

ATIVIDADE ENZIMÁTICA E PRODUÇÃO DE ÁCIDO  $\gamma$ -LINOLÊNICO POR  
FUNGOS FILAMENTOSOS ISOLADOS DO SOLO, DA ESTAÇÃO ECOLÓGICA  
DE JURÉIA-ITATINS, SP.

MARCELO JOSÉ SILVEIRA RUEGGER

Tese apresentada ao Instituto de Biociências do  
Campus de Rio Claro, Universidade Estadual  
Paulista, como parte dos requisitos para obtenção  
do título de Doutor em Ciências Biológicas (Área  
de Microbiologia Aplicada).

RIO CLARO  
Estado de São Paulo-Brasil  
Fevereiro de 2001

ATIVIDADE ENZIMÁTICA E PRODUÇÃO DE ÁCIDO  $\gamma$ -LINOLÊNICO POR  
FUNGOS FILAMENTOSOS ISOLADOS DO SOLO, DA ESTAÇÃO ECOLÓGICA  
DE JURÉIA-ITATINS, SP.

MARCELO JOSÉ SILVEIRA RUEGGER

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. SÂMIA MARIA TAUKE TORNISIELO

Co-Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. GLÁUCIA MARIA PASTORE

Tese apresentada ao Instituto de Biociências do  
Campus de Rio Claro, Universidade Estadual  
Paulista, como parte dos requisitos para obtenção  
do título de Doutor em Ciências Biológicas (Área  
de Microbiologia Aplicada).

RIO CLARO

Estado de São Paulo-Brasil

Fevereiro de 2001

Aos meus pais Walter Victor (*in memorian*) e Maria Rosa, pelo precioso dom da vida e por me mostrarem o caminho a ser trilhado.

À minha esposa Rosemeire pelo amor, carinho, companheirismo e compreensão.

Ao meu filho Rodolfo (*in memorian*) pelo seu amor, carinho e alegria, sempre me esperando ansioso com um sorriso e um abraço apertado.

Dedico

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de, sinceramente, agradecer a todas as pessoas e entidades que colaboraram na realização deste trabalho, em especial:

- À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Sâmia Maria Tauk-Tornisielo, principalmente por sua amizade durante todos estes anos, além da orientação, apoio e confiança.
- À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Gláucia Maria Pastore da Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP pela co-orientação.
- Ao Centro de Estudos Ambientais da UNESP, pela utilização dos laboratórios e equipamentos.
- À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, pela concessão de bolsa de doutorado e pelo auxílio financeiro.
- À coordenação da Área de Microbiologia Aplicada do curso de pós-graduação em Ciências Biológicas do Instituto de Biociências da UNESP.
- À coordenadoria do Programa de Pesquisa da Estação Ecológica de Juréia-Itatins, SP.
- Aos funcionários e técnicos do Centro de Estudos Ambientais da UNESP, em especial à técnica Eleni Nadai Malagutti por sua colaboração.
- À secretária Sara Cristina Galvão Rodrigues pelo auxílio burocrático.
- Aos meus professores e colegas de curso.
- A todos que de alguma forma, direta ou indiretamente, contribuíram para a execução deste trabalho.

Muito obrigado!

## SUMÁRIO

|                                                                          | Página |
|--------------------------------------------------------------------------|--------|
| RESUMO .....                                                             | ix     |
| SUMMARY .....                                                            | x      |
| LISTA DE FIGURAS .....                                                   | xi     |
| LISTA DE TABELAS .....                                                   | xii    |
| LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS .....                                   | xiv    |
| 1. INTRODUÇÃO .....                                                      | 1      |
| 2. REVISÃO DA LITERATURA .....                                           | 6      |
| 2.1. Fungos e ecologia .....                                             | 6      |
| 2.2. Fungos e biotecnologia .....                                        | 10     |
| 2.2.1. Enzimas .....                                                     | 11     |
| 2.2.2. Lipídios e ácido $\gamma$ -linolênico .....                       | 16     |
| 3. MATERIAIS E MÉTODOS .....                                             | 26     |
| 3.1. Atividade enzimática .....                                          | 26     |
| 3.1.1. Microrganismos .....                                              | 26     |
| 3.1.2. Seleção preliminar dos microrganismos produtores de enzimas ..... | 26     |
| 3.1.3. Procedimento para obtenção do extrato enzimático .....            | 27     |
| 3.1.4. Aplicação de ultra-som na obtenção do extrato enzimático .....    | 27     |
| 3.1.5. Determinação das curvas padrão de glicose e xilose .....          | 27     |
| 3.1.6. Determinação das atividades enzimáticas .....                     | 28     |
| 3.1.7. Unidade de atividade enzimática .....                             | 29     |
| 3.1.8. Análise estatística .....                                         | 30     |
| 3.2. Produção de ácido $\gamma$ -linolênico .....                        | 30     |

|                                                                                                                                             |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.2.1. Fungos .....                                                                                                                         | 30 |
| 3.2.2. Coleta de solo da Estação Ecológica de Juréia-Itatins .....                                                                          | 31 |
| 3.2.3. Tratamento das amostras de solo .....                                                                                                | 31 |
| 3.2.4. Seleção preliminar de fungos produtores de ácido $\gamma$ -linolênico .....                                                          | 31 |
| 3.2.5. Determinação do peso seco da biomassa .....                                                                                          | 32 |
| 3.2.6. Determinação da glicose residual no meio de cultura .....                                                                            | 32 |
| 3.2.7. Extração de lipídios com clorofórmio/metanol .....                                                                                   | 33 |
| 3.2.8. Preparação dos ésteres metílicos dos ácidos graxos .....                                                                             | 33 |
| 3.2.9. Análise da composição de ácidos graxos por cromatografia gasosa .....                                                                | 34 |
| 3.2.10. Análise por padronização externa .....                                                                                              | 34 |
| 3.2.11. Padronização do inóculo para a cultura selecionada .....                                                                            | 35 |
| 3.2.12. Influência do tempo de cultivo na produção de biomassa, lipídios totais e ácido $\gamma$ -linolênico .....                          | 35 |
| 3.2.13. Influência do pH inicial do meio de cultura na produção de biomassa, lipídios totais e ácido $\gamma$ -linolênico .....             | 35 |
| 3.2.14. Efeito de diferentes fontes de carbono na produção de biomassa, lipídios totais e ácido $\gamma$ -linolênico .....                  | 36 |
| 3.2.15. Efeito de diferentes fontes de nitrogênio na produção de biomassa, lipídios totais e ácido $\gamma$ -linolênico .....               | 36 |
| 3.2.16. Efeito da presença de íons metálicos no meio de cultura na produção de biomassa, lipídios totais e ácido $\gamma$ -linolênico ..... | 36 |
| 3.2.17. Efeito da composição do meio de cultura na produção de                                                                              |    |

|                                                                                                                                           |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| biomassa, lipídios totais e ácido $\gamma$ -linolênico .....                                                                              | 37 |
| 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....                                                                                                           | 38 |
| 4.1. Atividade enzimática .....                                                                                                           | 38 |
| 4.1.1. Seleção preliminar dos fungos produtores de enzimas .....                                                                          | 38 |
| 4.1.2. Efeito da temperatura de cultivo na atividade da CMCase .....                                                                      | 40 |
| 4.1.3. Efeito do aumento do pH do meio de cultivo sobre a atividade da carboximetilcelulase .....                                         | 41 |
| 4.1.4. Efeito da temperatura de cultivo na atividade da xilanase .....                                                                    | 43 |
| 4.1.5. Efeito do aumento do pH do meio de cultivo sobre a atividade da xilanase .....                                                     | 44 |
| 4.1.6. Efeito do processo de extração na atividade da xilanase .....                                                                      | 45 |
| 4.1.7. Efeito da temperatura na atividade da xilanase de <i>C. paradoxa</i> .....                                                         | 46 |
| 4.1.8. Cultivo de <i>T. inhamatum</i> em diferentes substratos .....                                                                      | 47 |
| 4.1.9. Efeito da aplicação de ultra-som na obtenção do extrato enzimático .....                                                           | 50 |
| 4.2. Ácido $\gamma$ -linolênico .....                                                                                                     | 52 |
| 4.2.1. Isolamento de fungos produtores de ácido $\gamma$ -linolênico na Estação Ecológica de Juréia-Itatins, SP .....                     | 52 |
| 4.2.2. Seleção preliminar de fungos produtores de ácido $\gamma$ -linolênico .....                                                        | 53 |
| 4.2.3. Efeito do tempo de incubação na produção de biomassa, lipídios totais e ácido $\gamma$ -linolênico de <i>M. ramosissimus</i> ..... | 54 |
| 4.2.4. Composição relativa de ácidos graxos da linhagem de <i>M. ramosissimus</i> .....                                                   | 56 |
| 4.2.5. Efeito do pH inicial do meio de cultura na obtenção de                                                                             |    |

|                                                                                                                                                           |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| biomassa, lipídios totais e ácido $\gamma$ -linolênico de <i>M. ramosissimus</i> .....                                                                    | 57 |
| 4.2.6. Efeito de diferentes fontes de carbono na produção de<br>biomassa, lipídios totais e ácido $\gamma$ -linolênico de <i>M. ramosissimus</i> .....    | 59 |
| 4.2.7. Efeito de diferentes fontes de nitrogênio na produção de<br>biomassa, lipídios totais e ácido $\gamma$ -linolênico de <i>M. ramosissimus</i> ..... | 61 |
| 4.2.8. Efeito da presença de íons metálicos na produção de biomassa,<br>lipídios totais e ácido $\gamma$ -linolênico de <i>M. ramosissimus</i> .....      | 62 |
| 4.2.9. Efeito da composição do meio de cultura na produção de<br>biomassa, lipídios totais e ácido $\gamma$ -linolênico de <i>M. ramosissimus</i> .....   | 63 |
| 5. CONCLUSÕES .....                                                                                                                                       | 66 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....                                                                                                                          | 68 |
| APÊNDICE 1 – MEIOS DE CULTURA .....                                                                                                                       | 78 |
| APÊNDICE 2 – SOLUÇÕES E REAGENTES .....                                                                                                                   | 81 |



## RESUMO

Os fungos constituem um reino de seres vivos que vêm despertando crescentes interesses em virtude do elevado potencial em elaborar substâncias economicamente importantes, como alimentos, solventes, enzimas, vitaminas, antibióticos, ácidos graxos e outros produtos, justificando a sua aplicação biotecnológica. As atividades enzimáticas destacando-se neste trabalho a da carboximetilcelulase e da xilanase foram avaliadas em oitenta linhagens de fungos isolados do solo da Estação Ecológica de Juréia-Itatins, SP. Os fungos foram cultivados em meio de farelo de trigo a 25°C por 4 dias. As enzimas liberadas no meio de cultura foram extraídas com 30 ml de água gelada e as respectivas atividades enzimáticas foram avaliadas em unidades (U) de enzima necessária para liberar um  $\mu\text{mol}$  de glicose ou xilose por mililitro por minuto, nas condições do ensaio. As melhores atividades da carboximetilcelulase (8,38 U) e da xilanase (496,72 U) foram obtidas, respectivamente, nos cultivos com *Trichoderma longibrachiatum* (n. 31) e *T. inhamatum* (n. 33) a 28°C por 4 dias. A produção de ácido  $\gamma$ -linolênico foi avaliada em 25 linhagens de fungos zigomicetos, cultivados em meio contendo 2% de glicose e 1% de extrato de levedura, por 4 dias a 25°C. As culturas foram realimentadas com 20% de meio e permaneceram por 3 dias a 12°C. Nestas condições *Mucor ramosissimus* foi selecionado por apresentar a maior produção de ácido  $\gamma$ -linolênico (47,70  $\text{mg.l}^{-1}$ ). Analisando-se diferentes fontes de carbono e nitrogênio e a influência do pH inicial do meio de cultura, verificou-se que o uso de glicose e extrato de levedura em meio com pH inicial de 4,5, após 4 dias a 25°C sob agitação constante de 150 rpm, a produção de ácido  $\gamma$ -linolênico correspondeu a 106,44  $\text{mg.l}^{-1}$ .

## SUMMARY

The fungi constitute a group of organisms that wake up crescents interests by virtue of their high potential in elaborating substances economically important, as enzymes and fatty acids justifying for the vast biotechnology application that they offer. The CMCase and xylanase activities were evaluated in eighty isolated fungi strains in the Ecological Station of Juréia-Itatins soil, in São Paulo State. These microorganisms were cultivated in wheat bran medium at 25°C for four days. The enzymes liberated in the culture medium were extracted with 30 ml of cold distilled water. Enzyme production is expressed as units of enzyme and one unit of enzyme activity is defined as 1  $\mu\text{mol}$  glucose or xylose released per minute per milliliter of culture extract. The best CMCase (8.38 U) and xylanase (496.72 U) activities were obtained, respectively, with *Trichoderma longibrachiatum* (n. 31) and *Trichoderma inhamatum* (n. 33) after cultivations at 28°C, for four days in wheat brain medium. The  $\gamma$ -linolenic acid production was evaluated in 25 strains of zygomycetous fungi in a culture medium containing 2% glucose and 1% yeast extract, after four days of incubation at 25°C. The cultures were added with 20% (v/v) of culture medium and they stayed at 12°C for three days. In these conditions *Mucor ramosissimus* was selected by presenting the best  $\gamma$ -linolenic acid production (47.70  $\text{mg.l}^{-1}$ ). After analyzed different carbon and nitrogen sources and the influence of the initial culture medium pH, it was verified that the  $\gamma$ -linolenic acid production in the culture medium with 2% glucose and 1% yeast extract and initial pH 4.5, after four days at 25°C with a rotary shaker at 150 rpm, corresponded to 106.44  $\text{mg.l}^{-1}$ .

## LISTA DE FIGURAS

|                                                                                                                                      | Página |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| Figura 1 Vias metabólicas dos ácidos graxos essenciais das séries n-6 e n-3                                                          | 19     |
| Figura 2 Produção de biomassa e lipídios totais por <i>M. ramosissimus</i> ,<br>durante 10 dias a 25°C, a 150 rpm .....              | 54     |
| Figura 3 Produção de biomassa e consumo de glicose por <i>M. ramosissimus</i> ,<br>durante 10 dias a 25°C, a 150 rpm .....           | 55     |
| Figura 4 Produção de biomassa e lipídios totais de <i>M. ramosissimus</i> em<br>meio de cultura com diferentes pHs iniciais .....    | 58     |
| Figura 5 Produção de biomassa e consumo de glicose de <i>M. ramosissimus</i><br>em meio de cultura com diferentes pHs iniciais ..... | 58     |

## LISTA DE TABELAS

|                                                                                                                                                                                                        | Página |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| Tabela 1 Volumes das soluções para determinação das atividades enzimáticas por tubo de reação .....                                                                                                    | 28     |
| Tabela 2 Composição dos meios de cultura para avaliação da produção de biomassa, lipídios totais e ácido $\gamma$ -linolênico de <i>M. ramosissimus</i>                                                | 37     |
| Tabela 3 Atividade enzimática de fungos filamentosos isolados do solo do Banhado Grande da Estação Ecológica de Juréia-Itatins, SP, cultivados em meio de farelo de trigo por quatro dias a 25°C ..... | 39     |
| Tabela 4 Atividade da carboximetilcelulase dos fungos cultivados em diferentes temperaturas em meio de farelo de trigo após 4 dias .....                                                               | 40     |
| Tabela 5 Atividade da carboximetilcelulase dos fungos em meio de farelo de trigo, nas temperaturas ótimas de crescimento, após 4 dias .....                                                            | 41     |
| Tabela 6 Atividade da xilanase dos fungos cultivados em diferentes temperaturas em meio de farelo de trigo após 4 dias .....                                                                           | 43     |
| Tabela 7 Atividade da xilanase dos fungos em meio de farelo de trigo, nas temperaturas ótimas de crescimento, após 4 dias .....                                                                        | 45     |
| Tabela 8 Atividade da xilanase de <i>C. paradoxa</i> em diferentes processos de extração .....                                                                                                         | 46     |
| Tabela 9 Atividade da xilanase de <i>C. paradoxa</i> em diferentes temperaturas                                                                                                                        | 46     |
| Tabela 10 Atividade da xilanase de <i>T. inhamatum</i> em diferentes substratos, após 4 dias a 25°C, a extração foi realizada com 30 ml de tampão acetato de sódio 0,05 M, pH 5,0 .....                | 47     |
| Tabela 11 Aplicação de ultra-som na obtenção do extrato enzimático, após                                                                                                                               |        |

|           |                                                                                                                                                                                                               |    |
|-----------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
|           | cultivo de <i>T. inhamatum</i> em farelo de trigo, após 4 dias a 25°C ....                                                                                                                                    | 51 |
| Tabela 12 | Produção de biomassa e de ácido $\gamma$ -linolênico dos fungos cultivados em meio constituído de 2% de glicose e 1% de extrato de levedura, a 25°C .....                                                     | 53 |
| Tabela 13 | Efeito do tempo de incubação no crescimento, conteúdo de lipídios totais e produção de ácido $\gamma$ -linolênico de <i>M. ramosissimus</i> , após incubação a 25°C em meio GY, a 150 rpm ....                | 56 |
| Tabela 14 | Efeito do tempo de incubação no conteúdo de ácidos graxos de <i>M. ramosissimus</i> , após incubação a 25°C em meio GY, a 150 rpm                                                                             | 57 |
| Tabela 15 | Efeito do pH inicial no crescimento, conteúdo de lipídios totais e produção de ácido $\gamma$ -linolênico de <i>M. ramosissimus</i> , após incubação a 25°C em meio GY, a 150 rpm, por 4 dias .....           | 59 |
| Tabela 16 | Efeito de diferentes fontes de carbono no crescimento, conteúdo de lipídios totais e produção de ácido $\gamma$ -linolênico de <i>M. ramosissimus</i> , após incubação a 25°C, a 150 rpm, por 3 dias .....    | 60 |
| Tabela 17 | Efeito de diferentes fontes de nitrogênio no crescimento, conteúdo de lipídios totais e produção de ácido $\gamma$ -linolênico de <i>M. ramosissimus</i> , após incubação a 25°C, a 150 rpm, por 3 dias ..... | 62 |
| Tabela 18 | Efeito da presença de íons metálicos no meio de cultura na produção de biomassa, lipídios totais e AGL de <i>M. ramosissimus</i> , após 3 dias a 25°C, a 150 rpm .....                                        | 63 |
| Tabela 19 | Efeito da presença de íons metálicos no meio de cultura na produção de biomassa, lipídios totais e AGL de <i>M. ramosissimus</i> , após 3 dias a 25°C, a 150 rpm .....                                        | 64 |

