One of the isolates classified as

Trichoderma pseudo coningii, was shown to be the most promising one giving high rates of cellulases production; it also presented favorable characteristics for genetic and breeding studies.

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos dez anos, a preocupação dos pesquisadores e líderes do governo, na utilização de compostos orgânicos como matéria prima para a produção de alimentos, energia e produtos químicos, que possam substituir total ou parcialmente as fontes fósseis, tem sido cuidadosamente observada (GHOSE et alii, 1979).

A constatação de que a energia fotossintética, que é renovável, rende anualmente uma produção de biomassa em torno de $1,46 \times 10^9$ toneladas (NYSTRON et alii, 1975), fez com que a sua utilização fosse melhor explorada. Os compostos orgânicos obtidos pela fotossíntese são decompostos pela natureza lentamente, e ressintetizados num ciclo periódico; ao contrário, os compostos de origens fósseis são esgotáveis, não se renovam facilmente na natureza, e os períodos

para sua nova formação não podem ser estimados em anos, e sim em Eras.

A celulose compreende cerca de 2/3 de toda a matéria orgânica existente sobre a terra, e acredita-se que a produção anual de celulose atinja a casa de 100 bilhões de toneladas, o que corresponderia a 70 kg de celulose/dia/habitante do Planeta (SPANO *et alii*, 1975; RYU, 1980). A produção de biomassa é provavelmente um dos mais eficientes métodos para se aprisionar a energia solar (RYU, 1980 e GHOSE *et alii*, 1979).

Considerando que a composição do resíduo celulósico seja: 40 - 45% de celulose, 20 - 30% de hemicelulose, e 40 - 25% de lignina, acredita-se que a perda anual destes resíduos sejam aproximadamente $4,4 \times 10^8$ toneladas de celulose, $3,0 \times 10^8$ toneladas de hemicelulose e $2,5 \times 10^8$ toneladas de lignina (STUPIELO, 1980).

Tanto a celulose como a hemicelulose podem ser convertidas por hidrólise em produtos solúveis (glicose, glicose, manose e xilose, respectivamente); esta hidrólise pode ser ácida ou enzimática (CARVALHO, 1983).

Nos processos de hidrólise ácida, a técnica de utilização do ácido sulfúrico já está superada e novas técnicas estão sendo exploradas, evitando-se a degradação do produto final (glicose). Além disso, estes ácidos interagem

com materiais não celulósicos, celulosas imperfeitas (cruas) e corroem os equipamentos, resultando assim em baixo rendimento, impureza no xarope, alto custo na implantação de uma usina e riscos de acidentes para os trabalhadores.

Para superar esses problemas busca-se, atualmente, a valorização da hidrólise microbiológica ou enzimática. Para tanto, existe a necessidade de se explorar a nossa microbiota, para se obter microrganismos capazes de degradação destes materiais, ou de alta produção das enzimas do complexo celulósico capaz de fazê-lo, e isto depende do desenvolvimento de processos tecnológicos e econômicos. A hidrólise enzimática ou microbiológica se sobrepõe à ácida, pois, os produtos finais são de baixo peso molecular semelhantes a hexoses ou pentoses. Portanto, a bioconversão ou a conversão química destes produtos pode ser feita e seus produtos usados como combustíveis, alimentos químicos e alimentos propriamente ditos.

Os estudos da conversão microbiológica ou enzimática são recentes e, pode-se dizer que se iniciaram a partir da mudança dos enfoques das pesquisas do U.S. Army Natick Development Center, que deixou de combater os microrganismos decompositores de materiais celulósicos, passando a utilizar o seu potencial para a produção de glicose a partir desses resíduos. Este enfoque foi prontamente percebido pelos líderes de governo e administradores de financiadoras de

pesquisas acadêmicas e industriais; hoje o mundo inteiro tenta utilizar esta técnica e tirar proveito dela.

O presente trabalho objetivou isolamento, seleção, estudos biológicos e fisiológicos de fungos celulolíticos de ocorrência em "habitats" diversos com vistas ao melhoramento para produção de celulases.

2. REVISÃO DE LITERATURA

Para uma possível solução dos nossos problemas de recursos energéticos, químicos e alimentos, a celulose surge como uma das únicas fontes renováveis de carbono e é disponível em grande quantidade. O total de carbono fixado pela fotossíntese usando energia solar é enorme, podendo-se dizer que, quase metade disto está na forma de celulose, o mais eficiente método de se aprisionar energia solar (GHOSE et alii, 1979).

Por se tratar de um polímero linear de glicose, composto por unidades anidroglicosídicas, unidas por ligações do tipo β 1-4 a celulose pode ser utilizada na produção de alimentos, produtos químicos ou fermentação alcoólica, mas para isso ela precisa ser hidrolisada.

As formas de hidrólise mais comumente utilizadas são: o processo ácido e o enzimático. O processo ácido possui a vantagem de ser mais rápido, isto quando se usam ácidos diluídos a altas temperaturas. Este processo, porém, é muito oneroso, pois os equipamentos são caros, gasta-se muita energia e o rendimento é baixo (cerca de 50 - 70% do valor teórico), além do que, durante a hidrólise são formados produtos com menos de seis carbonos, que inibem o processo, interações do ácido com material não celulósico, corrosão do equipamento e impurezas no xarope (RYU, 1980 e GHOSE et alii, 1979).

Por sua vez, a hidrólise microbiológica ou enzimática é um processo mais demorado (24-48 horas), embora seu rendimento seja mais alto, cerca de 85-90% do valor teórico. Este processo é conduzido a baixa temperatura e pressão, e a especificidade das enzimas para com a molécula de celulose produz apenas glicose como produto final (WRIGHT, 1983 e CARVALHO, 1983).

Após publicações dos trabalhos do Dr. Elwyn Reese e colaboradores em 1950, os pesquisadores tem dado grande impulso na criação de uma indústria utilizando hidrólise microbiológica ou enzimática. Muitos processos têm sido desenvolvidos no sentido de um melhor aproveitamento dos resíduos celulósicos, onde se procura avaliar os recursos florestais, que até então não eram utilizados, tais como: as sobras das madeiras de grandes florestas, resíduos de indústrias flo

restais, restos de papéis, lixos urbanos, etc.

Todos estes resíduos contêm elevadas taxas de celulose, hemicelulose, lignina e compostos orgânicos, que também podem ser aproveitados. Infelizmente, o alto custo de uma produção enzimática em alta escala, de uma tecnologia desenvolvida para selecionar resíduos, e o próprio interesse da indústria nesta produção fazem com que o processo, no momento, seja economicamente desvantajoso na maioria dos casos.

Resse e colaboradores após muitos anos de pesquisa concluíram que a celulase não é uma enzima única, mas sim um complexo enzimático que atua sinergisticamente, e que alguns microrganismos eram capazes de degradar vários tipos de celulose, enquanto outros não possuíam esta capacidade. Foi também verificado por este grupo de pesquisadores que as enzimas eram secretadas por alguns microrganismos de forma intracelular e por outros de modo extracelular; também foi observado que a celulose pode existir em duas formas básicas: cristalina (altamente organizada e protegida por lignina) e na forma amorfa (menos organizada).

As enzimas do complexo celololítico são sintetizadas por fungos, actinomicetos e bactérias. De uma grande seleção de microrganismos, feita no Natick Laboratórios (REESE, 1976) o *Trichoderma* foi apontado como um fungo capaz

de produzir um complexo celulolítico balanceado e ativo, e que se caracterizava pela produção de enzimas extracelulares. Muitas outras espécies têm a atividade celulásica, mas não produzem níveis adequados de enzimas extracelulares para o uso prático, nem para hidrólise extensiva de altas concentrações de celulose. Vários trabalhos têm sido publicados relacionando a prática da sacarificação utilizando *Penicillium*, *Sclerotium rolfssii* (SCHEWALE et alii, 1979) e *Thermonospora* (Ferchak et alii citados por RYU, 1980), mas a maior parte dos trabalhos envolve celulasas do *T. viride* (TOYAMA et alii, 1976 e 1977) ou *T. reesei* (ANDREN et alii, 1976; BRANDT et alii, 1973; GHOSE et alii, 1969; GHOSE et alii, 1972 e HOWEELL et alii, 1975). Outras espécies de *Trichoderma*, tais como *T. lignorum* e *T. komingii* são produtores de celulasas ativas. Através do melhoramento genético de *Trichoderma*, foram obtidos os mutantes QM 9123, QM 9414 (MANDELS, 1975), MCG 77 (GALLO et alii, 1979) e Rutgers C30 e NTG 14 (MONTENECOURT et alii, 1977); eles são todos derivados da linhagem QM, que originalmente caracterizava-se ser *T. viride* e, hoje, esta espécie é reconhecida como uma nova espécie, o *T. reesei*.