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

| Letras gregas                            | Símbolos                                  |
|------------------------------------------|-------------------------------------------|
| Alfa .....                               | $\alpha$                                  |
| Beta .....                               | $\beta$                                   |
| Gama .....                               | $\gamma$                                  |
| Delta .....                              | $\Delta$                                  |
| Lambda, comprimento de onda .....        | $\lambda$                                 |
| Elementos químicos                       |                                           |
| Carbono .....                            | C                                         |
| Césio .....                              | Cs                                        |
| Cobre .....                              | Cu                                        |
| Manganês .....                           | Mn                                        |
| Molibdênio .....                         | Mo                                        |
| Nitrogênio .....                         | N                                         |
| Zinco .....                              | Zn                                        |
| Fórmulas químicas                        |                                           |
| Ácido clorídrico .....                   | HCl                                       |
| Cloreto de sódio .....                   | NaCl                                      |
| Cloreto de cálcio dihidratado .....      | $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ |
| Cloreto de ferro hexahidratado .....     | $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ |
| Cloreto de manganês tetrahidratado ..... | $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ |
| Fosfato de potássio dibásico .....       | $\text{K}_2\text{PO}_4$                   |
| Fosfato de potássio monobásico .....     | $\text{KH}_2\text{PO}_4$                  |
| Hidróxido de sódio .....                 | NaOH                                      |

|                                               |                                           |
|-----------------------------------------------|-------------------------------------------|
| Nitrato de amônio .....                       | $\text{NH}_4\text{NO}_3$                  |
| Nitrato de potássio .....                     | $\text{KNO}_3$                            |
| Sulfato de amônio .....                       | $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$              |
| Sulfato de cobre pentahidratado .....         | $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ |
| Sulfato de ferro heptahidratado .....         | $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ |
| Sulfato de magnésio heptahidratado .....      | $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ |
| Sulfato de manganês tetra hidratado .....     | $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ |
| Sulfato de zinco heptahidratado .....         | $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ |
| Unidades do Sistema Internacional de Unidades |                                           |
| Hora .....                                    | h                                         |
| Minuto .....                                  | min                                       |
| Segundo .....                                 | s                                         |
| Centímetro .....                              | cm                                        |
| Milímetro .....                               | mm                                        |
| Litro .....                                   | l                                         |
| Mililitro .....                               | ml                                        |
| Micro litro .....                             | $\mu\text{l}$                             |
| Quilograma .....                              | kg                                        |
| Gramma .....                                  | g                                         |
| Miligramma .....                              | mg                                        |
| Graus Celsius .....                           | $^{\circ}\text{C}$                        |
| Nanometro .....                               | nm                                        |
| Rotações por minuto .....                     | rpm                                       |
| Micromol .....                                | $\mu\text{mol}$                           |

|                                                                        |        |
|------------------------------------------------------------------------|--------|
| Nanomol .....                                                          | nmol   |
| Outras abreviaturas e símbolos                                         |        |
| Porcentagem .....                                                      | %      |
| Potencial hidrogeniônico .....                                         | pH     |
| Unidades de atividade enzimática .....                                 | U      |
| Peso por peso .....                                                    | p/p    |
| Peso por volume .....                                                  | p/v    |
| Volume por volume .....                                                | v/v    |
| Ácido 3,5 dinitro salicílico .....                                     | ADNS   |
| Ácido gama linolênico .....                                            | AGL    |
| American Type Culture Collection .....                                 | ATCC   |
| Atividade em papel de filtro .....                                     | FPase  |
| Carboximetilcelulase .....                                             | CMCase |
| Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn, The Netherlands .....     | CBS    |
| Coleção de Culturas Tropical .....                                     | CCT    |
| Culture Collection and Research Center, Taiwan .....                   | CCRC   |
| Estação Ecológica de Juréia-Itatins .....                              | EEJI   |
| Meio com glicose e extrato de levedura .....                           | GY     |
| Meio de farelo de trigo .....                                          | MFT    |
| Molar .....                                                            | M      |
| Normal .....                                                           | N      |
| Número .....                                                           | n      |
| Organização das Nações Unidas para a Educação, a Ciência e a Cultura . | UNESCO |
| Solução de Tween 80 .....                                              | T80    |



## 1. INTRODUÇÃO

Os ecossistemas naturais abrigam uma biota diversificada, cujos componentes, em sua maioria, continuam desconhecidos e inexplorados. Esses ecossistemas devem ser estudados e portanto, devem ser preservados ou conservados, oferecendo assim, a oportunidade de conhecê-los melhor. As informações resultantes desses estudos possivelmente contribuirão para melhor entendimento, sobre os processos envolvidos na manutenção do equilíbrio desses ecossistemas e poderão subsidiar modelos de gestão, quando forem necessários.

Sem dúvida, as regiões tropicais são aquelas que abrigam a maior biodiversidade do planeta. A devastação dessas regiões preocupa não somente pela extinção em massa de espécies animais, vegetais e das comunidades microbianas, mas também pelas modificações ambientais desencadeadas. Por exemplo, mudanças nos padrões pluviométricos, erosão do solo, direção e velocidade dos ventos e aumento na emissão de gás carbônico na atmosfera, provocam o efeito estufa e contribuem finalmente, para as mudanças climáticas globais.

Apesar de algumas medidas governamentais, administrativas e legislativas, a velocidade de degradação das Áreas de Preservação Ambiental continua sendo muito

grande. Isto resulta do enorme desconhecimento de que o Homem, assim como os demais seres vivos, estão inseridos nos diferentes biomas, não havendo separação deles dos ambientes onde vivem. É comum ouvir discursos como “O social não deve ser abandonado devido às questões ambientais”, frases como esta, refletem o desconhecimento e o descaso em relação às questões ambientais, uma vez que os processos que devem ser estabelecidos para a saúde e educação estão intimamente ligados às mesmas.

Em geral, as áreas ainda intactas foram transformadas em unidades de conservação, como os parques e estações de proteção ecológica, para garantir a existência e o reduto de vegetais e/ou animais selvagens, como a Estação Ecológica de Juréia-Itatins (EEJI), que abrange grande extensão do que restou da Mata Atlântica paulista.

Originalmente, a Mata Atlântica formava uma faixa de mata contínua desde o Rio Grande do Norte até o Rio Grande do Sul. Hoje é um dos biomas mais ameaçados do planeta, restando aproximadamente 7% da sua cobertura original e apenas 2% dos remanescentes correspondem às áreas de conservação (BDT, 2000).

Para o mundo, a Mata Atlântica é um conjunto de ecossistemas que a Organização das Nações Unidas para a Educação, a Ciência e a Cultura, UNESCO, elevou à categoria de Reserva da Biosfera, Patrimônio Ambiental de todos os povos, numa tentativa de se conter o desmatamento, favorecer o levantamento da biodiversidade existente e estabelecer planos de manejo para a região.

Na Mata Atlântica vivem muitas espécies de vegetais e animais ameaçadas de extinção, onde o endemismo é altíssimo e a taxa de biodiversidade é gigantesca. Isso significa que pode haver mais bactérias, fungos, protozoários e algas nesta mata, em

relação a um solo europeu ou norte-americano com a mesma extensão. Esta rica biodiversidade, não somente representa enorme informação para compor um banco de genes, mas também uma grande contribuição à medicina, à agricultura, à indústria e ao equilíbrio ecológico do planeta.

A Estação Ecológica de Juréia-Itatins (EEJI), inserida no Vale do Ribeira, faz parte do Complexo Estuarino Lagunar, que estende se por uma faixa de duzentos quilômetros em linha reta, do litoral sul do Estado de São Paulo ao norte do Paraná, entre os municípios de Peruíbe, Iguape, Cananéia e Paranaguá. Apresenta 79.245 hectares e sua cobertura vegetal permanece, em grande parte, primitiva e intocada, reunindo uma associação interessante de ecossistemas que existiam no litoral do Estado de São Paulo antes da intensa urbanização. A EEJI possui matas de restinga, manguezais, zona costeira, campos de altitude, matas ciliares, banhados, além da própria mata atlântica. Esta última no Vale do Ribeira consta de dois terços de todos os seus remanescentes originais (CAPOBIANCO, 1992).

Associando a importância em se conservar áreas naturais, e conseqüentemente sua biodiversidade, com o desenvolvimento da biotecnologia de um país, decorreu o interesse em se investigar os microrganismos do solo da EEJI. As comunidades microbiológicas de um ecossistema devem ser conhecidas através de técnicas que possibilitem o isolamento, identificação e a caracterização de suas espécies. Essas podem ser exploradas através de suas potencialidades na elaboração de substâncias, com aplicações diversas nas indústrias químicas, farmacêuticas e alimentícias. Os microrganismos podem ser utilizados no tratamento de resíduos, explorando entre outras características, o potencial de complexo enzimático produzido pelas vias metabólicas e que vem despertando crescente interesse em aplicações industriais.

Os fungos, constituem materiais biológicos ideais por sua importância ambiental, pela enorme contribuição para o entendimento dos processos genéticos, para estudos de ecologia microbiana, em aplicações biotecnológicas e até mesmo como possíveis indicadores ambientais. Os fungos constituem um grupo numeroso de espécies, mas ainda pouco estudado, porém de grande interesse biotecnológico. Por apresentarem diversidade morfológica e fisiológica típica e um importante papel onde se encontram na natureza e representam vastas possibilidades de aplicações em biotecnologia, talvez sejam eles, dentre os seres vivos, aqueles que mais têm contribuído com produtos e processos de importância fundamental para o bem-estar das populações humanas.

Estima-se que existam acima de um milhão e quinhentos mil espécies de fungos espalhadas pelo mundo. Este número é superior ao de todas as espécies de vegetais e de animais somadas, excluindo-se os insetos. Contudo, apenas cerca de setenta mil espécies de fungos foram até hoje descritas, ou seja, menos de 5% das possivelmente existentes (HAWKSWORTH, 1991). Se entre estes 5%, existem muitas espécies de grande importância, como as que são utilizadas na fabricação de alimentos, bebidas, ácidos orgânicos, fármacos e inúmeros outros produtos, pode-se imaginar o que poderá proporcionar a descoberta de novas espécies, com distintas propriedades potencialmente de valor biotecnológico. Em particular no Brasil, que é um país que possui a maior biodiversidade do mundo, a busca de novas espécies de fungos deverá produzir resultados extremamente interessantes sob o ponto de vista biotecnológico.

Uma das áreas de interesse biotecnológico é a decomposição dos materiais celulósicos, devido ao importante papel no processo de reciclagem de nutrientes, em ambientes terrestres, especialmente no ciclo do carbono. Neste aspecto, destacam-se as

atividades das comunidades fúngicas, das quais espécies celulolíticas e xilanolíticas têm sido muito investigadas, algumas já utilizadas industrialmente, outras com grande potencial para o mesmo fim.

Ressalta-se ainda a importância dos fungos na produção de ácidos graxos poliinsaturados, entre estes, os ácidos graxos essenciais, que são requeridos para manutenção estrutural de todas as membranas do corpo e por alguns serem precursores de substâncias reguladoras, as prostaglandinas. Constitui grande interesse a produção do ácido  $\gamma$ -linolênico obtido por dessaturação do ácido linoléico, e que pode ser encontrado no óleo de sementes de certas plantas, e também ser produzido por alguns fungos filamentosos. Este ácido vem despertando interesse de muitos pesquisadores, devido ao seu crescente uso nas indústrias farmacêuticas e de cosméticos.

#### Objetivos:

- verificar a potencialidade biotecnológica de espécies de fungos filamentosos isoladas do solo sob vegetação de mata nativa, da região do Banhado Grande, na Estação Ecológica de Juréia-Itatins, SP, onde houve pouca ou quase nenhuma interferência antrópica;
- estudar a atividade enzimática, com destaque para as atividades da celulase e da xilanase, em condições de cultivo variáveis; e,
- isolar espécies de fungos zigomicetos para verificar possível produção de ácidos graxos, enfatizando a produção do ácido  $\gamma$ -linolênico.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1. Fungos e ecologia

Conhecidos pelos nomes populares de bolores, mofos, leveduras e cogumelos, os fungos interferem e influenciam constantemente nas atividades antrópicas diárias. Até o momento não há uma definição adequada para eles, contudo, podem ser caracterizados por certos atributos comuns que unem organismos diferentes como leveduras e cogumelos comestíveis. Diferenciam-se dos demais seres vivos por apresentarem formas extremamente diversas e estilos de vida singulares. Constituem um grupo de organismos heterotróficos e quimiorganotróficos destituídos de clorofila, apresentam paredes celulares definidas, são imóveis, não possuem caule, raízes ou folhas e não desenvolvem sistema vascular complexo. Armazenam glicogênio como principal fonte de energia e exibem nutrição por absorção.

Os fungos são geralmente filamentosos e multicelulares. O corpo do fungo ou soma é constituído por filamentos tubulares microscópicos, as hifas, que coletivamente são denominadas de micélio. As estruturas somáticas exibem pouca diferenciação e praticamente nenhuma divisão de funções. As estruturas reprodutivas são diferenciadas

das somáticas e exibem uma variedade de formas, servindo como base para a classificação (ALEXOPOULOS et al., 1996).

Os fungos exibem reprodução sexuada e assexuada de diversas formas e assim possuem divisões celulares do tipo mitose e meiose, tendo sempre como produto final os esporos, que são órgãos de reprodução, resistência e disseminação. A produção rápida das estruturas de reprodução assexuada garante a disseminação e a colonização dos substratos, enquanto que a reprodução sexuada garante a variabilidade genética através do processo meiótico. Estes dois processos de reprodução, acrescido da parassexualidade que é a recombinação genética na mitose, permitem aos fungos a capacidade de adaptarem-se às diversas condições ambientais, algumas consideradas extremamente inóspitas (BONONI, 1998).

O hábitat dos fungos é muito diversificado. Os fungos são cosmopolitas, apesar de alguns só sobreviverem em faixas ecológicas restritas, por desenvolverem alta especificidade com o substrato, dificultando o seu isolamento, identificação e manutenção em laboratório. Como um grupo, exibem uma notável habilidade em utilizar quase todas as fontes de carbono como nutrientes, obtém energia a partir de matéria orgânica inanimada; podem ser sapróbios, parasitas de plantas, de animais e de outros fungos, e simbioses. Alguns são aquáticos, vivendo principalmente em água doce, contudo também são encontrados em água salgada.

A grande maioria dos fungos é encontrada em ambientes terrestres, no solo ou sobre matéria orgânica em decomposição, exercendo importante papel na mineralização do carbono orgânico na natureza. Desse modo, a atividade fúngica é amplamente responsável pela fertilidade do solo. Colonizam substratos naturais e sintéticos em diversos ambientes, decompõem resíduos complexos de plantas e animais,

transformando-os em formas químicas mais simples, que retornam ao solo. Tais substâncias são, então, absorvidas pelas gerações vegetais subseqüentes ou por outros representantes da microbiota. (PELCZAR et al., 1981).

Os esporos fúngicos, transportados pelo ar, são freqüentemente incômodos contaminadores de culturas bacterianas. De fato, foi um desses contaminantes em uma cultura de estafilococos que levou à descoberta da penicilina. Alguns são fitopatogênicos, causando a maioria das doenças economicamente significativas, podendo atacar plantas adultas ou em senescência ou ainda, atuar como invasores secundários. A ferrugem da batata, por exemplo, levou à morte por inanição cerca de um milhão de pessoas na Irlanda, no século XIX (KOBAYASHI, 1979).

Os fungos são os agentes causadores da biodeterioração mais importantes presentes na face da Terra. São hábeis em atacar materiais naturais, refinados ou processados. Isto é particularmente verdadeiro nos ecossistemas de florestas, onde eles decompõem celulose e lignina, os principais componentes das madeiras. Na realidade, a produção de biomassa em um ecossistema de floresta é grandemente controlado pelos fungos apodrecedores de madeira, já que estes organismos determinam as taxas dos nutrientes liberadas para o ecossistema, após a morte das árvores.

Além da importância como decompositores nos ecossistemas florestais, os fungos são os agentes responsáveis pela destruição de uma ampla variedade de produtos de madeira, incluindo tábuas, dormentes de estrada de ferro, postes telefônicos, entre outros. São capazes de crescer até mesmo em graxa de sapato e almofada retentora de tinta. Devido à capacidade de utilizar substratos distintos como fonte de alimento, os fungos são capazes de atacar muitos produtos industrializados, tais como tecidos, mercadorias de couro, derivados de petróleo, incluindo certos combustíveis e



lubrificantes e certamente todos os gêneros alimentícios (ALEXOPOULOS et al., 1996).

Antes do acidente nuclear de Chernobyl em 1986, o solo era contaminado com  $^{137}\text{Cs}$ , originado, principalmente, dos testes com armas nucleares. Um levantamento de fungos em 1974, em cinco países da Europa, revelou que os basidiomas de *Paxillus* acumularam  $^{137}\text{Cs}$  de maneira espécie específica com o píleo mais radioativo do que a estipe. *P. filamentosus*, por exemplo, não acumulou  $^{137}\text{Cs}$  ao contrário do observado com *P. involutos*. O conteúdo médio de  $^{137}\text{Cs}$  encontrado no basidioma foi de 3,0 a 4,8 vezes maior ao encontrado antes do acidente de Chernobyl. Atualmente estas espécies são utilizadas como indicadores biológicos para monitorar a contaminação radioativa da biosfera (HASELWANDTER et al., 1988).

Os tipos e a diversidade de espécies que se desenvolvem em uma determinada região são características do ambiente natural. A microbiota de um determinado ambiente realiza muitas transformações bioquímicas essenciais para o funcionamento normal do ecossistema. Os resíduos regularmente depositados na superfície do solo são utilizados pela microbiota presente e transformados em novas substâncias. Os microrganismos constituem uma ligação entre os constituintes inanimados do solo e os seres vivos. A natureza dinâmica é perceptível quando verificam-se a diversidade e a finalidade das modificações microbianas que ocorrem no solo (PELCZAR et al., 1981).

Estudos realizados com adição de vinhaça no solo, demonstraram que este resíduo estimula visivelmente a microbiota do mesmo, com predominância dos fungos, principalmente dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* (NEVES, et al., 1983). A adição de doses cumulativas de vinhaça acarretou um acréscimo dos números de fungos filamentosos, bactérias e de actinomicetes, em solo sob vegetação de cerrado (COSTA,

1983; TAUKE & RUEGGER, 1987) e das atividades da amilase e da celulase em latossolo vermelho amarelo, durante seis anos (TAUK et al., 1990).

Considerando-se a importância dos fungos e a contribuição para o conhecimento da biodiversidade destes em solos de regiões de clima tropical, foram realizados isolamentos e identificações de fungos celulolíticos do solo (ATTILI, 1994), de fungos filamentosos (GARLIPP, 1995) e de fungos xilófagos de podridão branca (GIANNOTTI, 1997), na região do Banhado Grande da EEJI, SP.

A quantificação da comunidade microbiana no solo é, em geral, um processo complexo, pois os microrganismos estão geralmente ligados aos minerais do solo e a matéria orgânica. Desse modo, uma informação valiosa na estrutura comunitária pode ser obtida medindo-se os biomarcadores, que são componentes bioquímicos de células microbianas e seus produtos extracelulares. Para os fungos utiliza-se como biomarcador o ergosterol, que possibilita a quantificação da biomassa fúngica (ALEF & NANNIPIERI, 1995).

## **2.2. Fungos e biotecnologia**

Os fungos são organismos que contribuem para uma grande variedade de aplicações a favor do progresso do homem. A fermentação microbiana fornece inúmeros alimentos, bebidas e produtos químicos que fazem parte da sociedade moderna. Entre os produtos atualmente utilizados comercialmente estão: enzimas, antibióticos, aminoácidos, ácidos orgânicos, ácidos graxos, polissacarídeos, vitaminas, molhos de soja, cervejas, vinhos, conhaques, álcoois destilados, pães, queijos, alimentos fermentados, cogumelos comestíveis, condimentos, corantes para alimentos, proteína

microbiana, combustíveis (álcool, biogás), conservantes, herbicidas e pesticidas (HAWKSWORTH, 1991).

A alimentação humana exemplifica uma das utilizações mais antigas dos fungos. Cogumelos coletados em florestas e campos têm sido consumidos por povos micófilos há milênios. As espécies mais exploradas comercialmente são: *Agaricus bitorquis*, *Agaricus brunnescens*, *Agaricus campestris*, *Auricularia fuscusuccinea*, *Boletus edulis*, *Flammulina velutipes*, *Lentinus edodes*, *Pleurotus ostreatus* e *Volvariella volvacea* (BONONI & TRUFEM, 1985). *Tricholoma matsutake* é outra espécie explorada comercialmente (HAWKSWORTH & KIRSOP, 1988). No Brasil, a primeira espécie a ser cultivada foi o “champignon” de Paris, *Agaricus bisporus*. Outras espécies atualmente cultivadas são o caetetuba ou cogumelo gigante, *P. ostreatus* e o “shiitake”, *L. edodes* (BONONI et al., 1995). O número de espécies comestíveis, provavelmente, excede a quinhentos, mas muitas se encontram restritas a um uso regional.

### 2.2.1. Enzimas

Devido ao modo de nutrição por absorção, os fungos devem inicialmente liberar enzimas digestivas no ambiente externo. Estas enzimas quebram moléculas grandes e relativamente insolúveis como os carboidratos, proteínas e lipídios em moléculas pequenas e mais solúveis que podem ser absorvidas.

As enzimas microbianas ocupam um papel crucial na ciclagem de nutrientes, realizando uma variedade de reações de fixação, oxidação, redução e hidrólise na conversão da matéria orgânica necessária para a manutenção de equilíbrio num ecossistema.

A biomassa vegetal, constituída basicamente de celulose, hemicelulose e lignina, é o único recurso natural que tem um ciclo de reposição suficientemente rápido para sustentar a demanda do mercado mundial de produtos bioquímicos e químicos, inclusive combustíveis. Os resíduos lignocelulósicos têm sido considerados como fonte promissora para produção de etanol, pela abundância e facilidade de serem encontrados na natureza e nos resíduos agro-industriais. Como consequência, muitas pesquisas foram desenvolvidas visando aumentar a produção de enzimas celulolíticas, seja através dos métodos tradicionais, quanto por alternativas resultantes de extensos estudos (KIM et al., 1997).

Os fungos filamentosos são particularmente interessantes industrialmente como produtores de celulasas e xilanases, por excretarem no meio de cultura tais enzimas. A produção destas é normalmente alta em relação às leveduras ou bactérias. Os fungos tipicamente produtores de xilanases produzem muitas enzimas xilanolíticas acessórias, que são necessárias para o branqueamento das xilanas. Um importante fator para a produção eficiente de xilanases é a escolha de um apropriado substrato indutor, quer seja insolúvel ou solúvel, bem como a otimização da composição do meio.

O substrato pode induzir também a formação de enzimas celulolíticas em determinados organismos. Parâmetros desse bioprocessos, como pH, temperatura ou a agitação do cultivo podem afetar a produtividade da atividade das xilanases durante a fermentação (HALTRICH et al., 1996).

A degradação microbiológica da celulose constitui-se na maior fonte de carbono para o solo. Considerando-se os materiais naturais, a celulose compõe o biopolímero mais abundante do mundo, apresentando uma quantidade global estimada em  $26,5 \cdot 10^{10}$  toneladas. Constitui-se em um polissacarídeo linear formado por resíduos

de D-glicose unidos através de ligações glicosídicas  $\beta$ -1,4, ocasionalmente ligados transversalmente a cadeias similares, através de pontes de hidrogênio, formando microfibrilas (TEUNISSEN & CAMP, 1993).

Muitos microrganismos podem crescer sobre celulose, produzindo enzimas que podem degradar derivados solúveis de regiões amorfas da celulose. Poucos sintetizam, contudo, um sistema enzimático completo que efetivamente hidrolisam materiais cristalizados encontrados na natureza. O sistema celulase, que envolve a degradação total da celulose, conta com a ação de três grupos de enzimas: C1 ou avicelase ( $\beta$ -1,4-exocelobiohidrolase ou  $\beta$ -1,4-D-glucano-celobiohidrolase, E.C.3.2.1.91), que iniciam o processo e agem sobre a celulose nativa resultando principalmente em celobiose; Cx ou CMCase ( $\beta$ -1,4-endoglucanase ou  $\beta$ -1,4-glucano glucanohidrolase, E.C.3.2.1.4), as quais clivam os polímeros parcialmente degradados, resultando na formação de glicose, celobiose e outros oligômeros; e celobiasas ou  $\beta$ -1,4-glucosidasas ( $\beta$ -D-glicosídeo glucohidrolase, E.C.3.2.1.21), que age sobre a degradação da celobiose e outros oligômeros menores, formando a glicose (GONG & TSAO, 1979; TEUNISSEN & CAMP, 1993).

Em geral, os fungos que decompõem substâncias celulósicas ocorrem no solo, colonizando os vegetais, suas raízes e resíduos, com a importante função de reciclar os nutrientes. A atividade fúngica depende do conteúdo de matéria orgânica do solo, a qual determina sobremaneira a ocorrência e a distribuição da microbiota.

A susceptibilidade da celulose à degradação depende de condições ambientais e de sua forma física e química. A celulose manufaturada torna-se mais susceptível por ser deslignificada e apresentar sua molécula menos cristalina. Quanto maior o número de sítios amorfos ao longo da macromolécula, mais vulnerável ela se torna. Existem

formas modificadas da celulose como: raiom, celofane, filme fotográfico e carboximetilcelulose, utilizada em adesivos e emulsões de tintas (ALLSOPP & SEAL, 1986).

As hemiceluloses são os polissacarídeos mais abundantes encontrados na natureza depois da celulose, ocorrem abundantemente nas paredes das plantas, entremeadas entre a celulose e a lignina. As hemiceluloses são polímeros lineares ou ramificados contendo de dois a seis diferentes açúcares ou seus derivados. Estes incluem algumas hexoses (D-glicose, D-galactose, D-manose), poucas pentoses (D-xilose, L-arabinose) e ácido D-glicurônico. Há distintas diferenças entre a composição das hemiceluloses de uma planta para outra e, em particular, diferenças distintas entre as hemiceluloses de madeiras moles e madeiras duras (MOORE-LANDECKER, 1996).

O componente primordial das hemiceluloses é a xilana que corresponde de 20% a 35% do peso seco total da parede celular de madeiras duras e plantas anuais como milho, rami e cana-de-açúcar. Em madeiras moles compreendem 8% do peso seco, aproximadamente. As xilanas constituem-se principalmente de xilose e arabinose (HALTRICH et al., 1996).

As atividades das xilanases podem ser realizadas por diferentes organismos, incluindo os fungos filamentosos e as leveduras. Em escala industrial, as xilanases são produzidas principalmente por várias espécies de fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Trichoderma* (HALTRICH et al., 1996).

As enzimas que degradam xilana, classificam-se de acordo com seus mecanismos de ação. A endoxilanase ( $\beta$ -1,4-D-xilana xilanoidrolase, E.C.3.2.1.8) hidrolisa as ligações  $\beta$ -1,4-D-xilanopiranosídicas enquanto que a  $\beta$ -1,4-xilana

xiloidrolase, E.C.3.2.1.37) hidrolisa os xilo-oligossacarídeos produzidos pelas endoxilanases (TEUNISSEN & CAMP, 1993).

Recentemente, as xilanases de fungos têm despertado maior atenção do que as de origem bacteriana. *Trichoderma longibrachiatum* é citado como uma espécie xilanolítica promissora. Demonstrou-se que este fungo geralmente produz alta quantidade de xilanases e baixa de celulasas, quando cultivado em substrato lignocelulósico. Os autores não observaram, entretanto, atividade xilanolítica sem atividade celulolítica, provavelmente devido à íntima relação que existe entre hemicelulose e celulose na biomassa vegetal (ROYER & NAKAS, 1990).

Na indústria de papel e celulose as xilanases de fungos e de bactérias auxiliam no branqueamento, facilitando a remoção da lignina, sem prejuízo para a polpa de papel. Além disso, o uso das xilanases estende-se à clarificação de sucos e vinhos, extração de café, óleos vegetais e amido, para o aumento do teor nutricional de silos e grãos ou para conceder textura a derivados lácteos. Polpa de madeira dissolvida pode ser usada para se obter produtos celulósicos como acetato, celofanes e raions (WONG & SADDLER, 1992).

As enzimas xilanolíticas em associação com celulasas podem remover paredes das células vegetais, liberando seu conteúdo para produção de substâncias responsáveis por sabor e aroma, polissacarídeos e proteínas de sementes e folhas, ou simplesmente produzindo protoplastos de plantas superiores, para uso em pesquisas genéticas. Ainda combinadas essas enzimas podem ser utilizadas para o melhoramento da extração a frio de óleo de sementes, produção de sucos de frutas e vegetais, clarificação de sucos de frutas e melhoramento da reidratação de vegetais secos, na indústria alimentícia. As

xilanases também podem ser usadas na fabricação de café solúvel, chá e vinho (TEUNISSEN & CAMP, 1993).

Uma outra aplicação das xilanases envolve a degradação parcial de alimentos para animais ruminantes e monogástricos, que se realizada por microrganismos xilanolíticos, além de melhorar a digestibilidade por tornar a celulose mais acessível e liberar açúcares mais facilmente metabolizáveis, melhora também o valor nutricional desses alimentos, devido à produção de biomassa microbiana (TEUNISSEN & CAMP, 1993).

### **2.2.2. Lipídios e ácido g-linolênico**

O termo lipídio, tradicionalmente, tem sido usado para descrever uma variedade de compostos naturais, incluindo os ácidos graxos e seus derivados, esteróides, terpenos, carotenóides e ácidos biliares, que têm em comum a pronta solubilidade em solventes orgânicos, tais como: hexano, benzeno, clorofórmio ou metanol (CHRISTIE, 1982; KATES, 1982).

Muitos lipídios contêm glicerol, que podem ser esterificados com uma, duas ou três moléculas de ácidos graxos e formar, respectivamente, monoglicerídios, diglicerídios ou triglicerídios. Os lipídios podem estar combinados na natureza com outros compostos, tais como: proteínas, aminoácidos ou polissacarídeos. Geralmente os triglicerídios e seus ácidos graxos compreendem uma grande fração dos lipídios produzidos por fungos. Os ácidos graxos podem compreender até 88% da fração lipídica, e dentre eles, os compostos com dezesseis e dezoito carbonos são mais abundantes. Os ácidos graxos insaturados (especialmente oléico e linoléico) predominam sobre os ácidos graxos saturados (MOORE-LANDECKER, 1996).



Nos microrganismos, os lipídios são sintetizados durante a fase de crescimento como parte de seu processo metabólico e como reserva de carbono. A composição, qualidade e quantidade de lipídios variam de espécie para espécie de acordo com as condições de cultivo, disponibilidade de nutrientes e com o estágio de crescimento.

A pesquisa sobre lipídios de microrganismos serve como base para a identificação e exploração de oportunidades biotecnológicas, que incluem o desenvolvimento de produtos economicamente competitivos, processos e aplicações. A produção de lipídios por microrganismos tem sido objeto de estudo de vários pesquisadores nestes últimos anos. A maioria dos trabalhos foi desenvolvida com espécies de leveduras. Os fungos filamentosos, contudo, apresentam produções de lipídios desejáveis devido ao fato de apresentarem altos teores de lipídios contendo composição não usual de ácidos graxos tanto de cadeias curtas, quanto de cadeias longas (HANSSON & DOSTÁLEK, 1988).

O processo de extração, na obtenção de lipídios de microrganismos, é uma etapa importante que deve ser completa e sem o aparecimento de ácidos graxos livres durante o processo. Os microrganismos possuem uma grande quantidade de ácidos graxos livres na porção lipídica e estes materiais são extremamente tóxicos e sua presença indica que lipases e fosfatases estão ativas. A extração de lipídios de microrganismos exige a ruptura celular que pode ser realizada através de processos químicos, físicos ou bioquímicos. Um fator determinante que deve ser levado em consideração no processo de extração é a escolha dos solventes. Na maioria dos casos é usada uma mistura de solventes visando maior eficiência de extração.

Uma extração efetiva dos lipídios da biomassa é realizada com células fisiologicamente ativas, pois células cultivadas há muitos dias ou que estejam na fase

estacionária de crescimento podem se degenerar, pois neste estado pode ocorrer autólise parcial de lipídios e de outros constituintes celulares. Quando proteínas ou carboidratos são utilizados ou degradados o conteúdo lipídico celular aumenta. Pela mesma razão, as células para análise não devem esperar muito tempo após serem separadas. Poucas horas na temperatura ambiente podem provocar mudanças na composição dos lipídios das células, como também, amostras deixadas sob refrigeração por doze horas podem apresentar mudanças significativas na composição celular (CHRISTIE, 1982).

Durante a etapa de extração devem ser levados em consideração alguns fatores importantes para a manutenção da estrutura química dos lipídios extraídos, de modo que haja uma eficiência no aproveitamento dos lipídios que serão analisados. Um dos pontos a se destacar é a presença de insaturações na cadeia de carbono. Quanto maior for o número de insaturações maior será a probabilidade de ocorrer peroxidações, reações estas que uma vez iniciadas são autocatalíticas. Neste caso os solventes deverão ser destilados antes de sua utilização e neles adicionados substâncias antioxidantes e o processo de extração deve ser realizado em atmosfera de nitrogênio, para prevenir tais reações (CHRISTIE, 1982; KATES, 1982).

Os ácidos graxos essenciais são componentes estruturais das membranas celulares, proporcionando estabilidade e controlando o movimento de todas as substâncias para dentro e para fora das células. São indispensáveis para a atividade celular e, conseqüentemente, para o bom desempenho do organismo.

Os ácidos graxos essenciais apresentam duas ou mais duplas ligações na cadeia de carbono. Existem dois grupos que são definidos pela posição da primeira dupla ligação da molécula, iniciando no átomo de carbono do final metílico da cadeia: os grupos n-6 e n-3. Os ácidos graxos linoléico (18:2; 9,12) da série n-6 e ácido  $\alpha$ -

linolênico (18:3; 9,12,15) da série n-3 (Figura 1), quando ingeridos na dieta são metabolizados por uma série de enzimas dessaturases, que introduzem uma dupla ligação, e elongases, que introduzem dois átomos de carbono, originando diversos metabólitos (HORROBIN, 1992).

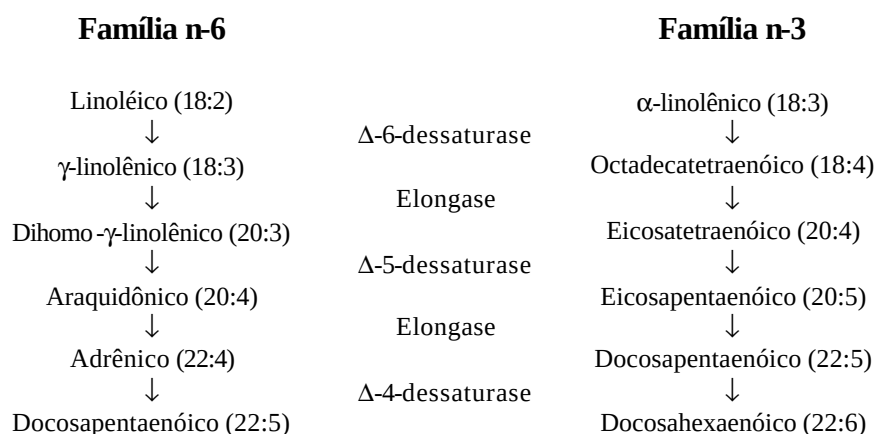


FIGURA 1. Vias metabólicas dos ácidos graxos essenciais das séries n-6 e n-3. Fonte: HORROBIN, 1992.

Um ácido graxo essencial que, atualmente, apresenta interesse crescente é o ácido  $\gamma$ -linolênico (AGL), por ser um precursor da prostaglandina  $E_1$ . Esta prostaglandina demonstrou, clinicamente, ser capaz de reduzir a inflamação, inclusive de origem reumática, dilatar veias e abaixar a pressão sanguínea, reduzir os níveis de colesterol e a formação de trombos. Pode ainda aliviar a depressão em indivíduos depressivos, devido à ação moduladora sobre o sistema nervoso e atuar na ativação da gordura marrom, que funciona como aceleradora da queima de gorduras, facilitando a perda de peso. Dentre os diversos distúrbios causados pela deficiência em AGL está a tensão pré-menstrual (PRÍMORIS<sup>1</sup>, 1996). Em humanos, este ácido graxo é requerido

<sup>1</sup> PRÍMORIS. Paraná, Herbarium Laboratório Botânico Ltda, 1996. (Bula).

para a síntese de ácido araquidônico e prostaglandinas. O AGL é correntemente proporcionado pela dieta através do leite e carne (DUBACQ & PHAM-QUOC, 1993).

O AGL ou ácido cis,cis,cis-6,9,12-octadecatrienóico é um ácido graxo essencial de dezoito carbonos com três insaturações que pertence à série  $n-6$ , a qual é definida pela posição da primeira dupla ligação da molécula iniciando no átomo de carbono do final metílico da cadeia. Este ácido é obtido pela dessaturação do ácido linoléico, pela ação da enzima  $\Delta$ -6-dessaturase (FUKUDA & MORIKAWA, 1987; HANSSON & DOSTÁLEK, 1988; GUIL-GUERRERO et al., 2000).

O óleo contendo AGL pode ser extraído de sementes de prímula (*Oenothera biennis* e/ou *O. lamarckiana*), de sementes de borragem (*Borago officinalis*) e de sementes de groselha preta (*Ribes nigrum*) (GUNSTONE, 1992). Contudo, a produtividade de AGL de sementes é extremamente baixa, variando de 9% no óleo de prímula a 19% nos óleos de borragem e groselha preta (HORROBIN, 1992), devido ao longo período da cultura e a enorme área requerida para o plantio, mas o AGL pode ser também sintetizado por fungos da ordem Mucorales (SHAW, 1965; AGGELIS et al., 1987, 1988, 1990 e 1991), como o óleo extraído de *Mucor javanicus* comercializado no Reino Unido (GUNSTONE, 1992) ou de outros fungos ainda não investigados. O AGL pode ser também obtido de algas como a alga verde *Chlorella* sp (MIURA et al., 1993), contudo é menos abundante e misturado com outros isômeros. Outra fonte de AGL é a cianobactéria *Spirulina platensis* que parece ser uma das únicas a apresentar um ácido graxo com três insaturações (DUBACQ & PHAM-QUOC, 1993).

*Mucor mucedo*, *Mucor plumbeus*, *Mortierella ramanniana* e *Rhizopus arrhizus* foram cultivados em meio de cultura contendo maltose, lactose, glicose, amido solúvel e acetato de sódio como única fonte de carbono. Comparando-se a produção de lipídios e

a composição dos ácidos graxos das espécies testadas, observou-se que a glicose e a maltose proporcionaram lipídios com grande proporção de ácidos graxos saturados enquanto que a lactose, o glicerol e o amido acarretaram lipídios insaturados com um alto teor de AGL (SAJBIDOR et al., 1988).