Muitos processos, para uma melhor utilização das enzimas celulolíticas, têm sido estudados, com atenção voltada para a otimização nos processos fermentativos e na produção das enzimas (BROWN et alii, 1975; ANDREOTTI et

alii, 1977: BERNAT et alii, 1977; MANDELS et alii, 1969; SATTAROVA et alii, 1972 e STERNBERG, 1979), assim como avaliação dos substratos para esta produção; estes substratos podem ser resíduos da agricultura (DEMAIN, 1972; FERRER et alii, 1977 e Martinez et alii, 1974, citado por RYU, 1980), substratos solúveis, que possuem altos níveis de celulose (SKINNER et alii, 1978), hemicelulose (JANICKI, 1976). O efeito da assimilação da amônia (STERNBERG et alii, 1979) na produção das enzimas também tem sido examinado.

Quanto a forma de cultura, tanto a cultura sólida quanto a semi-sólida têm sido usadas produzindo enzimas com boas atividades e em grande quantidade (TOYAMA et alii, 1976 e VILELLA et alii, 1977). Alguns pesquisadores têm explorado o sistema de cultura contínua para efetuar estudos da fisiologia (RYU et alii, no prelo) cinética do crescimento (BROWN et alii, 1977), reações enzimáticas (PEITERSEN, 1977), produtividade pela luz (MITRA et alii, 1975).

A análise enzimática tornou-se complicada desde que se observou uma multiplicidade das enzimas e dos substratos. A celobiase (β -glucosidase) é medida por hidrólise de celobiose ou aril- β -glucosídeos tais como P-nitrofenil- β -D-glicosídeo (PNPG) ou salicina; as atividades de endo e exoglucanase são expressas de acordo com o substrato, que pode ser carboximetilcelulase (endoglucanase), avicel (exo-

glucanase), celulose de algodão, celulose de papel de filtro, etc.. Quando se trata de trabalho quantitativo, deve-se expressar a atividade em Unidades Internacionais (UI) (REESE, 1976).

As atividades específicas das enzimas são baixas; pode-se dizer que para a CMCase é de cerca de 10-25 Unidades/mg de proteína, cerca de 0,6 Unidades/mg para papel de filtro e 0,02 Unidades/mg para o algodão. Os dados acima são baseados na produção e redução de açúcares (glicose), pelo método de DNS (MANDELS et alii, 1975).

Outro método para se dosar CMCase (endoglucanase) pode ser pela viscosidade da CMCase (WOOD et alii, 1978), este método é muito sensível, pois a quebra ao acaso de uma cadeia de celulose pode reduzir a viscosidade para cerca de 50%, mas não proporciona um aumento nos grupos redutores. Muitos trabalhos têm sido publicados onde a preocupação central é melhorar a sensibilidade dos métodos, para se obter um resultado mais confiável e menos complexo (HUANG et alii, 1975; MONTENECOURT et alii, 1978 e LEISOLA et alii, 1978).

Concomitantemente, grandes esforços têm sido feitos no sentido de se obter novos microrganismos e/ou mutantes dos já existentes que produzam altas concentrações das enzimas, ou que sejam promissores para um estudo detalhado

de como estas ocorrem e como isto poderia ser melhorado.

Alguns mutantes do *T. reesei* para alta produção foram obtidos por GALLO et alii (1979) e MONTENECOURT et alii (1977). Também actinomicetos termofílicos foram estudados por ROMANELLI et alii (1975), STUTZENBERGER (1971) e WOOD et alii (1975), e também leveduras com esta capacidade foram isoladas.

A cinética da hidrólise tem sido estudada usando-se parâmetros como absorção da enzima (WILKE et alii, 1975; HUANG, 1975 e MANDELS et alii, 1971), mecanismo da reação (GHOSE, 1979), inibição do processo enzimático (HOWELL et alii, 1975), desativação do complexo enzimático (HOWELL et alii, 1978), concentração do substrato e da enzima (HUANG, 1975).

A hidrólise enzimática foi 1º estudada por REESE et alii (1950), que denominou as enzimas como C_1 e C_x , onde C_1 seria o componente pré-hidrolítico, que formaria as cadeias menores de carboidratos a partir da celulose nativa; estas cadeias seriam então hidrolisadas pela enzima C_x , que hidrolisaria derivados solúveis de celulose. Entretanto, ERICKSON et alii (1972) isolaram uma enzima semelhante a C_1 de *S. pulverulentum* que hidrolisava as extremidades da cadeia de celulose onde eram liberadas moléculas de glucose e celobiose.

Aprimoramentos de técnicas e melhor atenção por parte dos pesquisadores, fizeram com que eles demonstrassem que existem três tipos de enzimas relacionadas com a hidrólise da celulose (WOOD et alii, 1980) e estas são: Endo-1,4.β-glucanase (Endo 1,4-β-D-glucan-4-glicanohidrolase, EC. 3.2.14); Celobiohidrolase (1,4-β-D-glucan celobiohidrolase, EC.3.2.1.91.) e β-glicosídae (EC.3.2.121).

Endo-1,4-glucanase é uma enzima que hidrolisa as cadeias ao acaso, resultando numa redução rápida do comprimento da cadeia ou no grau de polimerização junto com um lento aumento nos grupos de redução. A configuração β-glicose é conservada e o produto final é uma mistura de glicose e celobiose. Exo-1,4.β-glucanase é uma enzima que remove unidades de glucose ou celobiose das extremidades não redutoras das cadeias, o que resulta num aumento nos grupos redutores, acompanhado de pouca mudança na fluidez.

As endoglucanases atacam derivados de celulose tais como CMC, mas não atacam a forma cristalina; celobiohidrolase age tanto nas formas cristalina quanto na amorfa. Estas enzimas são incapazes de atacarem derivados de celulose.

Por sua vez, celobiose ou β-glicosídases agem sobre celodextrina e o produto final pode ser determinado pelos métodos de D.Nitro-salicílico (DNS) ou Somogyi e Nelson (WOOD et alii, 1972).

Estudos mais detalhados sobre os componentes enzimáticos do sistema celulolítico mostram multiplicidade nos componentes do sistema enzimático. A natureza e origem destas diferentes formas com atividades semelhantes se encontram muito bem estudada. NAKAYAMA et alii (1976) e GONG et alii (1977), propõem explicações para esta multiplicidade e afirmam que pode ser um processo genético transducional, por ação de protease ou pelo processo de glicosilações da cadeia polipeptídica, que servem para proteção das proteínas na sua atividade extracelular (GUM et alii, 1977; WILLICK et alii, 1985 e SPREY et alii, 1984).

BERGHEN et alii (1976) purificaram duas das quatro exoglucanases encontradas em *T. reesei* e verificaram que elas apresentavam uma baixa atividade em celulose nativa, embora fossem capazes de formar fibras livres em substratos como papel de filtro.

Outros estudos sobre heterogeneidade foram feitos e demonstraram ser muito úteis para se elucidar os estudos, pois em *Trichoderma koningi* foram encontrados 10 componentes do complexo celulolítico, sendo duas celobiohidrolases, duas β -glicosidases e seis endoglucanases (WOOD & McCRAE, 1978); também foram isolados de outros microrganismos como *Sclerotium pulverulentum* (ERICKSSON, 1981), *Penicillium funiculosum* (WOOD et alii, 1980), *P. emersoni* (McCHALE & COUGHLAN, 1981) e *Schizophyllum commune*

(WILLICK et alii, 1984).

As enzimas do complexo celulolítico atuam de modo cooperativo sobre a celulose e, segundo estudos feitos por WOOD (1975), existe uma relação de estequiometria entre a quantidade de endoglucanase e exoglucanase para se ter uma maior atividade.

Vários autores como JIRESOVA et alii (1983), FUSEE et alii (1972) e HERR (1979), estudaram o controle do sistema celulolítico e concluíram que ele sofre tanto controle genético quanto bioquímico. Observaram também que a síntese das enzimas é controlada pelos mecanismos de indução e repressão catabólica; tais mecanismos foram discutidos em outros sistemas enzimáticos.