O acúmulo de lipídios, a composição de ácidos graxos e a produção de AGL foram investigadas em 28 linhagens de fungos pertencentes aos Mucorales. O teor lipídico variou de 5% a 30% da biomassa seca e a porcentagem de AGL no total do lipídio intracelular situou-se na faixa de 2,5% a 15,4% (p/p). As melhores produções de AGL na biomassa, foram encontradas em *Mucor mucedo* CCF-1384 (28,4 mg.g<sup>-1</sup>) e *Cunninghamella echinulata* CCF-103 (25,1 mg.g<sup>-1</sup>) (CERTÍK et al., 1993a).

A influência de doze fontes individuais de carbono e seis de nitrogênio sobre o crescimento, conteúdo de lipídios e composição de ácidos graxos foi investigada em *Mucor mucedo* CCF-1384. O melhor crescimento foi observado em maltose e o rendimento da produção de lipídios diminuiu na seguinte ordem: maltose, amido hidrolisado, glicose, glicerol, xilose, etanol, amido, sacarose, frutose, lactose, metanol e galactose. Os substratos com N orgânico foram mais benéficos para o crescimento do que as fontes inorgânicas. As análises dos ácidos graxos mostraram acumulação preferencial de ácido oléico e linoléico apesar das fontes de N e C utilizadas, e ainda, a natureza do substrato afetou particularmente o conteúdo de AGL (CERTÍK et al., 1993b).

Análises de lipídios foram realizadas em 28 linhagens de várias espécies de fungos, do gênero *Mucor*, em frascos agitados, com glicose como fonte de carbono. O conteúdo de AGL na fração de lipídios neutros em algumas espécies foi superior a 38 mg.g<sup>-1</sup> de biomassa seca (ROUX et al., 1994).

A efetividade dos métodos empregando hidróxido de potássio alcoólico e clorofórmio/metanol na extração de lipídios de microrganismos, foi comparada utilizando-se vinte diferentes linhagens de fungos. Em geral, a quantidade de lipídios extraídos pelo primeiro método foi, aproximadamente, duas vezes maior do que no segundo. As linhagens com mais de 15% de AGL nos lipídios foram: *Absidia corymbifera* CCRC 31601, *Mucor rouxii* CCRC 30546, *Mucor genevensis* CCRC 31383, *Mucor ambiguus* CCRC 31392, *Conidiobolus coronatus* CCRC 31346 e *Cunninghamella echinulata* CCRC 31840. A adição de uma quantidade apropriada de extrato de leveduras ao meio aumentou a biomassa, produção de lipídios, AGL, ácido araquidônico e o grau de insaturação dos lipídios. *C. echinulata* CCRC 31840 produziu a maior quantidade de AGL (577 mg.l<sup>-1</sup>), enquanto que *M. alpina* CBS 213.32 a maior quantidade de ácido araquidônico (141 mg.l<sup>-1</sup>) com adição de 0,7% e 1,0% de extrato de leveduras, respectivamente (CHEN & CHANG, 1994).

A influência de diferentes tensões de oxigênio dissolvido foi investigada na produção de equivalentes de manteiga de cacau e AGL por *Mucor circinelloides* f. *circinelloides* CBS 108.16, em culturas com nitrogênio limite, realimentadas, pH controlado e ácido acético como fonte de carbono. As tensões de oxigênio de 8% e 10% foram ótimas para produção de óleo e lipídios neutros. O conteúdo de AGL diminuiu, gradualmente, de 12,4% para 4,6% em relação à fração de lipídios neutros quando a tensão de oxigênio dissolvido diminuiu de 35% para 5% (ROUX et al., 1995).

A influência dos microelementos Mo, Mn, Cu e Zn, no processo de síntese de AGL e carotenóides, foi estudada em *Mucor lusitanicus*. Os sulfatos de cobre e zinco aumentaram seus conteúdos nos lipídios. Sob as ações simultâneas dos fatores: luz, microelementos, vitaminas B1, B6, e biotina, a produção de AGL (g.l<sup>-1</sup>) e carotenóides

aumentou mais do que duas vezes na quantidade dos lipídios (TORLANOVA et al., 1995).

A transição de uma linhagem oleaginosa de *Mucor circinelloides* da forma micelial para a leveduriforme foi estudada em condições que favoreceram a lipogênese. O fungo acumulou quantidades significativas de lipídios em meio de cultura com ácido cítrico como única fonte de carbono, nas concentrações de 7,5 e 10 g.l<sup>-1</sup>, relação C:N de 26 e 35, respectivamente. Concentrações superiores de ácido cítrico inibiram a síntese de lipídios e sob tais condições observou-se a morfogênese leveduriforme. Nestas células a biossíntese de ácido linoléico e AGL foram inibidas (AGGELIS, 1996).

O efeito de varias fontes de C e N e da relação C:N sobre a produção de AGL foi examinado em *Cunninghamella echinulata* CCRC 31840, em culturas agitadas. O amido solúvel foi a melhor fonte de C e também produziu a maior quantidade de AGL por unidade de volume. No meio com lactose, o crescimento de *C. echinulata* CCRC 31840 foi muito pobre, mas a maioria dos lipídios insaturados foi produzida. Nitrato de amônio e uréia foram as melhores fontes de N para crescimento. *C. echinulata* CCRC 31840 cultivada em nitrato de potássio alcançou o mais rico conteúdo lipídico (35,4%); contudo, a porcentagem de AGL nos lipídios (7,9%) foi muito menor do que quando cultivado em uréia (25,7%). A relação C:N inicial de, aproximadamente, 33 a 48,5 favoreceu o acúmulo de lipídios na biomassa, sem afetar o conteúdo de AGL dos lipídios. A maior produção de AGL foi de 964 mg.l<sup>-1</sup> obtida após 5 dias a 20°C em meio constituído por 10% de amido solúvel, 0,5% de extrato de leveduras, 0,11% de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, 0,1% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, e 0,025% de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (CHEN & CHANG, 1996).

As produções de lipídios e AGL por *Cunninghamella japonica* foram estudadas em cereais como substratos. O tratamento dos cereais, a adição de nutrientes

aos grãos e a espessura dos substratos sólidos, influenciaram o crescimento fúngico e as produções de lipídios e AGL. Dentre os vários substratos utilizados como fonte de nutrientes, o milho miúdo e o arroz proporcionaram a mais alta produção de AGL na biomassa (7,03% e 7,87%, p/p). O conteúdo de AGL nos lipídios foi de 20% do total dos ácidos graxos (EMELYANOVA, 1996)

As produções de lipídios e AGL foram estudadas em *Mucor inaequisporus*. Cultivos em batelada com etanol como fonte de carbono, apresentaram rápida acumulação lipídica durante a fase logarítmica de crescimento. Uma relação proporcional direta foi demonstrada entre a taxa de crescimento específico da cultura e o conteúdo de AGL dos lipídios. O valor mais alto de AGL dos lipídios (36% p/p) foi alcançado na taxa de crescimento mais alta no cultivo em batelada. Foi também demonstrado que este fungo foi conveniente para produção de AGL em cultivo contínuo. O conteúdo de AGL da biomassa obtida no cultivo contínuo (2,7% p/p), foi comparável ao da biomassa do cultivo em batelada (EMELYANOVA, 1997).

Os efeitos da utilização do micélio fragmentado, como inóculo, sobre o crescimento e produções de lipídios e AGL por *Cunninghamella echinulata* (CCRC 31840), uma linhagem com esporulação deficiente, foram examinados em cultivo agitado. Em uma cultura de 5 dias semeada com 1,6% de inóculo a biomassa aumentou 51,5%. O teor de lipídios aumentou 69,0%, quando o inóculo fragmentado foi elevado de  $2,7 \cdot 10^4$  para  $8,1 \cdot 10^4$  unidades formadoras de colônia por mililitro. Isto por sua vez resultou em aumento do teor de AGL de 358 para 860 mg.l<sup>-1</sup> (CHEN & LIU, 1997).

Polpa de maçã e grãos de malte foram utilizados como principais substratos para produção de óleo fúngico de alto valor, contendo até 11,43% da AGL biologicamente ativo. O processo desenvolvido para produção de AGL foi afetado pela



composição e umidade do substrato, agitação e aeração. Em condições otimizadas, a maior produção de AGL foi obtida com *Thamnidium elegans* CCF 1456 atingindo 3,50 g.kg<sup>-1</sup> de substrato úmido, cultivado em meio de cultura, composto por uma mistura de polpa de maçã e grãos de malte, suplementados com óleo de amendoim e solução nutriente, após 8 dias de incubação (STREDANSKY et al., 2000).

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### **3.1. Atividade enzimática**

##### **3.1.1. Microrganismos**

Foram estudadas 80 linhagens de fungos filamentosos, pertencentes a 47 espécies e 19 gêneros, isolados do solo da EEJI e identificados por GARLIPP (1995). Os microrganismos permaneceram conservados em tubos de cultura, em meio ágar extrato de malte, a 4°C, no laboratório do Centro de Estudos Ambientais (CEA) da UNESP, Rio Claro, e foram repicados periodicamente.

##### **3.1.2. Seleção preliminar dos microrganismos produtores de enzimas**

A partir de colônias crescidas em meio ágar extrato de malte durante 7 dias a 25°C, foram preparadas suspensões de, aproximadamente,  $10^7$  esporos por ml em solução de Tween 80 a 0,1% (T80). Aliquotas de 1 ml foram utilizadas para inocular frascos Erlenmeyers de 125 ml com meio de farelo de trigo (MFT), em duplicata. Os frascos permaneceram incubados a 25°C por 4 dias.

### **3.1.3. Procedimento para obtenção do extrato enzimático**

Após o período de incubação, foram adicionados 30 ml de água destilada a 4°C. A suspensão foi homogeneizada com uma espátula e após 3 h a 4°C, o extrato foi separado através de filtração em gaze e algodão, permanecendo congelado até o momento da análise em frascos de vidro tampados e previamente rotulados (YOSHIOKA et al., 1981; RODRIGUES, 1987). Os extratos filtrados das culturas foram designados como fonte bruta de enzimas extracelulares.

### **3.1.4. Aplicação de ultra-som na obtenção do extrato enzimático**

Foi utilizado um gerador de ultra-som modelo VCX 600 com transdutor de cavidade ressonante e uma guia de onda tipo sonda de 13 mm de diâmetro, modelo CV 26, da Sonics & Materials Inc. Foram aplicadas ondas ultra-sônicas de 10%, 20% e 30% de amplitude, no modo pulsado, sendo a energia aplicada por 5 s intercalados por 5 s de descanso, em intervalos de tempo de 10, 20 e 30 min. O material irradiado foi colocado, em banho de gelo, em Becker de 50 ml, com 30 ml de água destilada gelada. Após o término da irradiação o extrato enzimático foi rapidamente separado por filtração e congelado.

### **3.1.5. Determinação das curvas padrão de glicose e xilose**

Em tubos de ensaio foram adicionados na seqüência, em duplicata, os respectivos volumes de solução tampão acetato de sódio 0,05 M, solução estoque de glicose ou xilose e ácido 3,5 dinitro salicílico (ADNS), de acordo com a Tabela 1.

TABELA 1. Volumes das soluções para determinação das atividades enzimáticas por tubo de reação.

| Tubos | Volume (ml)    |                   | ADNS |
|-------|----------------|-------------------|------|
|       | Solução tampão | Solução de açúcar |      |
| 0     | 1,0            | 0,0               | 1,0  |
| 1     | 0,9            | 0,1               | 1,0  |
| 2     | 0,8            | 0,2               | 1,0  |
| 3     | 0,7            | 0,3               | 1,0  |
| 4     | 0,6            | 0,4               | 1,0  |
| 5     | 0,5            | 0,5               | 1,0  |
| 6     | 0,4            | 0,6               | 1,0  |
| 7     | 0,3            | 0,7               | 1,0  |
| 8     | 0,2            | 0,8               | 1,0  |
| 9     | 0,1            | 0,9               | 1,0  |
| 10    | 0,0            | 1,0               | 1,0  |

Legenda: Solução tampão = tampão acetato de sódio 0,05 M; Solução de açúcar = 0,1% de glicose ou xilose; ADNS = Ácido 3,5 dinitro salicílico.

Os tubos foram agitados, aquecidos durante 5 min em banho-maria a 100°C, rapidamente resfriados em água corrente e adicionados de 10 ml de água destilada. Após homogeneização as leituras das respectivas absorbâncias foram determinadas em espectrofotômetro, modelo Cintra 20, da GBC, em  $\lambda$  de 540 nm, tendo o tubo 0 como referência. As curvas padrão de glicose e/ou xilose foram traçadas tomando micromols ( $\mu$ mols) nas abscissas e a média das leituras de absorbância ( $A_{540 \text{ nm}}$ ) nas ordenadas.

### 3.1.6. Determinação das atividades enzimáticas

#### 3.1.6.1. Determinação da atividade da carboximetilcelulase

Para determinar a atividade CMCase (endoglucanase), foram pesados 50 mg de carboximetilcelulose em um tubo de ensaio por reação e adicionados de 4,9 ml de tampão acetato de sódio 0,05 M, pH 5,0. Os tubos permaneceram incubados em banho-maria a 50°C por 5 min para equilíbrio térmico. A estes foram adicionados 0,1 ml do filtrado da cultura a ser analisada e, após homogeneização, uma alíquota de 1,0 ml

(tempo 0,  $T_0$ ), foi transferida e a reação paralisada ao ser adicionada a outro tubo de centrífuga contendo 1,0 ml de ADNS. Os tubos foram agitados a cada 2 min e novas amostras de 1,0 ml, foram retiradas após 30 ( $T_{30}$ ) e 60 ( $T_{60}$ ) min, procedendo de modo idêntico ao  $T_0$ . Todos os tubos foram centrifugados por 8 min a 4.200 rpm. Os sobrenadantes foram transferidos para tubos de ensaio, previamente, rotulados (amostra/tempo) e após desenvolverem a cor em banho-maria de água fervente por 5 min, foram rapidamente resfriados em banho de água fria e adicionados de 10 ml de água destilada. Esta solução foi homogeneizada e as leituras das absorbâncias foram determinadas em  $\lambda$  de 540 nm contra o branco ( $T_0$ ) (RODRIGUES, 1987; CARMONA, 1995).

### 3.1.6.2. Determinação da atividade da xilanase

O procedimento para determinar a atividade da xilanase (1,4- $\beta$ -D-xilana xilanoidrolase, E.C.3.2.1.8), foi idêntico ao da CMCCase. Porém o substrato utilizado foi xilana e as amostras foram retiradas após 10 ( $T_{10}$ ) e 20 ( $T_{20}$ ) minutos.

### 3.1.7. Unidade de atividade enzimática

Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir um  $\mu\text{mol}$  de glicose ou xilose por ml por min nas condições do ensaio.

A seguinte fórmula foi utilizada para calcular as unidades de atividade enzimática em  $\mu\text{mol}.\text{ml}^{-1}.\text{min}^{-1}$ :

$$U = \frac{\text{Abs} + b}{a} \cdot \frac{1}{\text{PM}} \cdot \frac{1}{T} \cdot \frac{1}{V_i} \cdot F \cdot V_R \cdot D$$

Onde: Abs = absorvância em  $\lambda$  de 540 nm; b = intercepto; a = coeficiente angular; PM = massa molecular da glicose (180,16) ou da xilose (150,13); T = tempo da reação em min; Vi = volume de amostra (0,1 ml); F = fator de conversão de mg para  $\mu\text{g}$  ( $10^3$ );  $V_R$  = volume de reação (5 ml); D = diluição.

### 3.1.8. Análise estatística

O procedimento de análise de variância foi realizado pelo teste de Tukey utilizando o sistema SAS.

## 3.2. Produção de ácido g-linolênico

### 3.2.1. Fungos

*Mucor hiemalis* (n. 66) isolado por GARLIPP (1995), *Absidia corymbifera* (CCT 3142), *Absidia glauca* (CCT 3141), *Circinella simplex* (CCT 3222), *Rhizopus sexualis* (CCT 3218) e *Zigorhynchus moelleri* (CCT 1744), isolados por ATTILI (1994), foram solicitados à Coleção de Culturas Tropical (CCT), Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia “André Tosello”. Além destes fungos foram isoladas 19 linhagens de zigomicetos pertencentes a 3 gêneros. Os fungos *Absidia* sp, *Circinella simplex*, *Mucor* sp1, *Mucor* sp2, *Mucor* sp3, *Mucor circinelloides*, *Mucor hiemalis* e *Mucor ramosissimus* estão sendo identificados com o auxílio da Dr<sup>a</sup>. Sandra Farto Botelho Trufem, Pesquisadora da Seção de Micologia e Liqueologia do Instituto de Botânica, São Paulo.

### **3.2.2. Coleta de solo da Estação Ecológica de Juréia-Itatins**

Foram coletadas cinco amostras de solo constituídas por 5 sub-amostras na EEJI, no mês de Janeiro de 2000. O solo foi coletado de 0 a 15 cm de profundidade, após retirar a camada de serapilheira, sendo acondicionado em sacos plásticos.

### **3.2.3. Tratamento das amostras de solo**

Em laboratório, o solo foi passado em peneira de malha de 2,38 mm, homogeneizado e, amostras de 10 g foram transferidas para frascos contendo 90 ml de solução salina de cloreto de sódio a 0,85%. As suspensões foram agitadas por 30 min a 150 rpm. Foram realizadas diluições das amostras e 1 ml destas diluições ( $10^{-3}$  e  $10^{-5}$ ), foram adicionados a placas de Petri (5 repetições). Dois meios de cultura foram utilizados: meio com acetato de sódio e ágar com rosa-bengala, respectivamente, com as diluições  $10^{-3}$  e  $10^{-5}$ , os meios foram adicionados pela técnica da placa derramada “pour plate”. As placas foram homogeneizadas com movimentos circulares e após endurecimento do ágar, permaneceram incubadas a 25°C, no escuro, até o desenvolvimento das colônias. Após 7 dias, estas foram analisadas ao microscópio e repicadas em ágar sintético para *Mucor*.

### **3.2.4. Seleção preliminar de fungos produtores de ácido g-linolênico**

Os zigomicetos foram cultivados em meio com 2% de glicose e 1% de extrato de leveduras (GY) em frascos Erlenmeyers de 250 ml contendo 50 ml de meio de cultura. Os frascos foram inoculados com 1 ml da suspensão de esporos em solução T80. As culturas permaneceram sob agitação a 150 rpm, a 25°C por 4 dias e foram

realimentadas com 20% do volume do meio de cultura e permaneceram incubados a 12°C, por 3 dias.

### **3.2.5. Determinação do peso seco da biomassa**

A biomassa das amostras foi separada através de filtração a vácuo em papel de filtro Whatman n. 1, lavada com 100 ml de água destilada e colocada entre duas folhas de papel de filtro para absorver o excesso de água. Transferidas para cápsulas de porcelana, permaneceram por 24 h em dessecador sob vácuo, em seguida foram colocadas em cadinhos de porcelana e permaneceram em estufa a 105°C, até obtenção de peso constante. O peso seco da biomassa foi determinado gravimetricamente em balança analítica.

### **3.2.6. Determinação da glicose residual no meio de cultura**

O método utilizado baseou-se na oxidação enzimática da glicose catalisada pela glicose oxidase para ácido glucônico e peróxido de hidrogênio. O peróxido de hidrogênio formado reage com 4-aminoantipirina e fenol, através de uma reação oxidativa de acoplamento catalisada pela peroxidase, formando uma antipirilquinonimina vermelha cuja intensidade de cor é proporcional à concentração da glicose na amostra analisada.

Foram retirados 30 µl das amostras e colocados em tubos de ensaios. Aos tubos foram adicionados 3,0 ml do reagente de cor. A mistura foi homogeneizada vigorosamente e incubada em banho-maria a 37°C por 15 min, após serem resfriadas em banho de água corrente. As absorbâncias foram determinadas em  $\lambda$  de 505 nm em



espectrofotômetro, acertando-se o zero com o branco constituído por 30 µl de solução padrão e 3,0 ml do reagente de cor.

A concentração de glicose ( $\text{mg.l}^{-1}$ ) é igual a (Absorbância da amostra x concentração do padrão) / Absorbância do padrão.

### **3.2.7. Extração de lipídios com clorofórmio/metanol**

Cerca de 50 mg de biomassa foi reidratada com adição de 2,0 ml de água destilada. A esta suspensão foram adicionados 2,5 ml de clorofórmio e 5,0 ml de metanol (0,8:1,0:2:0 v/v) e deixado à temperatura ambiente por 24 h, com agitações ocasionais. O material foi centrifugado, a 4.000 rpm por 11 min, em tubos de vidro de cor âmbar de 20 ml com tampa de rosca. O extrato sobrenadante foi transferido com uma pipeta Pasteur para outro tubo; adicionou-se 2,5 ml de clorofórmio e 2,5 ml de água destilada. A mistura foi agitada em vórtex e centrifugada a 1.500 rpm por 30 min. A camada superior foi desprezada e a camada inferior, da fase com clorofórmio, foi cuidadosamente removida, com pipeta Pasteur, e transferida para um tubo de vidro de cor âmbar de 5 ml, previamente tarado. O solvente foi removido em atmosfera de nitrogênio a temperatura ambiente. Os tubos foram mergulhados em acetona, secos e colocados em dessecador sob vácuo até obtenção do peso constante.

### **3.2.8. Preparação dos ésteres metílicos dos ácidos graxos**

A determinação da composição de ácidos graxos dos lipídios por cromatografia gasosa é precedida por esterificação ou transesterificação para formar os ésteres metílicos que aumentam a volatilidade destes compostos e proporcionam análises mais adequadas. Foi utilizada a esterificação e transesterificação catalisada por base.

A amostra de lipídios contida em um tubo de vidro de cor âmbar de 5 ml com tampa de rosca foi dissolvida em 1 ml de hexano e adicionada de 50 µl de solução de hidróxido de sódio metanólico 2 M. A mistura foi agitada por 30 s e deixada em repouso por 30 min. Adicionada de 100 mg de cloreto de cálcio anidro, foi centrifugada a 4.000 rpm por 8 min. A fase superior foi injetada no cromatógrafo a gás.

### **3.2.9. Análise da composição de ácidos graxos por cromatografia gasosa**

Após a metilação das amostras de lipídios totais dos fungos, os estéres metílicos foram analisados por cromatografia gasosa. A cromatografia gasosa foi realizada em cromatógrafo a gás da Finnigan – Tremeetrics, modelo 9001, em coluna FFAP (“free fatty acid polimerase”) megabore de 30 m com filme de 1 µm; com as seguintes especificações: fluxo de hidrogênio = 20 ml.min<sup>-1</sup>; fluxo de nitrogênio = 25 ml.min<sup>-1</sup>; fluxo de ar sintético = 175 ml.min<sup>-1</sup>; gás de arraste = hidrogênio; pressão de trabalho = 4 psi; temperatura do injetor = 210°C; temperatura do detector = 250°C; divisão da amostra = 10:1; temperatura da coluna de 50°C por 3 min, com programação de 40°C por min até 190°C e 5°C até a temperatura máxima de 220°C.

A identificação dos ácidos graxos foi realizada por comparação do tempo de retenção dos componentes da amostra com os dos padrões autênticos dos ésteres metílicos dos ácidos graxos e pela técnica de co-eluição de padrões junto com a amostra.

### **3.2.10. Análise por padronização externa**

Foram preparadas amostras para calibração contendo concentrações diferentes do padrão do éster metílico do ácido  $\gamma$ -linolênico, que foram injetadas no cromatógrafo.

Após identificação das respectivas áreas dos picos, determinou-se a equação da reta colocando-se a concentração nas abscissas e a área dos picos nas ordenadas (CIOLA, 1985).

#### **3.2.11. Padronização do inóculo para a cultura selecionada**

A suspensão de esporos em solução T80 foi padronizada em espectrofotômetro em  $\lambda$  de 540 nm. As leituras de absorbância foram realizadas de 0,21 a 0,25, correspondendo a uma suspensão de, aproximadamente,  $2,6 \cdot 10^6$  esporos por ml, contados em câmara de Neubauer.

#### **3.2.12. Influência do tempo de cultivo na produção de biomassa, lipídios totais e ácido $\gamma$ -linolênico**

A linhagem selecionada para estudos de produção de ácido  $\gamma$ -linolênico foi analisada quanto ao crescimento em diferentes tempos de incubação. Foram utilizados 50 ml de meio GY. Os frascos foram incubados a 25°C em agitação constante de 150 rpm, em um período de 1 a 10 dias

#### **3.2.13. Influência do pH inicial do meio de cultura na produção de biomassa, lipídios totais e ácido $\gamma$ -linolênico**

A influência do pH inicial do meio de cultura na obtenção de biomassa seca e de ácido  $\gamma$ -linolênico foi verificada na faixa de pH entre 3,5 a 6,5, obtida pela adição de HCl a 0,1 M. Os meios foram colocados em frascos Erlenmeyers de 250 ml com 50 ml de meio GY. Os frascos foram incubados a 25°C em agitação constante de 150 rpm por 4 dias.

#### **3.2.14. Efeito de diferentes fontes de carbono na produção de biomassa, lipídios totais e ácido g-linolênico**

Foram testadas as seguintes fontes de carbono: acetato de sódio, frutose, galactose, glicerol, glicose, maltose, manitol, melezitose, lactose, sacarose, sorbitol, trealose e xilose. Estas fontes de carbono foram adicionadas ao meio de cultura em quantidades suficientes para resultar em  $8 \text{ g.l}^{-1}$  de C, ou seja  $0,111 \text{ mol de C.l}^{-1}$ , correspondendo por exemplo, a  $20 \text{ g.l}^{-1}$  de glicose. O extrato de leveduras,  $10 \text{ g.l}^{-1}$ , foi usado como fonte de nitrogênio em todos os meios de cultura. Os cultivos foram realizados em frascos Erlenmeyers de 250 ml contendo 50 ml do respectivo meio de cultura, incubados a  $25^{\circ}\text{C}$  em agitação constante de 150 rpm, por 3 dias.

#### **3.2.15. Efeito de diferentes fontes de nitrogênio na produção de biomassa, lipídios totais e ácido g-linolênico**

Foram testadas as seguintes fontes de nitrogênio: extrato de leveduras, extrato de malte, peptona, triptona, uréia, cloreto de amônio, nitrato de amônio, nitrato de potássio, nitrato de sódio e sulfato de amônio. As fontes de nitrogênio, a  $10 \text{ g.l}^{-1}$ , foram adicionadas ao meio e a glicose, a  $20 \text{ g.l}^{-1}$ , foi utilizada como fonte de carbono. Os cultivos foram realizados em frascos Erlenmeyers de 250 ml com 50 ml de meio de cultura, incubados a  $25^{\circ}\text{C}$  em agitação constante de 150 rpm por 3 dias.

#### **3.2.16. Efeito da presença de íons metálicos no meio de cultura na produção de biomassa, lipídios totais e ácido g-linolênico**

A influência dos íons metálicos, cálcio, cobre, ferro, manganês, magnésio e zinco, foi avaliada na produção de biomassa, lipídios totais e ácido  $\gamma$ -linolênico de *M.*

*ramosissimus*. Os cultivos foram realizados em frascos Erlenmeyers de 250 ml com 50 ml de meio de cultura GY, incubados a 25°C em agitação constante de 150 rpm por 3 dias.

### 3.2.17. Efeito da composição do meio de cultura na produção de biomassa, lipídios totais e ácido g-linolênico

Cinco meios de cultura com glicose como fonte de carbono e diferentes fontes de nitrogênio foram avaliados para produção de biomassa, lipídios totais e ácido  $\gamma$ -linolênico de *M. ramosissimus*. A Tabela 2 apresenta as composições dos meios de cultura.

TABELA 2. Composição dos meios de cultura para avaliação da produção de biomassa, lipídios totais e ácido  $\gamma$ -linolênico de *M. ramosissimus*.

| Composição (g.l <sup>-1</sup> )                 | Meio 1 | Meio 2 | Meio 3 | Meio 4 | Meio 5 |
|-------------------------------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|
| Glicose                                         | 25,0   | 30,0   | 60,0   | 30,0   | 20,0   |
| Extrato de leveduras                            | -      | 0,4    | 0,5    | 5,0    | 10,0   |
| Extrato de malte                                | 0,2    | 0,4    | -      | -      | -      |
| Peptona                                         | 0,1    | 0,2    | -      | -      | -      |
| Uréia                                           | -      | 1,0    | 1,0    | -      | -      |
| (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | 3,0    | 2,0    | -      | -      | -      |
| KNO <sub>3</sub>                                | -      | -      | -      | 1,0    | -      |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                 | 3,0    | 3,0    | 1,0    | 2,4    | -      |
| NaCl                                            | 0,1    | 0,1    | 0,5    | -      | -      |
| MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O            | 0,3    | 0,5    | 0,5    | 0,5    | -      |
| FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O            | 0,01   | 0,01   | 0,01   | -      | -      |
| CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O            | 0,01   | 0,01   | -      | 0,1    | -      |
| CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O            | 0,002  | 0,0005 | -      | 0,0005 | -      |
| ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O            | 0,001  | 0,001  | -      | 0,0075 | -      |
| MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O            | 0,001  | -      | -      | 0,001  | -      |
| MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O            | -      | 0,001  | -      | -      | -      |
| FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O            | -      | -      | -      | 0,015  | -      |

Legenda: Meio 1 = SHIN & SHIN apud CARVALHO (1994); Meio 2 = FUKUDA & MORIKAWA (1987); Meio 3 = TORLANOVA et al. (1992); Meio 4 = LINDBERG & HANSSON (1991); Meio 5 = SHIMIZU et al. (1988).

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Atividade enzimática

#### 4.1.1. Seleção preliminar dos fungos produtores de enzimas

Os fungos foram cultivados preliminarmente em meio de farelo de trigo e as atividades da carboximetilcelulase e da xilanase foram quantificadas de acordo com procedimento descrito anteriormente. As médias das unidades de atividade da carboximetilcelulase e da xilanase, de dois cultivos, estão citadas na Tabela 3.

Foram selecionadas 10 espécies para prosseguirem os estudos. Estas foram escolhidas por se destacarem pela melhor atividade enzimática e por apresentarem maior uniformidade entre os resultados das análises. A atividade enzimática foi medida por unidades de enzima pela capacidade de produzir um micromol de glicose ou xilose por mililitro por minuto, sob as condições utilizadas no ensaio. Para a atividade da carboximetilcelulase optou-se por: *P. citrinum* (n. 47), *P. purpurogenum* (n. 52), *T. harzianum* (n. 50), *T. longibrachiatum* (n. 31) e *T. pseudokoningii* (n. 48), e para a atividade da xilanase por: *C. paradoxa* (n. 69), *G. roseum* (n. 4), *P. simplicissimum* (n. 74), *T. inhamatum* (n. 33) e *T. viride* (n. 35).

TABELA 3. Atividades enzimáticas dos fungos filamentosos isolados do solo do Banhado Grande da Estação Ecológica de Juréia-Itatins, SP, cultivados em meio de farelo de trigo por quatro dias a 25°C.

| n  | Fungos                              | U <sub>C</sub> | U <sub>X</sub> | n  | Fungos                            | U <sub>C</sub> | U <sub>X</sub> |
|----|-------------------------------------|----------------|----------------|----|-----------------------------------|----------------|----------------|
| 26 | <i>Aspergillus</i> sp               | 0,72           | 12,09          | 32 | <i>Penicillium oxalicum</i>       | 0,59           | 30,46          |
| 30 | <i>Aspergillus niger</i>            | 1,01           | 34,56          | 6  | <i>Penicillium purpurogenum</i>   | 0,71           | 21,76          |
| 49 | <i>Aspergillus wentii</i>           | 0,55           | 1,39           | 10 | <i>P. purpurogenum</i>            | 0,34           | 5,32           |
| 69 | <i>Chalara paradoxa</i>             | 1,03           | 59,67          | 52 | <i>P. purpurogenum</i>            | 1,09           | 27,87          |
| 79 | <i>Chaunopycnis alba</i>            | -              | 0,80           | 53 | <i>Penicillium rugulosum</i>      | 0,23           | 1,19           |
| 44 | <i>Chloridium virescens</i>         | 0,36           | 1,68           | 14 | <i>Penicillium sclerotiorum</i>   | 0,47           | 5,93           |
| 58 | <i>C. virescens</i>                 | 0,50           | 6,23           | 24 | <i>P. sclerotiorum</i>            | 0,75           | 11,89          |
| 16 | <i>Cladosporium cladosporioides</i> | 0,47           | 12,40          | 29 | <i>P. sclerotiorum</i>            | 0,51           | 16,49          |
| 45 | <i>Colletotrichum</i> sp            | 0,11           | 2,80           | 9  | <i>Penicillium simplicissimum</i> | 0,78           | 34,99          |
| 72 | <i>Cylindrocladium clavatum</i>     | 0,62           | 12,46          | 68 | <i>P. simplicissimum</i>          | 0,47           | 34,96          |
| 67 | <i>Doratomyces stemonitis</i>       | 0,27           | 5,66           | 71 | <i>P. simplicissimum</i>          | 0,39           | 5,25           |
| 76 | <i>Gliocephalotrichum simplex</i>   | 0,02           | 1,03           | 74 | <i>P. simplicissimum</i>          | 0,74           | 39,17          |
| 22 | <i>Gliocladium nigrovirens</i>      | 0,38           | 5,61           | 80 | <i>P. simplicissimum</i>          | 0,74           | 39,17          |
| 1  | <i>Gliocladium roseum</i>           | 0,93           | 33,94          | 5  | <i>Penicillium spinulosum</i>     | 0,69           | 4,34           |
| 4  | <i>G. roseum</i>                    | 0,10           | 37,65          | 73 | <i>P. spinulosum</i>              | 0,70           | 14,40          |
| 78 | <i>Metarhizium anisopliae</i>       | 0,59           | 17,76          | 15 | <i>Penicillium variabile</i>      | 0,74           | 32,59          |
| 66 | <i>Mucor hiemalis</i>               | 0,53           | 0,74           | 21 | <i>P. variabile</i>               | 0,12           | 1,98           |
| 63 | <i>Myrothecium roridum</i>          | 0,33           | 8,03           | 54 | <i>Penicillium verruculosum</i>   | 0,49           | 16,48          |
| 65 | <i>M. roridum</i>                   | 0,51           | 7,32           | 70 | <i>P. verruculosum</i>            | 0,40           | 5,28           |
| 77 | <i>M. roridum</i>                   | -              | 1,01           | 62 | <i>Pestalotiopsis pauciseta</i>   | 0,72           | 16,98          |
| 7  | <i>Paecilomyces carneus</i>         | 0,66           | 7,12           | 57 | <i>Scopulariopsis carbonaria</i>  | 0,21           | 4,86           |
| 13 | <i>P. carneus</i>                   | 0,49           | 2,69           | 20 | <i>Trichoderma hamatum</i>        | 0,95           | 14,08          |
| 46 | <i>P. carneus</i>                   | 0,63           | 5,13           | 28 | <i>T. hamatum</i>                 | 0,41           | 9,85           |
| 60 | <i>Penicillium</i> sp               | 0,59           | 27,36          | 12 | <i>Trichoderma harzianum</i>      | 0,67           | 20,01          |
| 23 | <i>Penicillium aculeatum</i>        | 0,18           | 0,89           | 18 | <i>T. harzianum</i>               | 1,02           | 34,63          |
| 47 | <i>Penicillium citrinum</i>         | 1,07           | 29,42          | 41 | <i>T. harzianum</i>               | 1,42           | 31,65          |
| 55 | <i>P. citrinum</i>                  | 0,66           | 24,67          | 42 | <i>T. harzianum</i>               | 0,40           | 38,82          |
| 8  | <i>Penicillium corylophilum</i>     | 0,60           | 24,05          | 50 | <i>T. harzianum</i>               | 1,64           | 36,57          |
| 75 | <i>Penicillium decumbens</i>        | 0,18           | 22,43          | 59 | <i>T. harzianum</i>               | 0,35           | 10,93          |
| 37 | <i>Penicillium fellutanum</i>       | 1,00           | 31,71          | 33 | <i>T. inhamatum</i>               | 1,32           | 49,95          |
| 61 | <i>P. fellutanum</i>                | 0,48           | 31,34          | 51 | <i>T. inhamatum</i>               | 1,07           | 26,91          |
| 64 | <i>Penicillium funiculosum</i>      | 0,57           | 17,87          | 19 | <i>T. koningii</i>                | 0,86           | 22,84          |
| 3  | <i>Penicillium glabrum</i>          | 0,56           | 34,79          | 43 | <i>T. koningii</i>                | 0,96           | 25,98          |
| 11 | <i>P. glabrum</i>                   | 0,59           | 25,49          | 56 | <i>T. koningii</i>                | 0,06           | 1,14           |
| 38 | <i>Penicillium herquei</i>          | 0,81           | 20,22          | 31 | <i>T. longibrachiatum</i>         | 1,37           | 34,08          |
| 25 | <i>Penicillium janczewskii</i>      | 0,93           | 24,04          | 2  | <i>Trichoderma pseudokoningii</i> | 1,10           | 26,38          |
| 27 | <i>P. janczewskii</i>               | 0,79           | 27,88          | 48 | <i>T. pseudokoningii</i>          | 1,41           | 37,43          |
| 34 | <i>P. janczewskii</i>               | 0,49           | 19,55          | 35 | <i>Trichoderma viride</i>         | 1,17           | 44,05          |
| 39 | <i>Penicillium janthinellum</i>     | 0,79           | 16,31          | 40 | <i>T. viride</i>                  | 0,83           | 38,93          |
| 36 | <i>Penicillium miczynskii</i>       | 0,71           | 20,07          | 17 | <i>Verticillium lecanii</i>       | 0,51           | 20,31          |

Legenda: n = número de identificação do fungo; U<sub>C</sub> = média das unidades de atividade da CMCase; U<sub>X</sub> = média das unidades de atividade da xilanase; U =  $\mu\text{mols.ml}^{-1}.\text{min}^{-1}$ .

#### 4.1.2. Efeito da temperatura de cultivo na atividade da CMCase

A influência da temperatura de incubação sobre a produção de enzimas pelos fungos, foi avaliada em MFT, em duplicata, após 4 dias a 22°, 25°, 28° e 31°C. A Tabela 4, apresenta as médias das unidades de atividade da CMCase em cada temperatura.