Inumeras fontes de carbono foram ensaiadas para se obter o melhor indutor para as enzimas e, a celulose tem sido reconhecida como o melhor indutor do complexo enzimático (MANDELS, 1975 e WILLIK et alii, 1984). Outros indutores ensaiados incluem a sofrorose (2-0- β -D-glicopiranosil - D-glicose), um dissacarídeo que ocorre como impureza na glicose comercial e a lactose (MANDELS, 1975). A celulose, cellobiose e a lactose só se tornam efetivas na indução em altas concentrações, já a sofrorose é ativa a baixa concentração (STERNBERG et alii, 1979).

Ainda não se conseguiu um indutor natural que não reprima a biossíntese de celulasas e, a repressão ocorre por um catabólico da glicose; quando adiciona-se glicose na cultura onde ocorre a biossíntese das enzimas, ela é cessada imediatamente, até que a glucose seja exaurida do meio ou que a concentração atinja um nível abaixo do crítico que é aproximadamente de 0,1 mg/ml (GALLO et alii, 1979).

As enzimas produzidas por *T. reesei* com celULOse ou lactose como fonte única de carbono, são tidas como um completo e bem balanceado complexo celulósico, visto que outras fontes não o fazem (STERNBERG et alii, 1979).

NIZIZAWA et alii (1971), acreditam que a repressão catabólica da biossíntese de celulase indutivas ocorrem a nível de transcrição, baseados nos seus estudos com actidiona D e puromicina, usando aminoácidos marcados. STERNBERG et alii (1980) estudou o papel da soforose na produção das enzimas do complexo celulolítico e afirmaram que a soforose tem dois papéis regulatórios na produção das enzimas em *T. reesei*, um é a repressão de β -glucosidase e o outro é a indução de endo e exoglucanase.

A estabilidade da enzima é muito grande e, testes quanto à temperatura indicaram que as enzimas do *T. reesei* são estáveis a 50°C, podendo ser guardadas refrigeradas, congeladas, liofilizadas ou precipitadas por acetona ou

etanol, não alterando a sua atividade, por muitos anos.

A criação de uma indústria para produção em alta escala dos componentes celulíticos ainda apresentam grandes problemas, tais como, investimento alto na produção industrial, produção não eficiente de enzimas, falta de financiamento de pesquisas nesta área e falta de visão para o futuro dos empresários do ramo.

Para tanto, a necessidade de se buscar novos microrganismos ou explorar melhor a nossa microbiota, será uma forma de se obter os elementos básicos de perspectivas de utilização do sistema no nosso País. A partir de microrganismos potenciais na produção destas enzimas, a sequência de eventos para o seu melhor aproveitamento e o seu melhoramento genético se desencadeará facilmente. Além disso, pelo fato de ser o Brasil um País tropical e possuidor de grandes reservas florestais, presume-se que haja-facilidade de, em ambientes apropriados para o isolamento de novas linhagens, que sejam superiores, às utilizadas normalmente.

3. MATERIAL E METODOS

3.1. Material

3.1.1. Trichoderma reesei QM9414 (U.S. Army Natick Research and Development Center Conard, Massachusetts, USA)

3.1.2. Meio de enriquecimento e isolamento de microrganismos celulolíticos (AARONSON, 1970) (MM)

Extrato de solo	0,05 ml
K_2HPO_4	0,05 g
$MgSO_4 \cdot 7 H_2O$	0,05 g
NH_4Cl	0,05 g

Água destilada	100 ml
Ágar	1,5 g
pH	7,0

Como fonte de carbono, usou-se 0,5 g de pó de celulose, tiras de papel de filtro ou de jornal. Autoclavou-se por 20 minutos a 120°C.

3.1.3. Extrato de Solo

Solo	1,0 g
Água destilada	100 ml

Autoclavou-se por 20 minutos a 120°C.

3.1.4. Meio completo para fungos (MC) (PONTECORVO et alii, 1953), modificado por AZEVEDO & COSTA

NaNO ₃	6,0 g
KCl	0,5 g
KH ₂ PO ₄	1,5 g
MgSO ₄	0,5 g
ZnSO ₄	0,01 g
FeSO ₄	0,01 g
Glicose	10 g

Peptona	2,0 g
Extrato de levedura	2,0 g
Caseína hidrolisada	1,5 g
Ágar	18 g
Solução de vitaminas	1,0 ml
Água destilada	1000 ml
pH	6,8

Autoclavou-se por 20 minutos a 120°C.

3.1.5. Meio mineral para celulolíticos (AMARAL et alii, 1967)

KH_2PO_4	7,0 g
K_2HPO_4	2,0 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,1 g
$(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$	1,0 g
Água destilada	1000 ml
Extrato de leveduras (sol. 6% P/V)	10 ml
Celulose microcristalina	10 g
pH	7,0

Empregou-se 18,0 g de ágar para o meio sólido; autoclavou-se por 20 minutos a 120°C.

3.1.6. Preparo da celulose ácida

30 g de celulose (pulverizada) em beaker de 5 l.

Adicionar 400 ml de ácido orto-fosfórico (88%) e agitar por 2 horas a 1°C (na geladeira). Após, adicionar 2 litros de H_2O e agitar rapidamente. Filtrar à vácuo em gaze 5 dobras e 2 camadas de papel filtro whatman nº 1.

Ressuspender a pasta em 2 litros de H_2O e filtrar como antes; o precipitado colocar em 1 litro de Na_2CO_3 a 2%, Homogeneizar por 5' e estocar por 12 h. Lavar com 5 litros de H_2O e filtrar. Centrifugar o precipitado a 10.000 g por 5' e homogeneizar o "pellet" por 5'. A suspensão resultante deverá ter pH próximo de $6,5 \pm 0,1$. Secar a 80°C , até ficar bem seco.

3.1.7. Meio de ágar celulose ácida (TANSEY, 1971)

$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	2,0 g
KH_2PO_4	0,6 g
K_2HPO_4	0,4 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,8 g
Tiamina	100 μg
Extrato de levedura	0,5 g
Adenina	4,0 mg
Adenosina	8,0 mg
Celulose ácida (seca)	5,0 g
Ágar	17,0 g
Água destilada	1000 ml

Autoclavou-se por 20 minutos a 120°C.

3.1.8. Meio de ágar celulose ácida (HEDGER, 1982 modificado)

KH_2PO_4	3,8 g
K_2HPO_4	2,0 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,1 g
$(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$	1,0 g
Extrato de levedura	0,6 g
Celulose ácida (seca)	5,0 g
Ágar	15 g

Água destilada 1000 ml

pH 7,0

Autoclavou-se por 20 minutos a 120°C.

3.1.9. Solução salina

NaCl 8,5 g

Água destilada 1000 ml

Autoclavou-se por 20 minutos a 120°C.

3.1.10. Solução de citrato de sódio 1 M

Citrato de sódio 5,9 g

Água destilada 20 ml

3.1.11. Solução padrão de glicose

Glicose 50 mg

Água destilada 50 ml

3.1.12. Reagente de DNS

NaOH (2 N)	2,0 ml
DNS	0,1 g
Tartarato de sódio/potássio	3,0 g
Água destilada	10 ml

Em caso de precipitação, aqueceu-se em banho -maria a 50°C.

3.1.13. Solução de fixador de Helley

$K_2Cr_2O_7$	3,0 g
$HgCl_2$	5,0 g
Água destilada	100 ml

Conservou-se em frasco escuro.

3.1.14. Formol neutro

1 parte de carbonato de cálcio/3 partes de formalina, com agitação esporádica durante dez dias.

3.1.15. Tampão fosfato, pH 6,9

- Solução A

NaH_2PO_4	27,8 g
Água destilada	1000 ml

- Solução B

Na_2HPO_4	53,65 g
Água destilada	1000 ml

Misturou-se 45 ml da solução A em 55 ml da solução B e acertou-se o volume para 100 ml com água destilada. Conservou-se a 4°C.

3.1.16. Solução de albumina

Clara de ovo	5,0 ml
Água destilada	100 ml

Filtrou-se e conservou-se em frasco escuro a 4°C.