TABELA 4. Atividade da carboximetilcelulase dos fungos cultivados em diferentes temperaturas em meio de farelo de trigo após 4 dias.

| Fungos                    | U (mmols.ml <sup>-1</sup> .min <sup>-1</sup> ) |      |      |      |
|---------------------------|------------------------------------------------|------|------|------|
|                           | 22°C                                           | 25°C | 28°C | 31°C |
| <i>P. citrinum</i>        | 0,60                                           | 0,89 | 0,77 | 0,55 |
| <i>P. purpurogenum</i>    | 0,93                                           | 0,89 | 1,08 | 1,05 |
| <i>T. harzianum</i>       | 1,55                                           | 1,57 | 1,60 | 1,61 |
| <i>T. longibrachiatum</i> | 1,45                                           | 1,42 | 1,45 | 1,06 |
| <i>T. pseudokoningii</i>  | 1,45                                           | 1,45 | 1,63 | 1,61 |

Legenda: U = unidades de atividade da carboximetilcelulase.

*P. citrinum* apresentou maior atividade a 25°C, *P. purpurogenum* entre 28°C e 31°C, sendo ligeiramente maior no primeiro. As espécies de *Trichoderma* apresentaram maior atividade da CMCase em relação às espécies de *Penicillium*. *T. harzianum* apresentou resultados próximos entre 22° e 31°C, enquanto que *T. longibrachiatum* entre 22° e 28°C e *T. pseudokoningii* entre 28° e 31°C.

*T. longibrachiatum* (ROYER & NAKAS, 1990) e *P. purpurogenum* (KURASAWA et al., 1992) foram cultivados, respectivamente, a 28°C e 27°C em meio líquido, para verificar a indução de enzimas pelos substratos e *T. harzianum* foi cultivado a 29°C em meio à base de bagaço de cana-de-açúcar (ROUSSOS et al., 1992), para estes fungos, a temperatura empregada foi a mesma obtida neste trabalho, apenas para *P. citrinum* a temperatura de 28°C no cultivo em palha de arroz (KUHAD & SINGH, 1993) foi diferente da linhagem aqui estudada.



#### 4.1.3. Efeito do aumento do pH do meio de cultivo sobre a atividade da carboximetilcelulase

O efeito do aumento do pH pela adição de solução de hidróxido de sódio ao MFT foi avaliado em triplicata. A adição de NaOH elevou o pH do meio de 5,7 para 6,7. Foram realizadas determinações do pH após quatro dias de cultivo e os valores estão apresentados na Tabela 5 juntamente com a atividade da CMCase.

TABELA 5. Atividade da carboximetilcelulase dos fungos em meio de farelo de trigo, nas temperaturas ótimas de crescimento, após 4 dias.

| Fungos                    | Temperatura<br>(°C) | U (mmols.ml <sup>-1</sup> .min <sup>-1</sup> ) |             | pH (*) |      |
|---------------------------|---------------------|------------------------------------------------|-------------|--------|------|
|                           |                     | A                                              | B           | A      | B    |
| <i>P. citrinum</i>        | 25                  | 4,29                                           | <b>4,48</b> | 7,34   | 7,19 |
| <i>P. purpurogenum</i>    | 28                  | 5,44                                           | <b>7,03</b> | 4,96   | 4,98 |
| <i>T. harzianum</i>       | 28                  | <b>7,54</b>                                    | 6,99        | 6,71   | 6,18 |
| <i>T. longibrachiatum</i> | 28                  | <b>8,38</b>                                    | 6,38        | 6,66   | 6,88 |
| <i>T. pseudokoningii</i>  | 28                  | <b>6,60</b>                                    | 5,36        | 6,20   | 6,68 |

Legenda: U = unidades de atividade da CMCase; A = controle (pH = 5,7); B = meio com NaOH (pH = 6,7); (\*) = pH do final do cultivo.

Os resultados obtidos para a atividade da CMCase foram maiores para todos os fungos, quando comparados com aqueles apresentados nas Tabelas 3 e 4, contudo houve uma modificação na execução da reação enzimática. As amostras foram retiradas após 15 e 30 min de incubação a 50°C, ao invés de 30 e 60 min como foi realizado na seleção dos fungos. Desta forma *T. longibrachiatum* foi o que melhor demonstrou atividade desta enzima, chegando a 8,38 U, seguido por *T. harzianum* com 7,54 U. O aumento do pH pela adição de solução de NaOH, favoreceu apenas os cultivos de *P. citrinum* e *P. purpurogenum*.

A acidificação do meio pela adição de solução de HCl não foi realizada, visto que nos ensaios realizados anteriormente, dados não apresentados, os valores da atividade enzimática foram inferiores ao meio normal.

Os resultados apresentados nas Tabelas 4, 5 e 6 são inferiores aos obtidos com a linhagem de *Trichoderma viride* QM9414, cultivada em polpa de celulose e em avicel por 13 dias em meio líquido, onde os autores obtiveram, respectivamente, 152 U e 144 U de atividade da CMCase (MANDELS et al., 1974).

Resultados melhores foram obtidos com a linhagem de *Trichoderma* sp A-001. O fungo foi cultivado em meio líquido contendo diferentes fontes de carbono, suplementados com surfactantes, sob agitação constante de 150 rpm, a 28°C por 7 dias. Embora o grau de atividade enzimática variou de acordo com o substrato utilizado, o microrganismo cresceu em todos eles. A melhor atividade enzimática foi obtida no meio contendo papel de filtro, onde foi obtido 167 U de atividade da CMCase. Outros bons resultados, comparados com a melhor atividade da CMCase por *T. longibrachiatum* em farelo de trigo (8,38 U) foram obtidos nos meios com grama, palha de trigo e papelão, respectivamente, 70,6 U, 118,3 U e 133,3 U (GASHE, 1992), entretanto as condições de cultivo e os substratos testados foram diferentes.

A recuperação de celulasas produzidas por *T. harzianum* em culturas contendo meio sólido foi eficientemente realizada através de prensa hidráulica. A eficiência da compressão dos sólidos na extração da CMCase foi inicialmente de 71%. Com uma segunda extração, a eficiência do processo aumentou para 95%, o que proporcionou uma atividade da CMCase de 54 U.ml<sup>-1</sup> (ROUSSOS et al., 1992). Esta técnica não foi utilizada no presente estudo, mas o uso da mesma poderá otimizar os resultados aqui obtidos.

A palha de arroz foi utilizada como substrato para produção de celulases por *P. citrinum*. O fungo foi cultivado em frascos Erlenmeyers de 250 ml contendo 4 g de palha de arroz adicionados de 20 ml de meio básico. A cultura foi mantida a 28°C por 12 dias. Nestas condições a produção máxima alcançada da atividade da CMCase foi de 58,8 U.g<sup>-1</sup>, com aproveitamento superior a 70% da celulose. Esta atividade foi três vezes maior em relação as culturas agitadas, no mesmo período, contendo 4% (p/v) do substrato em meio básico (KUHAD & SINGH, 1993). O primeiro resultado foi superior ao obtido com a linhagem de *P. citrinum*, neste trabalho, que apresentou 26,9 U.g<sup>-1</sup> de atividade da CMCase em meio de farelo de trigo após 4 dias a 25°C, entretanto não foi adicionada nenhuma suplementação ao meio o que poderia otimizar os resultados aqui obtidos.

#### 4.1.4. Efeito da temperatura de cultivo na atividade da xilanase

A influência da temperatura de incubação sobre a produção de enzimas pelos fungos, foi avaliada em MFT, em duplicata, após 4 dias a 22°, 25°, 28° e 31°C. A Tabela 6, apresenta as médias das unidades de atividade da xilanase em cada temperatura.

TABELA 6. Atividade da xilanase dos fungos cultivados em diferentes temperaturas em meio de farelo de trigo após 4 dias.

| Fungos                   | U (mmols.ml <sup>-1</sup> .min <sup>-1</sup> ) |        |               |              |
|--------------------------|------------------------------------------------|--------|---------------|--------------|
|                          | 22°C                                           | 25°C   | 28°C          | 31°C         |
| <i>C. paradoxa</i>       | <b>112,98</b>                                  | 81,83  | 44,33         | 30,20        |
| <i>G. roseum</i>         | 11,34                                          | 43,94  | 46,38         | <b>49,70</b> |
| <i>P. simplicissimum</i> | 30,42                                          | 63,82  | <b>76,61</b>  | 62,83        |
| <i>T. inhamatum</i>      | 209,48                                         | 203,28 | <b>221,81</b> | 201,74       |
| <i>T. viride</i>         | 83,96                                          | 89,37  | <b>92,90</b>  | 87,64        |

Legenda: U = unidades de atividade da xilanase.

*C. paradoxa* apresentou maior atividade da xilanase a 22°C. Com o aumento da temperatura ocorreu diminuição de 27,6%, 60,8% e 73,3% da atividade da xilanase, respectivamente, a 25°C, 28°C e 31°C. Inversamente, com *G. roseum* o aumento da temperatura foi proporcional ao aumento da atividade enzimática, atingindo maior atividade da xilanase a 31°C, contudo foi o menor valor dentre estes fungos. *P. simplicissimum*, *T. inhamatum* e *T. viride* apresentaram melhores resultados a 28°C. Sendo que *T. inhamatum* apresentou a maior atividade da xilanase chegando a 221,81 U.

A temperatura dos cultivos para produção de xilanases por fungos mesofílicos situa-se entre 25°C e 30°C, tanto para cultivos com agitação constante, quanto para meios com substratos sólidos. As produções de enzimáticas variam de acordo com o fungo utilizado, com o substrato, com as condições utilizadas no processo e com a metodologia empregada (HALTRICH et al., 1996).

#### **4.1.5. Efeito do aumento do pH do meio de cultivo sobre a atividade da xilanase**

O efeito do aumento do pH pela adição de solução de hidróxido de sódio ao meio com farelo de trigo foi avaliado em triplicata. A adição de NaOH elevou o pH do meio de 5,7 para 6,7. Foram realizadas determinações do pH após quatro dias de cultivo e os valores estão apresentados na Tabela 7 juntamente com as atividades da xilanase.

O aumento do pH do meio foi positivo apenas para *G. roseum* e *C. paradoxa*, este último crescendo a 22°C apresentou a segunda maior atividade da xilanase (146,26 U). Para os outros três fungos, o aumento do pH não promoveu efeito positivo sobre a atividade da xilanase. Os dois tratamentos apresentaram valores próximos, sendo

ligeiramente menor no meio onde o pH foi elevado, principalmente nos cultivos com *P. simplicissimum* e *T. inhamatum*. Este último apresentou a maior atividade da xilanase (496,72 U). Todos estes resultados, contudo, foram superiores aos apresentados na Tabela 6, estas diferenças podem ser justificadas parcialmente pelo aprimoramento da técnica utilizada no processo de maneira geral e a escolha de melhores diluições na preparação das amostras.

TABELA 7. Atividade da xilanase dos fungos em meio de farelo de trigo, nas temperaturas ótimas de crescimento, após 4 dias.

| Fungos                   | Temperatura<br>(°C) | U (mmols.ml <sup>-1</sup> .min <sup>-1</sup> ) |               | pH (*) |      |
|--------------------------|---------------------|------------------------------------------------|---------------|--------|------|
|                          |                     | A                                              | B             | A      | B    |
| <i>C. paradoxa</i>       | 22                  | 143,58                                         | <b>146,26</b> | 6,37   | 6,25 |
| <i>G. roseum</i>         | 31                  | 53,55                                          | <b>64,86</b>  | 6,60   | 7,18 |
| <i>P. simplicissimum</i> | 28                  | <b>116,83</b>                                  | 116,76        | 6,20   | 6,04 |
| <i>T. inhamatum</i>      | 28                  | <b>496,72</b>                                  | 493,62        | 6,22   | 6,77 |
| <i>T. viride</i>         | 28                  | <b>120,10</b>                                  | 86,60         | 6,92   | 6,53 |

Legenda: U = unidades de atividade da xilanase; A = controle (pH = 5,7); B = meio com NaOH (pH = 6,7); (\*) = pH do final do cultivo.

#### 4.1.6. Efeito do processo de extração na atividade da xilanase

A Tabela 8 apresenta as médias dos resultados da atividade xilanase de *C. paradoxa*, em diferentes processos de extração para obtenção do extrato enzimático bruto. A extração com tampão acetato de sódio 0,05 M, pH 5,0 (192,81 U) e com solução de Tween 80 a 0,1% (181,41 U) foram mais efetivas do que o controle que utilizou água destilada (176,30 U).

A maior ou menor recuperação das enzimas de um meio de cultura está envolvida com o fato destas estarem ligadas, em graus variáveis, com o substrato. Desta forma, uma solução tampão ou um agente surfactante, como a solução de T80, facilitar esta separação. A compressão dos sólidos do meio de cultura por uma prensa hidráulica,

contudo, possibilitou melhores recuperações e maior homogeneidade do caldo enzimático (ROUSSOS et al., 1992). Esta técnica não foi utilizada no presente estudo, mas o uso da mesma no futuro poderá otimizar os resultados aqui obtidos.

TABELA 8. Atividade da xilanase de *C. paradoxa* em diferentes processos de extração.

| Extração | Temperatura (°C) | U (mmols.ml <sup>-1</sup> .min <sup>-1</sup> ) |
|----------|------------------|------------------------------------------------|
| A        | 22               | 176,30                                         |
| B        | 22               | <b>192,81</b>                                  |
| C        | 22               | 181,41                                         |

Legenda: A = Extração com água destilada; B = Extração com tampão acetato de sódio 0,05 M pH 5,0; C = Extração com solução de Tween 80 a 0,1%.

#### 4.1.7. Efeito da temperatura na atividade da xilanase de *C. paradoxa*

A Tabela 9 apresenta as médias de 3 repetições dos resultados obtidos com *C. paradoxa* cultivado em diferentes temperaturas (16° e 19°C) e o efeito na produção de enzimas em MFT suplementado. *C. paradoxa* apresentou maior atividade a 19°C (202,84 U), 15% a mais em relação ao controle (176,30 U). O MFT suplementado apresentou resultados próximos, porém ligeiramente inferiores ao controle sem suplementação.

TABELA 9. Atividade da xilanase de *C. paradoxa* em diferentes temperaturas.

| Temperatura (°C) | U (mmols.ml <sup>-1</sup> .min <sup>-1</sup> ) |
|------------------|------------------------------------------------|
| 16               | 62,44                                          |
| 19               | <b>202,84</b>                                  |
| 22               | 176,30                                         |
| 22 *             | 173,50                                         |

Legenda: (\*) Meio suplementado com: 0,7% de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,2% de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,05% de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 0,1% de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 0,06% de extrato de leveduras.

*C. paradoxa* apresentou maior atividade da xilanase a 19°C, em faixa de temperatura mais baixa para os organismos mesófilos. Em um ambiente de floresta, onde ocorrem variações de temperatura de acordo com as estações, como é o caso da EEJI, estes fungos podem ter papel importante no processo de reciclagem da matéria orgânica em períodos de menor temperatura ambiente, o que leva a uma diminuição do metabolismo e da competição com os organismos mesófilos presentes, tornando-os mais ativos e participantes.

#### 4.1.8. Cultivo de *T. inhamatum* em diferentes substratos

A Tabela 10 apresenta as médias, de 3 repetições, dos resultados da atividade da xilanase de *T. inhamatum* em diferentes substratos, totalizando 10 cultivos. Os frascos foram incubados por 4 dias a 25°C.

TABELA 10. Atividade da xilanase de *T. inhamatum* em diferentes substratos, após 4 dias a 25°C, a extração foi realizada com 30 ml de tampão acetato de sódio 0,05 M, pH 5,0.

| Cultivos | Substratos                                  | U      |
|----------|---------------------------------------------|--------|
| 1        | farelo de trigo                             | 346,34 |
| 2        | farelo de arroz                             | 12,71  |
| 3        | palha de arroz                              | 3,93   |
| 4        | sabugo de milho triturado                   | 7,18   |
| 5        | farelo de trigo + farelo de arroz           | 196,58 |
| 6        | farelo de trigo + palha de arroz            | 23,47  |
| 7        | farelo de trigo + sabugo de milho triturado | 104,06 |
| 8        | farelo de arroz + palha de arroz            | 7,67   |
| 9        | farelo de arroz + sabugo de milho triturado | 10,56  |
| 10       | palha de arroz + sabugo de milho triturado  | 4,51   |

Legenda: U = unidades de atividade da xilanase ( $\mu\text{mols.ml}^{-1}.\text{min}^{-1}$ ).

De todos os cultivos, a maior atividade da xilanase foi encontrada no meio controle com farelo de trigo (346,34 U), entretanto, este valor foi inferior ao obtido a

28°C (496,72 U). Esta diminuição pode ser devida tanto à temperatura de incubação utilizada (25°C), quanto à extração com tampão acetato de sódio, ao invés de água destilada como vinha sendo anteriormente executado, demonstrando que pode não ser um agente extrator mais adequado para as condições dos experimentos aqui usados ou ainda, devido a prováveis ligações das enzimas ao substrato (ROUSSOS et al., 1992).

Os demais substratos, nas condições dos experimentos, não foram bons indutores de enzimas, como pode ser constatado pela baixa atividade da xilanase apresentada em farelo de arroz (12,71 U), sabugo de milho triturado (7,18 U) e palha de arroz (3,93 U). Entre os cultivos com misturas de substratos, o que mais se destacou foi farelo de trigo com farelo de arroz (196,58 U), entretanto, este valor foi 43,0% menor em relação ao controle. A palha de arroz teve influência negativa direta na atividade da xilanase, uma vez que os meios que receberam palha de arroz apresentaram os resultados inferiores, até mesmo quando este substrato foi misturado com farelo de trigo (23,47 U), o que pode ser justificado pelo substrato ser mais seco e absorver maior quantidade de água, diminuindo a umidade do meio de cultivo e também por não receber nenhum tratamento prévio.

Enzimas celulolíticas (FPase) e hemicelulolíticas foram produzidas em extrato de silagem de sorgo doce contendo (% de peso seco) 26,0% de celulose, 34,0% de hemicelulose, 3,5% de proteína, 4,0% de açúcares redutores e 22,5% de lignina e cinzas, por uma cultura mista composta por *T. reesei* LM-1 e *A. niger* ATCC 10864. Os níveis ótimos de celulase e xilanase obtidos ao final de 120 h foram, respectivamente 4 U.g<sup>-1</sup> e 180 U.g<sup>-1</sup> de peso seco, sendo que *A. niger* foi inoculado 48 h após a inoculação de *T. reesei*. Os cultivos foram realizados em jaras contendo 13,3 g do substrato. As jaras foram incubadas a 30°C em câmara com 100,0% de umidade relativa



(CASTILLO et al., 1994). Contudo, esta produção de xilanase foi inferior a obtida com *T. inhamatum* ao final de 96 h em meio de farelo de trigo ( $2.980 \text{ U.g}^{-1}$ ).

A palha de arroz em vários bio-reatores foi citada como um excelente substrato para a produção de celulases e xilanas por *Aspergillus niger* KKS, não somente para a atividade como também para a produtividade, destacando-se a atividade da xilanase em reator de coluna com borbulhamento apresentando  $9.100 \text{ U.g}^{-1}$  e a maior produtividade de  $823 \text{ U.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$  em reator de dispersão de ar de curva externa com realimentação, o que equivale, aproximadamente, a 110 U (KIM et al., 1997). A palha de arroz para *T. inhamatum* foi um péssimo substrato, nas condições desenvolvidas, visto a baixa atividade da xilanase obtida (3,93 U, correspondendo a  $23,6 \text{ U.g}^{-1}$ ).

HALTRICH et al., (1996), citam várias espécies de microrganismos produtores de xilanase, os substratos onde foram cultivadas, as condições operacionais e as respectivas referências bibliográficas. Alguns resultados foram superiores aos aqui obtidos com *T. inhamatum* em farelo de trigo após 4 dias a  $28^{\circ}\text{C}$  ( $496,72 \text{ U}$  correspondendo a  $2.980 \text{ U.g}^{-1}$ ). Dentre eles, destacam-se: *Schizophyllum commune* BT 2115, cultivado em  $73,4 \text{ g.l}^{-1}$  de avicel, em fermentador de 9,5 litros, pH 7,0 a  $30^{\circ}\text{C}$  por 200 h, obtendo  $4.839 \text{ U.ml}^{-1}$  (HALTRICH et al., 1993); *Trichoderma reesei* cultivado em  $27 \text{ g.l}^{-1}$  de lactose mais  $3 \text{ g.l}^{-1}$  de “solka flocc” em frascos agitados, com as células imobilizadas a  $27^{\circ}\text{C}$  por 10 dias, obtendo  $3.350 \text{ U.ml}^{-1}$  (HAAPALA et al. apud HALTRICH et al., 1996); *Aspergillus fumigatus* ATCC 46324 cultivado em  $40 \text{ g.l}^{-1}$  de feno, em frascos agitados, a  $37^{\circ}\text{C}$ , durante 96 h, produzindo atividade de  $900 \text{ U.ml}^{-1}$  (STEWART et al., 1983), contudo, os substratos e as condições operacionais foram diferentes.

A maior atividade da xilanase produzida em farelo de trigo, das referências consultadas, foi obtida com *Aspergillus oryzae* VTT-D-85248 em 60 g.l<sup>-1</sup>, em fermentador de 10 litros, pH 4,0 a 5,0, 30°C e 80 h, alcançando 102 U.ml<sup>-1</sup> (BAILEY & POUTANEN, 1989), o que corresponde à cerca de 20% da atividade de *T. inhamatum*.

Não foi encontrada nenhuma citação do cultivo de *T. inhamatum* e/ou *C. paradoxa* para produção de enzimas xilanolíticas, por outro lado, poucos trabalhos citam a utilização de farelo de trigo como substrato para atividade enzimática (POUTANEN et al. apud HALTRICH et al., 1996); BAYLEY & POUTANEN, 1989; JOHNSON et al., 1989; WIACEK-ZYCHLINSKA et al. apud HALTRICH et al., (1996); BANSOD et al., 1993; RAJ & CHANDRA, 1995; SINGH et al., 1995), cujos resultados são inferiores aos aqui obtidos com *T. inhamatum* e *C. paradoxa*.

#### **4.1.9. Efeito da aplicação de ultra-som na obtenção do extrato enzimático**

A Tabela 11 apresenta os valores em unidades de atividade da xilanase (U) dos quatro cultivos realizados com *T. inhamatum* em MFT, para verificar a influência da aplicação de ultra-som em baixa intensidade sobre a liberação de enzimas no meio de cultura. Estes dados foram analisados estatisticamente pelo procedimento de análise de variância determinado pelo teste de Tukey (SOKAL & ROHLF, 1995).

O teste de Tukey, não detectou variação em função do tempo de aplicação, contudo, houve variação ao nível de 5% em relação à energia liberada no sistema. A aplicação de ultra-som tendeu a diminuir a quantidade de enzimas presentes, medidas em função das unidades de atividade da xilanase. Este fato pode ser devido a grande quantidade de matéria sólida em suspensão, o que dificultou a dissipação do calor gerado pela sonda ou mesmo pelo tipo de sonda utilizado. Desta forma a aplicação de

ultra-som para aumentar a liberação de enzimas no meio líquido, nas condições realizadas neste experimento, não é recomendada.

TABELA 11. Aplicação de ultra-som na obtenção do extrato enzimático, após cultivo de *T. inhamatum* em farelo de trigo, após 4 dias a 25°C.

| <b>Amplitude (%)</b> | <b>Tempo (min)</b> | <b>Unidades de atividade da xilanase por cultivo (repetições)</b> |        |        |        |
|----------------------|--------------------|-------------------------------------------------------------------|--------|--------|--------|
| 0                    | 10                 | 353,26                                                            | 335,63 | 246,80 | 318,90 |
| 10                   | 10                 | 288,14                                                            | 278,98 | 225,70 | 242,97 |
| 20                   | 10                 | 320,97                                                            | 243,35 | 202,35 | 268,99 |
| 30                   | 10                 | 327,24                                                            | 248,10 | 216,35 | 264,51 |
| 0                    | 20                 | 385,33                                                            | 348,11 | 213,26 | 302,56 |
| 10                   | 20                 | 322,66                                                            | 313,73 | 218,48 | 297,73 |
| 20                   | 20                 | 285,48                                                            | 226,08 | 142,19 | 203,30 |
| 30                   | 20                 | 323,00                                                            | 285,08 | 145,10 | 200,74 |
| 0                    | 30                 | 344,33                                                            | 373,74 | 279,46 | 304,50 |
| 10                   | 30                 | 306,21                                                            | 332,31 | 230,62 | 286,87 |
| 20                   | 30                 | 226,78                                                            | 262,25 | 257,80 | 212,55 |
| 30                   | 30                 | 376,68                                                            | 178,78 | 176,02 | 181,59 |

Legenda: U = unidade de atividade da xilanase ( $\mu\text{mols} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ).

A aplicação de ultra-som em biotecnologia é relativamente recente, mas vários processos que se desenvolvem na presença de células ou enzimas são ativados por ondas ultra-sônicas. Aplicações ultra-sônicas de alta intensidade, lisam células e desnaturam enzimas, enquanto que aplicações de baixa intensidade podem modificar o metabolismo celular ou acelerar a transferência de massa de reagentes e produtos através da parede e membranas celulares (SINISTERRA, 1992). Desta forma a aplicação de ultra-som em baixa intensidade poderia favorecer a transferência de massa, ou seja, acentuar o movimento do meio líquido, aumentando a liberação de enzimas xilanolíticas na suspensão aquosa, pelas células do microrganismo ou do substrato sólido após cultivo, o que não ocorreu neste experimento.

## 4.2. Ácido g-linolênico

### 4.2.1. Isolamento de fungos produtores de ácido g-linolênico na Estação Ecológica de Juréia-Itatins, SP

A coleta de solo realizada no final do mês de janeiro de 2000 na Estação Ecológica de Juréia-Itatins, SP, possibilitou o isolamento de 32 linhagens de zigomicetos, 18 colônias de *M. hiemalis*, sendo 9 colônias de *M. hiemalis* var *hiemalis*, 4 colônias de *C. simplex*, 5 colônias de *Mucor* sp1, e 1 colônia de cada uma das seguintes espécies: *Absidia* sp, *Mucor* sp2, *Mucor* sp3, *M. circinelloides* e *M. ramosissimus*. Estes fungos estão sendo identificados com a orientação da Dr<sup>a</sup>. Sandra Farto Botelho Trufem do Instituto de Botânica de São Paulo.

Destas 32 linhagens, apenas duas foram isoladas em ágar com rosa-bengala. O meio de cultura utilizado por BOTHÁ et al. (1995) para isolamento de fungos mucoráceos acetato tolerantes, proporcionou melhor aproveitamento. Este meio de cultura por conter 2% de acetato de sódio como fonte de carbono, dificultou o crescimento de outras espécies facilitando o crescimento e a posterior identificação dos zigomicetos que foram isolados mais facilmente nas amostras de solo. Dos microrganismos isolados, apenas uma linhagem de fungo por amostra foi preservada, optando-se pela mais vigorosa, descartando as que apresentaram contaminações em algum ponto da placa de Petri. Desta forma foram selecionadas e cultivadas 19 linhagens de fungos.

#### 4.2.2. Seleção preliminar de fungos produtores de ácido g-linolênico

A Tabela 12 apresenta a produção de biomassa e a produção de ácido  $\gamma$ -linolênico dos fungos isolados do solo da Estação Ecológica de Juréia-Itatins, SP.

*M. ramosissimus* foi selecionado para prosseguimento dos estudos, de acordo com a maior produção de ácido  $\gamma$ -linolênico na biomassa seca, entre as linhagens cultivadas nas condições do experimento aqui proposto.

TABELA 12. Produção de biomassa e de ácido  $\gamma$ -linolênico dos fungos cultivados em meio constituído de 2% de glicose e 1% de extrato de levedura, a 25°C. Culturas realimentadas com 20% de meio após 4 dias e incubadas por mais 3 dias a 12°C.

| Fungos                        |               | Biomassa<br>(g.l <sup>-1</sup> ) | Ácido g-linolênico     |                       |
|-------------------------------|---------------|----------------------------------|------------------------|-----------------------|
| Linhagem                      | Identificação |                                  | (mg.ml <sup>-1</sup> ) | (mg.l <sup>-1</sup> ) |
| <i>C. simplex</i>             | J1            | 4,60                             | 195                    | 15,44                 |
| <i>C. simplex</i>             | J2            | 5,61                             | 129                    | 12,85                 |
| <i>C. simplex</i>             | J3            | 5,74                             | 165                    | 14,48                 |
| <i>M. hiemalis</i>            | J4            | 7,89                             | 132                    | 20,60                 |
| <i>M. hiemalis</i>            | J5            | 7,41                             | 276                    | 30,60                 |
| <i>M. hiemalis</i>            | J6            | 7,66                             | 254                    | 43,05                 |
| <i>M. hiemalis</i>            | J7            | 6,04                             | 249                    | 24,84                 |
| <i>M. hiemalis</i>            | J8            | 6,89                             | 218                    | 45,12                 |
| <i>M. hiemalis</i>            | J9            | 7,61                             | 315                    | 40,10                 |
| <i>M. hiemalis</i>            | J10           | 9,04                             | 151                    | 21,40                 |
| <i>M. hiemalis</i>            | J11           | 8,02                             | 87                     | 10,07                 |
| <i>Absidia</i> sp             | J12           | 6,32                             | 372                    | 33,25                 |
| <i>Mucor</i> sp1              | J13           | 6,07                             | 222                    | 22,87                 |
| <i>Mucor</i> sp1              | J14           | 6,20                             | 317                    | 38,32                 |
| <i>Mucor</i> sp1              | J15           | 6,98                             | 217                    | 34,41                 |
| <i>Mucor</i> sp3              | J16           | 6,04                             | 269                    | 33,09                 |
| <i>M. circinelloides</i>      | J17           | 4,15                             | 287                    | 19,47                 |
| <i>Mucor</i> sp2              | J18           | 7,88                             | 91                     | 13,05                 |
| <b><i>M. ramosissimus</i></b> | <b>J19</b>    | <b>7,67</b>                      | <b>364</b>             | <b>47,70</b>          |
| <i>A. corynbifera</i>         | 3142          | 3,85                             | 70                     | 7,06                  |
| <i>A. glauca</i>              | 3141          | 7,78                             | 304                    | 42,25                 |
| <i>C. simplex</i>             | 3222          | 5,65                             | 115                    | 13,46                 |
| <i>M. hiemalis</i>            | 66            | 4,58                             | 77                     | 4,98                  |
| <i>R. sexualis</i>            | 3218          | 5,37                             | 21                     | 3,85                  |
| <i>Z. moelleri</i>            | 1744          | 6,97                             | 161                    | 23,68                 |

#### 4.2.3. Efeito do tempo de incubação na produção de biomassa, lipídios totais e ácido g-linolênico de *M. ramosissimus*

As Figuras 2 e 3 apresentam a curva de crescimento de *M. ramosissimus*, durante 10 dias, a 25°C com agitação constante de 150 rpm. A maior produção de biomassa (10,00 g.l<sup>-1</sup>) foi observada no terceiro dia, onde ocorreu a maior produção de lipídios totais (Figura 2), e o esgotamento da glicose (Figura 3). Com o total esgotamento da glicose após o quarto dia, observou-se diminuição gradativa da biomassa e conseqüentemente do teor de lipídios totais da mesma.

A Tabela 13 apresenta os resultados da produção de biomassa e de lipídios totais (g.l<sup>-1</sup>), a porcentagem relativa de AGL em relação aos ácidos graxos totais e a produção de AGL em função da biomassa seca (mg.g<sup>-1</sup>) e do meio de cultura (mg.l<sup>-1</sup>).

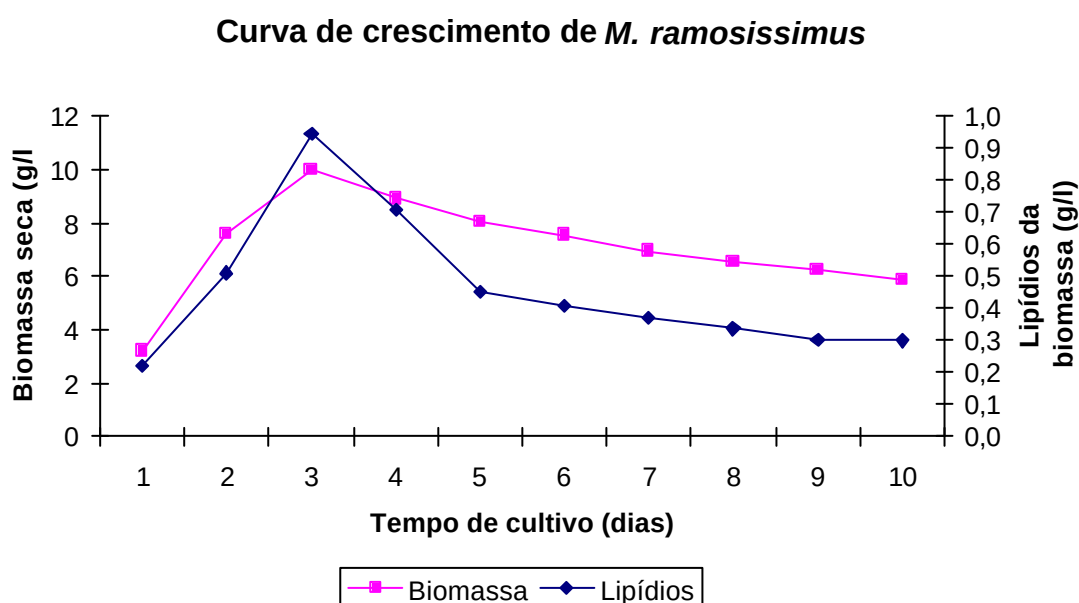


FIGURA 2. Produção de biomassa e lipídios totais por *M. ramosissimus*, durante 10 dias a 25°C, a 150 rpm.

### Curva de crescimento de *M. ramosissimus*

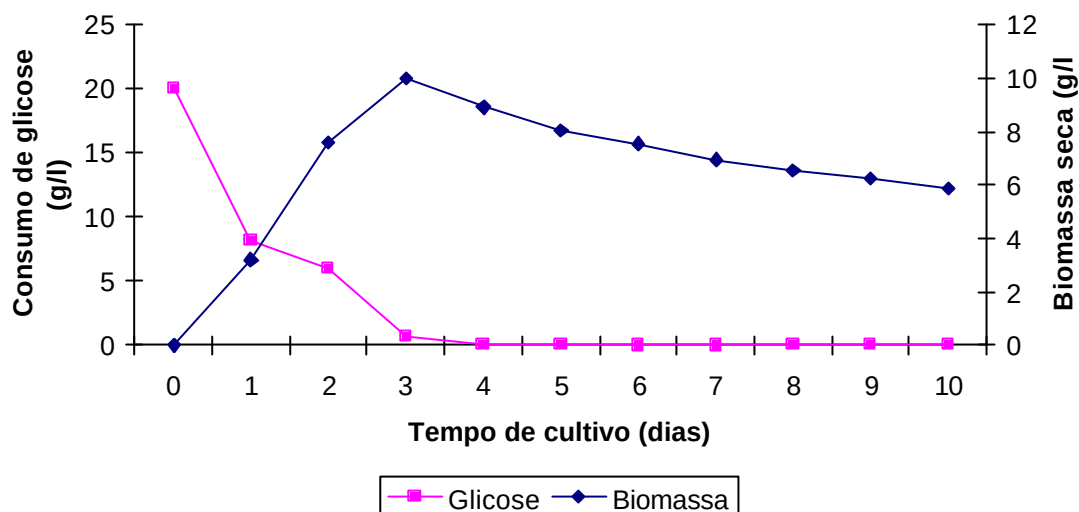


FIGURA 3. Produção de biomassa e consumo de glicose por *M. ramosissimus*, durante 10 dias a 25°C, a 150 rpm.

A porcentagem relativa de AGL em relação aos ácidos graxos totais, obtidos por cromatografia gasosa em diferentes tempos de incubação, variou de 24,2%, obtida no segundo dia, a 35,7%, obtida no décimo dia, correspondendo a uma diferença de 32,3%. Após o quarto dia de cultivo esta aumenta, enquanto que os valores de biomassa seca e as proporções de AGL em função da biomassa seca e do meio de cultura diminuem, o que ocorre devido ao esgotamento da glicose no meio de cultura.

A porcentagem relativa de AGL de várias espécies de zigomicetos foi analisada e em algumas espécies a composição variou de 34,8 a 61,9% do total dos ácidos graxos, dentre as que mais se destacaram encontram-se *Circinella simplex* (CBS 142.35), *Mucor indicus* (ATCC 4855), *Syzygites megalocarpus* (ATCC 18025) e *Zygorhynchus moelleri* (UAMH 1556) contendo 42,0; 34,8; 61,9 e 42,0%, respectivamente (WEETE et al., 1998).

A porcentagem de lipídios totais na biomassa seca obtida com *M. ramosissimus* após 3 dias de incubação (8,1% p/p) foi menor do que as obtidas por TORLANOVA et

al. (1992) com *Mucor* INMI após 3 dias (19,3% p/p) e por CARVALHO (1994) com *Mucor* sp LB-54 após 5 dias de incubação (20,7%). KENDRICK & RATLEDGE (1992) relataram que os fungos *Thraustochytrium aureum* e *Saprolegnia parasitica* contém cerca de 10% p/p de lipídios totais na biomassa seca, enquanto que as espécies *Conidiobolus nanodes*, *Entomorphthora exitalis* e *Mortierella alpina-peyron*, conhecidas como oleaginosas, contém acima de 20% de lipídios totais na biomassa (25,7%, 24,6% e 37,7% p/p, respectivamente).