3.1.17. Solução padrão de pNPG (para nitrofenil β -D-glico piracósídeo)

pNPG	13,9 mg
------------	---------

sol. tampão de acetato de sódio

50 mM pH 5,0 100 ml

3.2. Métodos

3.2.1. Coleta e isolamento

Foram coletadas amostras de madeiras, folhe-
dos em decomposição e de visceração em larvas e insetos adul-
tos de isópteros e coleópteros, que se alimentam de madeira.
O isolamento foi feito em meio específico (MM) (AARONSON,
1970), e apresentando como única fonte de carbono a celulose
(tiras de papel de filtro, ou celulose pulverizada). O lo-
cal da coleta foi a mata da Fazenda São José - Rio Claro, SP,
e a reserva da EMBRAPA/CPATU, Belém, Pará. Os fungos, lar-
vas e insetos foram colocados em frascos de vidro esteriliza-
dos, tampados e levados ao laboratório, onde as larvas e os
insetos foram tratados, dessecados e suas vísceras foram res-
suspendidas em solução salina; posteriormente, foram inocula-
das no meio acima citado. Incubou-se a 28°C por sete dias.
Fez-se repicagens sucessivas para purificação das linhagens
celulolíticas. Após purificação, elas foram transferidas pa-
ra MC (PONTECORVO, 1953), para sua conservação. Sua manuten-
ção foi feita em MC a 4°C e temperatura ambiente e repicadas
a cada 6 meses.

3.2.2. Dosagem comparativa da produção de celulases totais

Para uma dosagem prévia da capacidade de hidrólise dos microrganismos isolados, utilizou-se a técnica de produção de halo de degradação da celulose descrita por HANKIN et alii (1975); para tanto usou-se o *T. reesei* QM 9414 como padrão. Os isolados foram inoculados em tubos contendo o meio de celulose ácida, incubados a 28°C e as leituras foram feitas com 5, 7, 9, 11 e 15 dias. Os halos de hidrólise foram medidos em profundidade (cm) em tubos 15 x 2,5 cm.

3.2.3. Estudo da biologia dos microrganismos isolados

3.2.3.1. Temperatura de cultivo e taxa de crescimento

Ensaaiou-se no presente trabalho, três temperaturas (28, 37 e 44°C) para se buscar a temperatura ideal de crescimento. Mediu-se os tamanhos das colônias em cm com 3, 5 e 7 dias.

3.2.3.2. Meio de cultura

A capacidade de crescimento e produção de colônias, foram ensaiadas nos meios: MC (PONTECORVÔ, 1953) mo modificado e MM (AARONSON, 1970). Utilizando-se diluições dos esporos para se obter colônias isoladas. Foi utilizado redu tor de crescimento, como citrato de sódio nas concentrações de 5, 10, 15 e 20 mM.

3.2.3.3. Produção de esporos

Foram feitas contagens do número de esporos. Tomou-se amostras de 4 diferentes pontos da placa com auxílio de um mostrador padrão e diluiu-se 10 mo de salina ou Tween 80. Fez-se contagem em Camara de Neubauer. Com isto, estimou-se o número de esporos produzidos por ml, da suspensão para cada um dos isolados e para os diferentes meios (MC e MM).

3.2.3.4. Números de núcleos por esporos

Através de coloração específica para núcleos (ROBINOW & CATEN, 1969, modificado) (PAES DE BARROS, 1977) pode-se estimar o número de núcleos por esporos. A técnica consistiu-se em: fixar os esporos sobre a lamínula com auxílio de albumina e chama. Após, deixou-se esta lamínula em uma solução de Helley (5 ml) acrescida de 0,3 ml de formol neutro por 15 minutos. Após

este período colocou-se a lamínula em álcool 70% por alguns minutos, retirou-se e submeteu-se os esporos a hidrólise em ácido clorídrico 1 N a 63°C por aproximadamente 20 minutos. A seguir, lavou-se a lamínula duas vezes em água destilada e coloriu-se com 5 ml de solução fosfato, pH 6,9 e 9 gotas de Giensa, durante 30 minutos. A lamínula foi lavada novamente em solução fosfato pH 6,9. Colocou-se a lamínula sobre a lâmina e observou com imersão; com isto pode-se determinar e observar os núcleos em cada esporo.

3.2.4. Dosagem da atividade das enzimas endoglucanase, exoglucanase e β -glicosidases

3.2.4.1. Obtenção do extrato enzimático

Em erlenmeyers de 125 ml, contendo 5 ml de água de torneira e 5 g de farelo de trigo, foi inoculada uma suspensão de 10^7 esporos/ml (3 ml) mantidos para crescer a 28°C por 10 dias.

Após o crescimento adicionou-se 30 ml de água destilada esterilizada, gelada e colocou-se em refrigerador por três horas a cerca de 4°C. Filtrou-se asseticamente em lâ de vidro e o filtrado foi usado como fonte de celulasas. Este filtrado pode ser mantido no refrigerador, por um longo período.

3.2.4.2. Avicelase (atividade exoglucanase ou
1,4 β -glucan celobiohidrolase - EC.
3.2.1.)

Foi colocado em tubos, 2,5 ml de tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,0, acrescentando-se 50 mg de Avicel e incubou-se por três minutos a 50°C para equilíbrio da temperatura. Posteriormente, colocou-se 2,5 ml do filtrado da cultura de cada um dos fungos isolados, agitou-se e colocou-se na estufa a 28°C retirou-se amostras de 1 ml nos tempos de zero, 30 e 60 minutos e colocou-se em tubos de centrífuga clínica contendo 1 ml de reagente de DNS, centrifugou-se a 5000 rpm, transferiu-se o sobrenadante para outro tubo e colocou-se em banho-maria fervente por 5 minutos, resfriou-se e colocou-se 10 ml de água destilada, fez-se leitura a 540 nm em colorímetro fotoelétrico B340 Micronal, onde foi dosada a glicose produzida e o valor estimado frente a um padrão de glicose (50 mg/50 ml). Os resultados foram fornecidos em atividade $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$.

3.2.4.3. Carboximetilcelulases (atividade endoglucanase ou 1,4 β -glucan glucanohidrolase. EC 3.2.1.

O procedimento foi similar ao da Avicelase, a

penas com o substrato Carboximetil celulose. O resultado foi dado pela atividade em $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$.

3.2.4.4. β -glicosidase

Ressuspendeu-se 1 mg de pNPG em 1 ml de tampão acetado de sódio 50 mM, pH 5,0, colocou-se em um tubo 0,5 ml de pNPG na concentração acima e 0,5 ml do filtrado do cultivo, fez-se a reação nos tempos 30 e 60 minutos, paralisou-se a reação com tetra borato de sódio saturado (2 ml) e fez-se a leitura em 412 nm.

Paralelamente, fez-se uma curva padrão de paranitrofenil (pNP) com concentrações conhecidas. Tomou-se 13,9 mg de pNP e diluiu-se em 100 ml de tampão acetado de sódio 50 mM, pH 5,0, fez-se uma amostragem desta solução com 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100 μl , completou-se o volume com 0,5 ml de água destilada e paralisou-se a reação com 2,0 ml de tetraborato de sódio, fez-se a leitura a 412 nm em absorbância. Após a calibração da reta, fez-se os cálculos dos resultados obtidos, fornecidos em $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$ de paranitrofenil.

4. RESULTADOS

4.1. ORIGEM DO MATERIAL E CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DOS ISOLADOS

Utilizando o meio de AARONSON (1970), foi possível o isolamento de vinte tipos de fungos; estes, acham-se listados na Tabela 1, onde também pode se verificar a origem dos isolados e locais de coleta.

4.2. DOSAGEM COMPARATIVA DA PRODUÇÃO DE CELULOSES TOTAIS

O meio utilizado neste ensaio foi o meio de celulose ácida modificado e os valores observados de halo de degradação em profundidade, podem ser vistos na Tabela 2.

TABELA 1. Origem dos fungos isolados, local de coleta e aspectos morfológicos dos isolados.

Nº	Origem dos isolados	Local de coleta	Característica morfológica
1	Coleóptero adulto	CPATU-Belém	cinza, bordas brancas
2	Madeira seca	CPATU-Belém	branco cotonoso
3	Coleóptero larva	CPATU-Belém	branco acinzentado
4	Coleóptero larva	CPATU-Belém	cinza esverdeado
5	Isóptero adulto	CPATU-Belém	verde
6	Madeira decomposição	CPATU-Belém	mostarda
7	Coleóptero larva	CPATU-Belém	verde
8	Isóptero larva	CPATU-Belém	cinza
9	Madeira seca	CPATU-Belém	branco
10	Isóptero adulto	CPATU-Belém	amarelo
11	Coleóptero adulto	CPATU-Belém	cinza
12	Coleóptero larva	CPATU-Belém	cinza
13	Coleóptero larva	MATA UNESP(RC)	verde
14	Coleóptero larva	MATA UNESP(RC)	marrom claro
15	Coleóptero larva	MATA UNESP(RC)	branco esverdeado
16	Coleóptero larva	MATA UNESP(RC)	chumbo
17	Madeira em decomposição	MATA UNESP(RC)	preto
18	Madeira em decomposição	MATA UNESP(RC)	esverdeado
19	Madeira em decomposição	MATA UNESP(RC)	verde
20	Madeira em decomposição	MATA UNESP(RC)	preto

TABELA 2. Medidas do halo de degradação por profundidades em tubos, utilizando-se o meio de celulose ácida modificado.

Nº	5º dia	7º dia	9º dia	11º dia	15º dia
1	0,6	0,9	0,9	1,0	1,1
2	0,0	0,6	0,6	0,6	0,8
3	0,8	1,2	1,2	1,4	1,6
4	0,4	0,7	0,9	1,0	1,0
5	0,9	1,0	1,0	1,4	1,8
6	0,9	1,1	1,3	1,4	2,0
7	1,0	1,1	1,4	1,5	2,0
8	0,8	1,0	1,2	1,4	1,6
9	0,0	0,7	0,9	1,0	1,0
10	0,6	0,7	0,8	0,9	1,0
11	0,4	0,8	1,0	1,3	1,5
12	0,0	0,5	0,5	0,6	0,6
13	0,8	1,1	1,1	1,5	1,8
14	0,7	0,9	1,1	1,3	1,6
15	0,6	0,9	1,0	1,1	1,3
16	0,4	0,6	0,6	0,8	1,1
17	0,5	0,8	1,2	1,4	1,5
18	0,7	1,0	1,2	1,5	1,7
19	0,5	0,8	1,0	1,3	1,5
20	0,6	0,9	1,1	1,3	1,5
T.reesei					
(QM 9414)	1,0	1,2	1,5	1,6	1,9

Trichoderma reesei (QM 9414) = padrão

Medidas em cm (profundidade) (tubos 15 x 2,5 cm)

4.3. ENSAIO DO CRESCIMENTO DOS FUNGOS EM DIFERENTES MEIOS E DIFERENTES TEMPERATURAS

Com o objetivo de encontrar uma temperatura e meios ideais de crescimento, os isolados foram inoculados em placas de Petri, contendo Meio Completo (PONTECORVO, 1953) e Meio Mínimo (AARONSON, 1970) e incubados nas temperaturas de 28, 37 e 44°C, por nove dias. As Tabelas 3, 4, 5 apresentam os resultados obtidos neste ensaio relativos à medida do diâmetro das colônias em função do meio de cultura e temperatura de incubação.

4.4. PRODUÇÃO DE ESPOROS

Para observar a produção de esporos dos isolados fez-se inoculação dos mesmos em placas de Petri contendo MC e MM e foram incubados em três temperaturas diferentes. Fez-se um tratamento estatístico através da análise de variância dos resultados das contagens segundo um delineamento experimental em parcelas subdivididas sobre blocos ao acaso. Estas análises podem ser vistas na Tabela 6 e 7.

4.5. ESTUDOS CITOLÓGICOS

Como auxiliar em estudos genéticos dos fun-

TABELA 3. Medida do diâmetro das colônias no 5º, 7º e 9º dias em Meio Mínimo (AARONSON, 1970) e Meio Completo (PONTECORVO, 1953), incubados a 28°C.

Nº	Meio Mínimo			Meio Completo		
	5º dia	7º dia	9º dia	5º dia	7º dia	9º dia
1	5,0	TP	TP	TP	TP	TP
2	1,5	3,0	3,0	TP	TP	TP
3	0,5	TP	TP	TP	TP	TP
4	2,0	3,0	5,0	2,2	3,0	3,0
5	0,2	6,0	6,0	TP	TP	TP
6	0,3	4,0	5,0	5,5	TP	TP
7	TP	TP	TP	TP	TP	TP
8	0,5	TP	TP	2,0	3,0	4,0
9	1,5	3,0	4,0	2,8	4,0	5,0
10	TP	TP	TP	1,5	1,5	1,5
11	0,4	TP	TP	TP	TP	TP
12	0,5	1,0	1,0	1,7	2,0	3,5
13	0,3	TP	TP	TP	TP	TP
14	0,2	2,0	2,0	7,0	TP	TP
15	0,4	TP	TP	TP	TP	TP
16	0,5	2,0	2,0	3,5	TP	TP
17	TP	TP	TP	TP	TP	TP
18	TP	TP	TP	TP	TP	TP
19	TP	TP	TP	TP	TP	TP
20	TP	TP	TP	TP	TP	TP

Diâmetro da colônia em cm

TP = Toda a Placa

TABELA 4. Média do diâmetro das colônias, no 5º, 7º e 9º dia em Meio Mínimo (AARONSON, 1970) e Meio Completo (PONTECORVO, 1953), incubados a 37°C.

Nº	Meio Mínimo			Meio Completo		
	5º dia	7º dia	9º dia	5º dia	7º dia	9º dia
1	6,5	7,0	7,5	9,0	TP	TP
2	1,0	3,0	3,0	3,5	6,5	TP
3	0,4	6,0	6,0	6,5	TP	TP
4	1,5	3,0	3,5	3,5	TP	TP
5	5,0	6,0	6,0	6,0	TP	TP
6	1,2	2,0	4,0	2,8	TP	TP
7	5,0	7,0	7,0	7,0	TP	TP
8	1,0	7,0	-	1,3	2,0	2,0
9	1,8	2,0	2,0	1,5	2,0	2,0
10	1,5	-	TP	0,8	1,0	-
11	5,0	6,0	6,0	TP	TP	TP
12	0,2	0,5	1,0	0,5	1,0	1,0
13	2,5	6,5	6,5	6,5	TP	TP
14	-	-	-	0,7	2,0	3,0
15	0,3	6,5	6,5	6,0	7,5	7,5
16	0,3	2,0	2,5	-	-	-
17	5,0	5,5	6,0	5,0	5,5	7,0
18	4,5	5,0	5,5	5,0	6,0	7,0
19	5,0	5,0	5,5	5,5	6,0	7,0
20	5,0	5,5	6,0	6,0	6,5	8,0

Diâmetro da colônia em cm

TP = Toda a Placa

- = não houve crescimento

TABELA 5. Medida do diâmetro das colônias, no 5º, 7º e 9º dias, em Meio Mínimo (AARONSON, 1970) e Meio Completo (PONTECORVO, 1953), incubados a 44°C.

Nº	Meio Mínimo			Meio Completo		
	5º dia	7º dia	9º dia	5º dia	7º dia	9º dia
1	-	-	-	-	-	-
2	TP	TP	TP	5,0	TP	TP
3	0,5	1,0	-	-	-	-
4	2,5	-	-	5,5	TP	TP
5	-	-	-	-	-	-
6	2,0	3,0	4,0	-	-	-
7	0,5	-	-	-	1,0	TP
8	2,0	3,0	3,0	1,0	2,0	3,0
9	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-
11	-	-	-	-	-	-
12	-	-	-	-	-	-
13	-	-	-	-	-	-
14	-	-	-	-	-	-
15	0,2	-	-	-	-	-
16	0,2	-	-	-	-	-
17	-	-	-	-	-	-
18	-	-	-	-	-	-
19	-	-	-	-	-	-
20	-	-	-	-	-	-

Diâmetro da colônia em cm

TP = Toda a Placa

- = não houve crescimento

TABELA 6. Produção de esporos em Meio Mínimo (AARONSON, 1970)
incubados a 28° e 37°C.

Linhagens	Temperatura °C	Meio Mínimo	
		Nº esporos (x 10 ⁶).	Nº esporos (x 10 ⁶)
1	28	108	106
	37	174	170
2	28	164	160
	37	55	50
3	28	76	73
	37	3	1
5	28	291	29
	37	17	15
6	28	44	48
	37	5	8
8	28	190	190
	37	150	140
9	28	48	50
	37	67	60
11	28	134	134
	37	137	130
13	28	200	202
	37	29	20
16	28	192	188
	37	40	45
17	29	9	10
	37	30	35
18	28	300	350
	37	300	300
19	28	200	250
	37	150	160
20	28	72	60
	37	80	70

- continua -

TABELA 6. (continuação)

Split-plot

CV	GL	SQ	QM	F
Blocos	1	795,0179	795,0179	0,5621
Tratamentos	13	308418,3036	23724,4849	16,7730**
Resíduo (A)	13	18387,7321	1414,4409	
(Parcelas)	(27)	327601,0536		
Temp.	1	36872,4465	19018,2857	14,76**
T x Trat.	13	68172,3035	20291,6126	15,75**
Resíduo (B)	14	18039,7500	1288,5536	
Total	55	450687,5536		

** significantes

TABELA 7. Produção de esporos em Meio Completo (PONTECORVO ,
1953) incubados a 23°C e 37°C.

Linhagens	Temperatura °C	Meio Completo	
		Nº de esporos (x 10 ⁶)	Nº de esporos (x 10 ⁶)
1	28	32	30
	37	224	220
2	28	240	210
	37	311	300
3	28	120	130
	37	280	270
5	28	200	210
	37	350	300
6	28	250	230
	37	104	180
7	28	100	90
	37	112	110
8	28	200	190
	37	200	200
9	28	46	40
	37	17	15
11	28	62	60
	37	200	200
13	28	82	80
	37	59	50
16	28	82	80
	37	60	60
17	28	20	24
	37	40	30
18	28	300	280
	37	300	300
19	28	200	190
	37	140	130
20	28	80	70
	37	80	60

- continua -

TABELA 7. (continuação)

Split-plot

CV	GL	SQ	QM	F
Blocos	1	385,0660	385,0660	3,06
Tratamentos	14	422359,8330	30168,5595	238,43**
Resíduo (A)	14	1771,4340	126,5310	
(Parcelas)	29	424516,3330		
Temp. (T)	1	15811,2660	15811,2660	69,72**
T x Trat.	14	99022,2360	7073,0167	31,19**
Resíduo (B)	15	3628,5000	226,7813	
Total	60	542978,3330		

** = significantes.

gos, foram feitas determinações do número de núcleos por esporos, através de coloração dos mesmos. Os resultados podem ser observados na Tabela 8.

4.6. DOSAGEM DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Por se tratar basicamente de três enzimas envolvidas no processo de degradação da celulose, as mesmas foram dosadas separadamente, utilizando-se para cada uma delas substrato específico. A atividade foi estimada pela quantidade de glicose produzida na reação em 60 minutos e os resultados foram dados em μmol de glicose/minuto/ml e estão listados na Tabela 9 para C_1 (Avicel), na Tabela 10 para C_x (CMG_{ase}) e Tabela 11 para β -glicosidade (pNPG).

TABELA 8. Estudos citológicos dos isolados através de coloração de núcleos.

Linhagem		Nº de núcleos
1	-	Uninucleado
2	-	Uninucleado
3	-	Uninucleado
4	-	Uninucleado
5	-	Uninucleado
6	-	Uni, bi e tetra (maioria binucleado)
7	-	Uninucleado
8	-	Uninucleado
9	-	Uninucleado
10	-	-
11	-	Uninucleado
12	-	Uninucleado
13	-	Uninucleado
14	-	Binucleados
15	-	Uni, bi, tri
16	-	Binucleados
17	-	Uninucleados
18	-	Uninucleados
19	-	Uninucleados
20	-	Uni e binucleados
T. reesei QM 9414		- Uninucleados

TABELA 9. Dosagem da atividade de exoglucanase (C_1) frente ao substrato Avicel, unidade de atividade/mg total de proteína em 2 experimentos separados.

Isolados	1ª dosagem*	2ª dosagem*
1	29,60	29,72
2	13,07	19,81
3	47,55	21,79
4	29,72	49,44
5	19,81	15,85
6	43,59	52,42
7	59,44	41,61
8	29,72	23,77
9	23,77	26,38
10	17,83	15,85
11	10,70	15,86
12	25,76	17,83
13	8,90	13,87
14	17,83	9,94
15	49,54	41,61
16	13,87	13,87
17	15,94	29,72
18	32,88	33,68
19	31,70	24,88
20	23,70	28,50
T.reesei QM 9414	32,69	35,66

* : μmol de glicose/min/ml : tempo total de reação 60 minutos

TABELA 10. Dosagem da atividade enzimática (endoglucanase)
 (C_x) frente ao substrato carboximetil celulose
 (unidade de atividade/mg total de proteína).

Linhagem	1ª dosagem*	2ª dosagem*
1	71,33	56,36
2	65,39	50,80
3	89,16	79,30
4	49,92	43,77
5	41,61	39,72
6	83,22	80,25
7	89,16	75,39
8	60,50	64,20
9	56,47	62,05
10	47,55	69,40
11	32,10	32,69
12	41,61	35,67
13	59,44	68,36
14	69,93	71,33
15	48,60	46,75
16	29,72	36,10
17	23,77	25,75
18	35,66	29,72
19	29,72	42,42
20	22,85	23,77
T.reesei QM 9414	89,16	98,08

* : μmol de glicose/min/ml

TABELA 11. Atividade de β -glicosidase frente ao substrato pNPG expressa em μmol de pNP formado/ml de prote $\bar{i}$ na/minuto.

Isolados	Atividades da enzima ($\mu\text{mol/ml/min}$)
1	402,40
2	363,11
3	441,68
4	284,54
5	328,82
6	638,12
7	2013,17
8	991,70
9	382,75
10	480,95
11	1148,85
12	559,54
13	952,42
14	952,42
15	1148,85
16	116,67
17	1541,72
18	761,69
19	363,11
20	284,54
T. reesei QM 9414	677,41

5. DISCUSSÃO

Com o objetivo de isolar fungos celulolíticos, no presente trabalho tomou-se como campo de busca duas matas distintas, a primeira foi a mata da Fazenda São José - Rio Claro, SP, a segunda uma mata do tipo tropical, CPATU-EMBRAPA, Belém, PA. Escolheram-se estas duas matas por serem distintas, bem determinadas caracteristicamente e para se limitar o campo de isolamento. Nesses locais as amostras foram coletadas de madeiras e folhedos em decomposição, e de larvas e insetos (Isópteros e Coleópteros) que se alimentam de celulose.

Utilizando o meio de AARONSON (1970) o qual chamou-se de meio mínimo, isolaram-se 20 espécies de fungos que possuíam a característica básica, isto é, capacidade de crescimento em meio de cultura, onde a única fonte de carbo-

no era a celulose. Na Tabela 1 pode-se observar a origem dos isolados, o local de coleta e os aspectos morfológicos dos mesmos. Apesar da não classificação taxonomica dos isolados devido alguns parâmetros estarem sendo estudados, sugerem-se através de suas morfologias que os isolados de número 4, 5, 8, 13, 15, 18 e 19 pertencem ao gênero *Trichoderma*, o de nº 6 ao gênero *Aspergillus* e os de nº 17 e 20 a espécie *Aspergillus niger*. Segundo alguns autores (RYU, 1980; GHOSE & GHOSE, 1979), os fungos pertencentes a estes gêneros são os melhores produtores e os mais bem estudados.

Para se avaliar a capacidade de produção das enzimas do complexo celulolítico dos 20 isolados, utilizou-se a espécie *Trichoderma reesei* QM 9414, como padrão, e a técnica de SMITH (1976) que em tubos de ensaio com meio apropriado, detecta a produção das enzimas pela difusão no meio de cultura contendo celulose como única fonte de carbono.

Neste ensaio pode-se observar que com 7 dias de incubação os isolados de nº 3, 5, 6, 7, 8, 13 e 18 apresentaram halos de degradação da celulose iguais ou semelhantes ao padrão (Tabela 2) e que no 15º dia os isolados de nº 6 e 7 apresentaram halos de degradação maiores que o padrão, enquanto que os isolados de nºs 5, 8, 13, 14, 17 se mostraram também bons produtores. Observou-se que alguns dos isolados não apresentaram resultados significativos nos 7 primeiros dias de incu

bação, mas que apresentaram uma boa produção com um maior tempo de crescimento. Pode-se inferir assim que a produção das enzimas celulolíticas pode variar com o tempo na sua excreção no meio de cultura (SMITH, 1976), ou com a atividade por se tratar de um complexo multienzimático, agindo sinergisticamente sobre substratos específicos (SPREY & LAMBERT, 1984). Outras técnicas de produção de halos de hidrólises em placas (HEDGER, 1982) podem ser utilizadas para a caracterização de microrganismos celulolíticos, quando estes apresentam um crescimento colonial bem definido sem espelhamento pelas placas. Para os 20 isolados não foi possível utilizar a técnica de halos em placas, pois drogas inibidoras de crescimento atuam diferentemente nos mesmos; no presente trabalho utilizou-se citrato de sódio como redutor do crescimento em várias concentrações; entretanto, alguns dos isolados não apresentaram crescimento reduzido mesmo nas mais altas concentrações, o que dificultou a técnica da medida de halos formados.

Os resultados indicam assim que mesmo com um pequeno número de fungos celulolíticos isolados há um grande potencial para a obtenção de espécies celulolíticas que se comparam ou mesmo podem ser superiores a linhagem tradicionalmente usada como o *T. reesei*.

A definição de meios específicos para o crescimento e temperatura ótima dos isolados foram ensaiados. Para o melhoramento genético é importante que se defina um meio mínimo principalmente para permitir o isolamento de mutantes auxotróficos como marcadores genéticos; assim, utilizou-se meio completo (PONTECORVO, 1953) e o meio mínimo (AARONSON, 1970) e 3 temperaturas diferentes ou seja 28, 37 e 44°C.

Pelos resultados obtidos e listados na Tabela 3, 4 e 5 pode-se verificar que a maioria dos isolados é constituída por fungos mesófilos e apenas o isolado de nº 2 comportou-se como um fungo termofílico. Alguns autores consideram a termofilia como uma característica vantajosa pois estes apresentam maiores taxas de crescimento e sistema enzimático mais estável, pois a temperatura ótima para a atividade das enzimas do complexo celulolítico é aproximadamente 55°C (BELLANY, 1979). Entretanto, os ensaios no presente trabalho foram conduzidos a 28°C, pois foi nesta temperatura que a maioria dos isolados apresentaram bom crescimento.

Considerando-se o crescimento nos dois meios de cultura utilizados, as diferentes temperaturas e a produção de esporos, pode-se verificar pelas análises estatística de blocos ao acaso que as linhagens divergem entre si, o que sugere tratar de linhagens distintas. Os isolados 4, 7,

10, 12 e 14 não produziram esporos em meio mínimo e os isolados 4, 10, 12 e 14 não apresentaram produção de esporos em meio completo (Tabela 6 e 7).

Para que as técnicas de mutação e recombinação possam ser aplicadas com sucesso, há necessidade de conhecimento citológico dos isolados, da forma de reprodução de microrganismos e de características outras desde coloração, até o tipo de colônias formadas (AZEVEDO, 1985) os resultados desta análise indicados na Tabela 8 demonstram que alguns dos isolados são uninucleados e que vai facilitar futuros estudos genéticos nos mesmos.

As atividades enzimáticas dos 20 isolados foram ensaiadas separadamente, para se avaliar cada enzima, pois verificou-se no caso do *T. reesei*, que são encontradas elevados níveis de endoglucanase ou exoglucanase, mas a atividade específica de β -glicosidase era muito baixa (WOOD, 1982), e para uma hidrólise perfeita (completa) do material celulósico é necessário que os níveis das três enzimas sejam balanceados pois o acúmulo de moléculas de celobiose ou celotriose, são inibidoras do processo de hidrólise. Dos isolados estudados alguns se mostraram promissores (Tabela 9, 10 e 11). É o caso por exemplo, do isolado 7 que possui atividade de exoglucanase e endoglucanase comparável ao *T. reesei* e atividade de β -glicosidase bem maior que a de *T. reesei*.

Os resultados obtidos no presente trabalho, demonstra a importância do isolamento de novos microrganismos celulolíticos, pois existe uma alta probabilidade de se isolar microrganismos com capacidades favoráveis no próprio ambiente natural sem utilizar as técnicas de mutação ou manipulação gênica; a exploração da variabilidade natural demonstra a potencialidade de obtenção de novas linhagens e espécies, possibilitando assim uma amplitude maior nos estudos de Melhoramento Genético das espécies celulolíticas. Linhagem como por exemplo a de nº 7 que apresenta alta quantidade das 3 celulasas, é uninucleada e produz um bom número de esporos, mostra-se igualmente favorável para a realização de programa de melhoramentos genéticos visando um incremento na produção de celulasas de modo a torná-la competitiva e favorável para a produção de celulasas.

6. CONCLUSÕES

1. De vinte isolados obtidos alguns se mostraram semelhantes ou superiores a *T. reesei* utilizado como padrão. Isto demonstra a alta variabilidade natural existente em fungos celulolíticos e a importância da busca de linhagem de habitats naturais.
2. Alguns isolados, especialmente o nº 7 mostrou-se favorável para futuros estudos de genética e melhoramento na busca de mutantes que possam ser utilizados em processos industriais para a produção de celulasas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AARONSON, S., 1970. Experimental microbial ecology.

Academic Press. New York, USA. p. 80.

ADVANCES in Enzymatic Hydrolysis of Cellulose and Related material (Reese, E.T. etd.=. Pergamon, New York, 1963.

ANDREN, R.K., M. MANDELS & J.E. MEDEIROS, 1976. Process biochem., 11, 2. Apud: Enzyme Microb. Technol., 1980, 2: 91-102.

ANDREOTTI, R.E., M. MANDELS & C. ROCHE, 1977. In: Bioconversion of cellulosic substances into energy, chemicals and microbial proteins (Ghose, T.K., ed.). Indian Institute of Technology Delhi, India, p. 249.

- AZEVEDO, J.L., 1985. Melhoramento genético de microrganismos e sua aplicação à hidrólise enzimática de biomassas. Anais do II Seminário de "Hidrólise Enzimática de Biomassa". Maringá, PR, p. 93-106.
- BERGHEN, L.E.R., L.G.PETTERSON & U.B. AXIO FREDDRIKSSON, 1976. Are mechanism of enzymatic cellulase degradation. Eur. J. of Biochem. 61: 621.
- BERNAT, J.A. & W. RZEDOWSKI, 1977. Przem. Ferment. Rolny, 21, 11. Apud: Enzyme Microb. Technol., 1980, 2: 99-102.
- BRANDT, D., L. HONTZ & M. MANDELS, 1973. Aiche Symp., 69, 127. Apud: Enzyme Microb. Technol., 1980. 2: 99-102.
- BROWN, D.E. & M.A. ZAINUDEEN, 1977. Growth kinetics and cellulase biosynthesis in the continuous culture of **Trichoderma viride**. J. Biotechnol. Bioeng., 19, 7: 941-958.
- BROWN, D.E. & D.J. HALSTED, 1975. The effect of acid pH on the growth kinetics of **Trichoderma viride**. J. Biotechnol. Bioeng., 17, 8: 1199-1210.
- CARVALHO, E.A., 1983. Sacarificação enzimática de materiais celulósicos I. "Apostilas do Seminário de Biotecnologia". Lorena. SP.

- ERIKSSON, K.E., 1981. In: "Trends in the biology of fermentation for fuels and chemicals" (Hollander, A., eds.). pp. 19-32. Phenum Press, New York.
- ERIKSSON, K.E. & B. PETTERSSON, 1972. In: "Biodeterioration of Materials" (A.H. Walters and A.H. Hneck Van Der Plas, eds.). Vol. 2, p. 116. Applied Sciences Publischens Ltda. London.
- FERRER, A., Y. ALROY & I. BRITO, 1977. Proc. Ann. Biochem. Eng. Symp., 7, 83.
- GALLO, B.J., R. ANDREOTTI, C. ROCHE, D. RYU & M. MANDELS. In: Utilization of agricultural crop residues (Han, J.W. and Smith, S.K.) US Dept. Agriculture, Agricultural Research Service, ARS W-53, 1979, p. 89.
- GALLO, B.J., R. ANDREOTTI, C.J. ROCH, D. RYU & M. MANDELS, 1979. Biotechnology in energy production and conservation (Ed. C.D. Scott) pp. 89-101.
- GHOSE, T.K., 1972. US Pat. 3 642 580, 5.
- GHOSE, T.K. & J.A. KOSTICK, 1969. In: Cellulases and their applications, advances in chem. Series 95 (Hajny, G.J. and Reese, E.T., eds.) American Chemical Society, Washington, D.C., p. 415.

- GHOSE, T.K. & P. GHOSH, 1979. Cellulase production and cellulose hydrolysis. Proc. Biochem. 14: 20-24.
- GONG, C.S., M.R. LADISH & G.T. TSAO, 1977. Cellobiase from *Trichoderma irridi*: Purification, properties, kinetics and mechanism. J. Biotechnol. and Bioeng. XIX(7): 959-981.
- GUM, E.K. & R.D. BROWN, 1977. Comparison of four purified extracellular 1.4 β -glucanocellobiohydrolase enzyme from *Trichoderma irridi*. Biochem. Biophys. Acta 492: 225-231.
- HEDGER, J.N., 1982. Rapid screening of cellulolytic activity of micro-organisms by the use of acid-swollen cellulose. *Micro-organism Meets Plant.* p. 617-619.
- HOWELL, J.A. & M. MANGAT, 1978. Enzyme reactivation during cellulose hydrolysis. J. Biotechnol. Bioeng., 20, 16, 847-863.
- HOWELL, J.A. & J.D. STUCK, 1975. Kinetics of solka floc cellulose hydrolysis by *Trichoderma viride* cellulase. J. Biotechnol. Bioeng., 17, 6: 873-893.
- HUANG, A.A., 1975. Kinetics studies on insoluble cellulose - cellulose-cellulase system. J. Biotechnol. Bioeng., 17, 10, 1421-1433.

- JANICKI, J., D. GENIBICKÁ & K. CHRAPKOWSKA, 1976. J. Pr. Kpm. Nauk. Roln. Kom. Nayk. Lesn., Poznan. Tow Przyj. Nauk., 41, 117.
- JIRESOVA, M., Z. DOBRAVÁ, J. NAPRSTEK, 1983. Induction of β -D-glucosidase in *Streptomyces gramineus*. Folia Microbiologica 25:380-385.
- LEISOLA, M. & V. KAUPPINEN, 1978. Automatic assay of cellulose activity during fermentation. J. Biotechnol. Bioeng., 20, 6: 837-846.
- MANDELS, M., 1975. In: Cellulose as a chemical and energy resource, biotechnol. Bioeng. Symp. n° 5 (Wilke, C.R., ed.) John Wiley and Sons, New York, p. 81.
- MANDELS, M., D. STERNBERG & R.E. ANDREOTTI, 1975. In: Symposium on Enzymatic Hydrolysis of Cellulose (M. Barley, T.M. Enari and M. Linko, eds.). p. 81-SITRA. Aulanko, Finland.
- McCHALE, A. & M.A. COUGHLAN, 1981. "The cellulolytic systems of *Talaromyces emersonii*. Identification of the various components produced during growth on cellulosic media". Biochem. Biophys. Acta 662: 145-151.
- MITRA, G. & C.R. WILKE, 1975. Continuous cellulose production. J. Biotechnol. Bioeng., 17, 1: 1-13.
- MONTENECOURT, B.S., D.E. EVELEGH, G.K. ZIMMUND & J. PARCELLS, 1978. J. Biotechnol. Bioeng., 20, 297.

MONTENECOURT, B.S. & D.E. EVELEIGH, 1977. Environ. Microbiol., 34, 777. Apud: Enzyme Microb. Technol. 1980, 2: 91-102.

NAKAYAMA, M., J. TONITA, H. SUZUKI & K. NISISANA, 1976.

Partial proteolysis of some cellulase. Components from *T. irridi* and the substrate specificity of the modified products. J. Biochem. 79: 955.

NIZIZAWA, T., A. SUZUKI, M. NAKAYAMA & K. NIZIZAWA, 1971.

Inductive formation of cellulase by sophorose in *Trichoderma irridi*. J. of Biochem. Tokyo, 70: 375.

NYSTROM, J.M., R.H. ANDRESS & J.E. MEDEIROS, 1975. Production of sugar from waste cellulose by enzymatic hydrolysis. Part II. Primary evaluation of substrates. The 170th National A.C.S. Meeting, Chicago, Illinois, 37 p.

PEITERSEN, N., 1977. In: Bioconversion of cellulosic substances into energy, chemicals and microbial proteins (Ghose, T.K., ed.). Indian Institute of Technology Delhi, India, p. 281.

REESE, E.T., 1976. History of the cellulase program at the U.S. Army Natick Development Center. J. Biotechnol. Bioeng. Symp. 6: 9-20.

ROMANELLI, R.A., C.W. HOUSTON & S.M. BARNET, 1975. Appl. Microbiol., 30, 276.

- RYU, D., R. ANDREOTTI, M. MANDELS, B. GALLO & E.T. REESE,
s/d. J.Biotechnol. Bioeng. in press.
- RYU, D.D., 1980. Cellulases: biosynthesis and applications
Enzyme Microb. Technol. 2. 91-102.
- SATTAROVA, R.K., 1972. Trashpulatov, Zh. and Safiyazov, Zh.
Mikrobiologiya, 41, 413. Apud: Enzyme Microb. Technol.,
1980. 2: 91-102.
- SCHEWALE, J.G. & J.C. SADANA, 1979. Enzymatic hydrolysis of
cellulosic materials by *Sclerotium rolfsii* culture filtra
te from sugar production. Can. J. Microbiol. 25, 6,
773-783.
- SMITH, R.E., 1976. Rapid tube test for detecting fungal
cellulases production. 33(1):
p. 980-981.
- SPANO, L.A., J. MEDEIROS & M. MANDELS, 1975. Enzymatic
hydrolysis of cellulosic waste to glucose. U.S. Army
Natick-Laboratories, USA. 31 p.
- SPREY, B. & C. LAMBERT, 1984. Heterogeneity of cellulase
complexes from *Trichoderma reesei*: a preparative isoele-
tric focusing to study of some extracellular hydrolases.
FEMS. Microbiol. Let. 23: 227-232.
- STERNBERG, G.R. & M. MANDELS, 1979. "Cellulolytic enzymes
in *T. reesei* by shophorose". J. Bacteriol. 139(3):
761-769.

- STERNBERG, D. & G.R. MANDELS, 1980. Regulation of the cellulolytic system in *Trichoderma reesei* by sophorose: Induction of cellulase and repression of β -glucosidase. J. of Bacteriol. 144, 3, 1197-1199.
- STERNBERG, D., 1976. β -glicosidase of *Trichoderma*: its biosynthesis and role in saccharification of cellulose. Appl. Environ. Microbiol. 31: 648-654.
- STUPIELO, J.P., 1980. Matrias primas para obteno de lcool. Fermentaes industriais e transformaes microbianas no solo. 66-69 (Proc. 2 Simp. Nac. Ferm., Piracicaba, SP). Informaes Tec. Cientficas, SBM, SP. (185 p.)
- STUTZENBERGER, F.J., 1971. Appl. Microbiol., 22, 147.
- TOYAMA, N. & K. OGAWA, 1977. In: Bioconversion of cellulosic substances into energy, chemicals and microbial proteins (Ghose, T.K., ed.). Indian Institute of Technology Delhi, India, p. 305.
- TOYAMA, N., 1976. In: Enzymatic conversion of cellulosic materials: technology and applications. Biotechnol. Bioeng. Symp. n 6 (Gaden, Jr., E.L., Mandels, M.H., Reese, E.T. and Spano, L.A., eds.), John Wiley and Sons, New York, p. 207.

- VILELA, L.C., A.R. TORILLO, A.T. De OCAMPO & E.J. DEL ROSA-
RIO, 1977. Agric. Biol. Chem., 41, 235.
- WILKE, C.R. & G. MITRA, 1975. In: Cellulose as chemical and
energy resource. Biotechnol. Bioeng. Symp. n° 5 (Wilke,
C.R., ed.), John Wiley and Sons, New York, p. 253.
- WILLICK, G., R. MOROSOLI, V.L. SELIGY, M. YAGUCHI & M. DESRO-
CHERS, 1984. Extracellular proteins secreted by the
basidiomycete **Schizophyllum commune** in response to carbon
source. J. of Bacteriol. 159 1, 294-
-299.
- WILLICK, E. & L. SELIGY, 1985. Multiplicity in cellulases
of **Schizophyllum commune**. Eur. J. Biochem. 151, 89-96.
- WOOD, T.M., S.I. McCRAE & C.M. MEFARLANE, 1980. The
isolation, purification and properties of the cellobiohi-
dralase component of **Penicillium funiculosum** cellulase.
Biochem. Journal. 189: 51-65.
- WOOD, T.M., 1975. Properties and mode of action of cellu-
lases. Biothenol. and Bioeng. Symp. 5, 111-
-137.
- WOOD, T.M. & S.I. McCRAE, 1972. The purification and pro-
perties of the C₁ component of **Trichoderma konningii**
cellulose. Biochem. J. 128: 1183-1192.

- WOOD, T.M. & S.I. McCRAE, 1978. In: Bioconversion of cellulosic substance into energy, chemicals & microbial protein (Chose, T.K., ed.) pp. 111-141. H.T. Delhi.
- WOOD, T.M. & S.I. McCRAE, 1978. The cellulase of *Trichoderma koningii*. Purification and properties of some endo-glucanase components with special reference to their action on cellulose when acting alone and in synergism with the cellobiohydrolase. Biochem. J. Cambridge. 171: 61-72.
- WRIGHT, D.J., 1983. High temperature acid hidrolisis of cellulose for alcohol fuel production. In: "Fall National Meeting" of the American Chemical Society 28 August-September, Washington, D.C.