TABELA 13. Efeito do tempo de incubação no crescimento, conteúdo de lipídios totais e produção de AGL de *M. ramosissimus*, após incubação a 25°C em meio GY, a 150 rpm.

| Tempo de incubação<br>(dias) | Biomassa seca<br>(g.l <sup>-1</sup> ) | Lipídios                       |                            | Ácido g-linolênico /                 |                                        |                                          |
|------------------------------|---------------------------------------|--------------------------------|----------------------------|--------------------------------------|----------------------------------------|------------------------------------------|
|                              |                                       | totais<br>(g.l <sup>-1</sup> ) | / Biomassa seca<br>(% p/p) | Ácidos graxos totais<br>(% relativa) | Biomassa seca<br>(mg.g <sup>-1</sup> ) | Meio de cultura<br>(mg.l <sup>-1</sup> ) |
| 1                            | 3,22                                  | 0,22                           | 6,89                       | 26,02                                | 7,84                                   | 25,23                                    |
| 2                            | 7,59                                  | 0,51                           | 6,73                       | 24,15                                | 6,68                                   | 50,70                                    |
| 3                            | 10,00                                 | 0,81                           | 8,12                       | 24,17                                | 8,51                                   | 84,40                                    |
| 4                            | 8,91                                  | 0,71                           | 7,93                       | 26,23                                | 6,83                                   | 60,85                                    |
| 5                            | 8,02                                  | 0,45                           | 5,63                       | 28,96                                | 3,84                                   | 30,78                                    |
| 6                            | 7,55                                  | 0,41                           | 5,39                       | 32,70                                | 4,62                                   | 34,87                                    |
| 7                            | 6,94                                  | 0,37                           | 5,35                       | 33,38                                | 4,03                                   | 27,99                                    |
| 8                            | 6,56                                  | 0,34                           | 5,13                       | 34,24                                | 4,02                                   | 26,36                                    |
| 9                            | 6,22                                  | 0,30                           | 4,86                       | 33,77                                | 4,38                                   | 27,24                                    |
| 10                           | 5,87                                  | 0,30                           | 5,09                       | 35,66                                | 4,73                                   | 27,74                                    |

#### 4.2.4. Composição relativa de ácidos graxos de *M. ramosissimus*

As composições relativas dos ácidos graxos referentes aos cultivos sobre o efeito do tempo de incubação são apresentadas na Tabela 14. Os ácidos palmítico (16:0), oléico (18:1), linoléico (18:2) e  $\gamma$ -linolênico (18:3), estão presentes em todos os cultivos, sendo que o ácido oléico o que apresenta maior quantidade. Este e o ácido palmítico apresentam diminuição após o quarto dia enquanto que o ácido linoléico



permanece estável. Os ácidos mirístico (14:0) e esteárico (18:0), são detectados até o quinto dia e os ácidos pentadecanóico (15:0) e palmitoléico (18:1), após o sétimo e o oitavo dias, respectivamente.

TABELA 14. Efeito do tempo de incubação no conteúdo de ácidos graxos de *M. ramosissimus*, após incubação a 25°C em meio GY, a 150 rpm.

| Tempo<br>(dias) | Composição relativa dos ácidos graxos (%) |        |        |        |        |        |      |        |        |        |
|-----------------|-------------------------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|------|--------|--------|--------|
|                 | (14:0)                                    | (15:0) | (16:0) | (16:1) | (18:0) | (18:1) | n.i. | (18:2) | (18:3) | Outros |
| 1               | 0,87                                      | -      | 18,51  | -      | 3,99   | 33,66  | -    | 14,19  | 26,02  | 2,76   |
| 2               | 1,13                                      | -      | 17,86  | 0,75   | 4,08   | 39,46  | 0,93 | 11,63  | 24,15  | -      |
| 3               | 1,37                                      | 0,32   | 16,97  | -      | 5,11   | 41,86  | 1,31 | 9,55   | 22,61  | 0,89   |
| 4               | 1,15                                      | -      | 15,80  | -      | 3,35   | 41,16  | 1,45 | 10,26  | 26,23  | 0,60   |
| 5               | 1,17                                      | -      | 15,85  | -      | 1,62   | 40,48  | 1,39 | 10,53  | 28,96  | -      |
| 6               | -                                         | -      | 14,34  | 1,27   | -      | 39,47  | 1,32 | 10,90  | 32,70  | -      |
| 7               | -                                         | 1,18   | 13,82  | 1,19   | -      | 38,57  | 1,35 | 10,51  | 33,38  | -      |
| 8               | -                                         | 1,49   | 13,55  | 1,43   | -      | 38,65  | -    | 10,64  | 34,24  | -      |
| 9               | -                                         | 1,52   | 12,68  | 1,45   | -      | 38,66  | 1,38 | 10,54  | 33,77  | -      |
| 10              | -                                         | 1,39   | 11,83  | 1,59   | -      | 37,42  | 1,33 | 10,78  | 35,66  | -      |

Legenda: Ácido mirístico (14:0), ácido pentadecanóico (15:0), ácido palmítico (16:0), ácido palmitoléico (16:1), ácido esteárico (18:0), ácido oléico (18:1), ácido linoléico (18:2), AGL (18:3), n.i. = não identificado.

#### 4.2.5. Efeito do pH inicial do meio de cultura na obtenção de biomassa, lipídios totais e ácido g-linolênico de *M. ramosissimus*

As Figuras 4 e 5 apresentam a produção de biomassa, lipídios totais (Figura 4) e consumo da glicose (Figura 5) e a Tabela 15 os resultados obtidos do efeito do pH inicial no crescimento, conteúdo de lipídios totais e produção de ácido  $\gamma$ -linolênico de *M. ramosissimus*, cultivada por 4 dias, a 25°C com agitação constante de 150 rpm.

O meio de cultura com pH inicial de 4,5 foi o que apresentou maior produção de biomassa (10,1 g.L<sup>-1</sup>) e lipídios totais (0,90 g.L<sup>-1</sup>). Os meios com pHs de 3,5 e 4,0 foram os únicos onde a glicose não se esgotou.

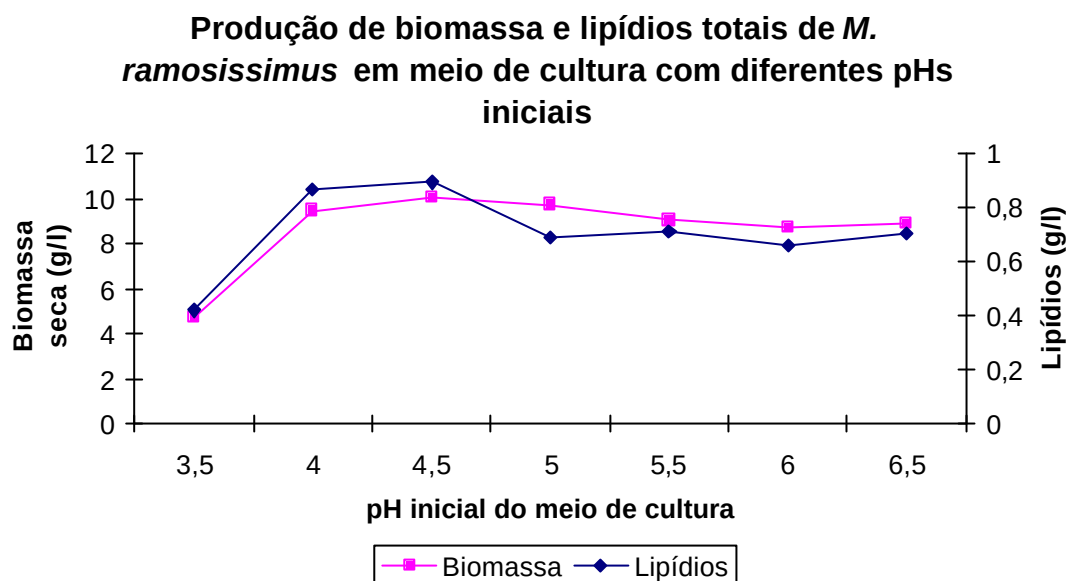


FIGURA 4. Produção de biomassa e lipídios totais de *M. ramosissimus* em meio de cultura com diferentes pHs iniciais.

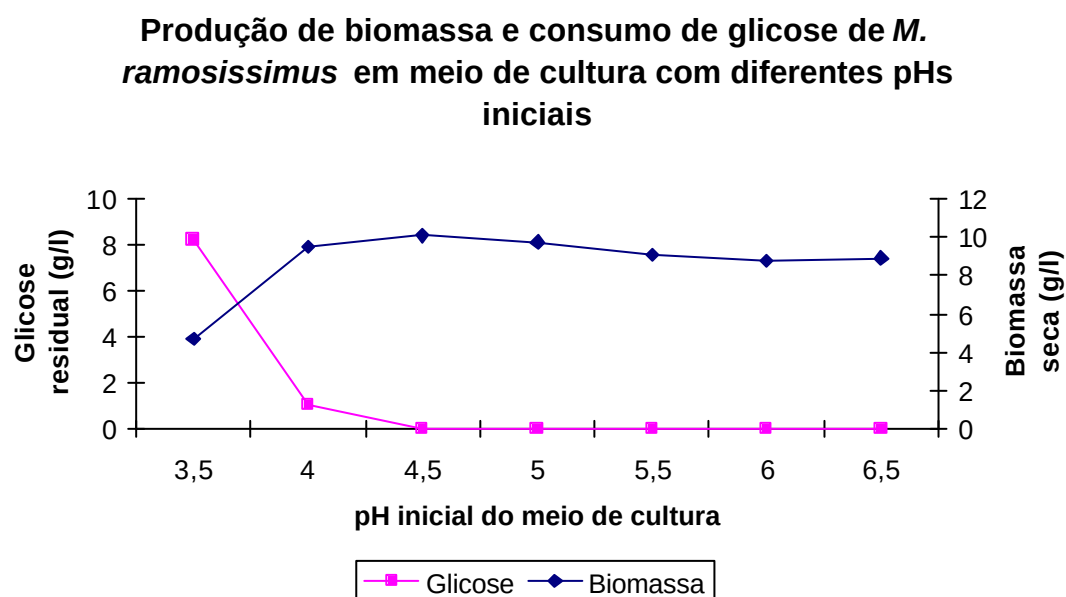


FIGURA 5. Produção de biomassa e consumo de glicose de *M. ramosissimus* em meio de cultura com diferentes pHs iniciais.

TABELA 15. Efeito do pH inicial no crescimento, conteúdo de lipídios totais e produção de ácido  $\gamma$ -linolênico de *M. ramosissimus*, após incubação a 25°C em meio GY, a 150 rpm, por 4 dias.

| pH inicial<br>do meio de<br>cultura | Biomassa<br>seca<br>(g.l <sup>-1</sup> ) | Lipídios                       |                               | Ácido g-linolênico /                    |                                           |                                             |
|-------------------------------------|------------------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|-----------------------------------------|-------------------------------------------|---------------------------------------------|
|                                     |                                          | totais<br>(g.l <sup>-1</sup> ) | / Biomassa<br>seca<br>(% p/p) | Ácidos<br>graxos totais<br>(% relativa) | Biomassa<br>seca<br>(mg.g <sup>-1</sup> ) | Meio de<br>cultura<br>(mg.l <sup>-1</sup> ) |
| 3,5                                 | 4,72                                     | 0,42                           | 8,90                          | 21,90                                   | 8,24                                      | 38,91                                       |
| 4,0                                 | 9,49                                     | 0,87                           | 9,15                          | 21,76                                   | 9,16                                      | 86,96                                       |
| 4,5                                 | 10,07                                    | 0,90                           | 8,90                          | 24,55                                   | 10,57                                     | 106,44                                      |
| 5,0                                 | 9,74                                     | 0,69                           | 7,09                          | 26,78                                   | 8,20                                      | 79,88                                       |
| 5,5                                 | 9,07                                     | 0,72                           | 7,89                          | 26,67                                   | 7,32                                      | 66,46                                       |
| 6,0                                 | 8,74                                     | 0,66                           | 7,59                          | 26,63                                   | 7,50                                      | 65,61                                       |
| 6,5                                 | 8,91                                     | 0,71                           | 7,93                          | 26,23                                   | 6,83                                      | 60,85                                       |

O valor do pH inicial do meio de cultura proporcionou melhores resultados quando comparados com o cultivo realizado no mesmo período (meio de cultura com pH 6,5). A produção de biomassa seca e a relação dos lipídios totais na biomassa foram 11% e os lipídios totais 21% maiores, porém a porcentagem relativa de AGL em relação aos ácidos graxos totais foi 6% menor.

O valor do pH inicial do meio de cultura tem sido usado numa faixa de 6 a 7 para produção de lipídios por diferentes fungos dos gêneros *Choanephora*, *Mortierella*, *Mucor*, *Rhizopus* (DEVEN & MANOCHA, 1975; SAJBIDOR et al., 1988; SHIMIZU et al., 1988).

#### 4.2.6. Efeito de diferentes fontes de carbono na produção de biomassa, lipídios totais e ácido g-linolênico de *M. ramosissimus*

A Tabela 16 apresenta a produção de biomassa de *M. ramosissimus*, cultivada a 25°C por 3 dias, sob agitação constante de 150 rpm em diferentes fontes de carbono.

TABELA 16. Efeito de diferentes fontes de carbono no crescimento, conteúdo de lipídios totais e produção de ácido  $\gamma$ -linolênico de *M. ramosissimus*, após incubação a 25°C, a 150 rpm, por 3 dias.

| Fontes de carbono | Biomassa seca<br>(g.l <sup>-1</sup> ) | Lipídios                       |                            | Ácido g-linolênico /                 |                                        |                                          |
|-------------------|---------------------------------------|--------------------------------|----------------------------|--------------------------------------|----------------------------------------|------------------------------------------|
|                   |                                       | totais<br>(g.l <sup>-1</sup> ) | / Biomassa seca<br>(% p/p) | Ácidos graxos totais<br>(% relativa) | Biomassa seca<br>(mg.g <sup>-1</sup> ) | Meio de cultura<br>(mg.l <sup>-1</sup> ) |
| Acetato           | 3,39                                  | 0,12                           | 3,64                       | 14,80                                | 1,30                                   | 4,41                                     |
| Frutose           | 8,42                                  | 0,53                           | 6,27                       | 25,39                                | 3,35                                   | 28,24                                    |
| Galactose         | 7,39                                  | 0,51                           | 6,96                       | 26,13                                | 3,41                                   | 25,19                                    |
| Glicerol          | 2,83                                  | 0,19                           | 6,66                       | 29,83                                | 3,90                                   | 11,04                                    |
| Glicose           | 10,00                                 | 0,81                           | 8,12                       | 24,17                                | 8,51                                   | 84,40                                    |
| Lactose           | 2,04                                  | 0,13                           | 6,50                       | 30,48                                | 3,18                                   | 6,49                                     |
| Maltose           | 2,66                                  | 0,20                           | 7,51                       | 29,86                                | 3,72                                   | 9,92                                     |
| Manitol           | 2,18                                  | 0,09                           | 4,15                       | 30,60                                | 7,28                                   | 15,87                                    |
| Melezitose        | 2,19                                  | 0,05                           | 2,12                       | 29,38                                | 7,54                                   | 16,53                                    |
| Sacarose          | 2,30                                  | 0,24                           | 10,27                      | 29,81                                | 11,21                                  | 25,82                                    |
| Sorbitol          | 1,95                                  | 0,13                           | 6,84                       | 32,45                                | 4,14                                   | 8,07                                     |
| Trealose          | 8,29                                  | 0,45                           | 5,41                       | 25,50                                | 6,39                                   | 53,02                                    |
| Xilose            | 0,96                                  | 0,07                           | 7,06                       | 30,52                                | 3,51                                   | 3,36                                     |

A utilização dos substratos frutose, galactose e trealose resultaram em boa produção de biomassa, lipídios totais e em níveis satisfatórios de AGL por litro de meio de cultura, porém estes valores foram inferiores aos obtidos com glicose. Por outro lado a biossíntese de lipídios foi fortemente inibida com a utilização de manitol, melezitose e xilose como fontes de carbono.

O conteúdo relativo de AGL em relação aos ácidos graxos totais, mostrou que a utilização de todos os substratos com exceção do acetato de sódio, resultaram em lipídios mais insaturados com alto conteúdo de AGL, quando comparados com o cultivo com glicose como fonte de carbono, presentes na composição dos ácidos graxos de *M. ramosissimus*.

A glicose foi a melhor fonte de carbono utilizada por quatro fungos testados para obtenção de AGL. Além dela, *M. mucedo* também cresceu e produziu bem em

glicerol e *M. plumbeus* em maltose, sendo que o amido solúvel foi uma excelente fonte de carbono para *M. ramanniana* e *R. arrhizus* (SAJBIDOR et al., 1988).

Amido e amido hidrolisado foram melhores do que a glicose como fontes de carbono para produção de AGL por *M. rouxii* CBS 416.77 (LINDBERG & HANSSON, 1991). Por outro lado o amido não foi bem aceito pelo fungo *Mucor* sp LB-54. Para este fungo a glicose foi a fonte de carbono que promoveu maior conversão a AGL, outra fonte de carbono que se destacou foi a frutose. A lactose e a sacarose foram consideradas inibidores da biossíntese de lipídios (CARVALHO, 1994).

#### **4.2.7. Efeito de diferentes fontes de nitrogênio na produção de biomassa, lipídios totais e ácido g-linolênico de *M. ramosissimus***

Dez fontes de N foram testadas com *M. ramosissimus*, este cresceu em apenas quatro delas (Tabela 17), todas de origem orgânica. Destas o melhor resultado foi obtido com o extrato de leveduras que possibilitou maior crescimento e maior conteúdo de lipídios totais, produzindo a maior quantidade de AGL na biomassa. A presença de triptona no meio de cultura ocasionou diminuição dos ácidos graxos insaturados em comparação com os meios contendo peptona e extrato de leveduras. No meio com extrato de malte a produção de biomassa foi insuficiente para determinação da composição dos ácidos graxos da mesma.

Todas as fontes de N inorgânicas utilizadas causaram inibição do crescimento e não promoveram nenhuma produção de biomassa, resultado semelhante foi obtido com a utilização da uréia.

TABELA 17. Efeito de diferentes fontes de nitrogênio no crescimento, conteúdo de lipídios totais e produção de ácido  $\gamma$ -linolênico de *M. ramosissimus*, após incubação a 25°C, a 150 rpm, por 3 dias.

| Fontes de nitrogênio | Biomassa seca<br>(g.l <sup>-1</sup> ) | Lipídios                       |                            | Ácido g-linolênico /                 |                                        |                                          |
|----------------------|---------------------------------------|--------------------------------|----------------------------|--------------------------------------|----------------------------------------|------------------------------------------|
|                      |                                       | totais<br>(g.l <sup>-1</sup> ) | / Biomassa seca<br>(% p/p) | Ácidos graxos totais<br>(% relativa) | Biomassa seca<br>(mg.g <sup>-1</sup> ) | Meio de cultura<br>(mg.l <sup>-1</sup> ) |
| Ext. leved.          | 10,00                                 | 0,81                           | 8,12                       | 24,17                                | 8,51                                   | 84,40                                    |
| Ext. malte           | 0,81                                  | nd                             | nd                         | nd                                   | nd                                     | nd                                       |
| Peptona              | 3,28                                  | 0,11                           | 3,29                       | 24,78                                | 5,87                                   | 19,23                                    |
| Tryptona             | 3,40                                  | 0,12                           | 3,66                       | 13,42                                | 2,07                                   | 7,02                                     |

Legenda: nd = não determinado.

CARVALHO (1994) relatou que as fontes inorgânicas, como nitrato de potássio, cloreto de amônio e nitrato de sódio promoveram inibição do crescimento celular e da biossíntese de lipídios resultando em baixa produção de AGL por litro de meio de cultura, porém o sulfato de amônio promoveu um significativo valor da relação lipídios/biomassa (16,3 g de lipídios por 100,0 g de biomassa). Dentre as fontes orgânicas testadas extrato de malte resultou em maiores níveis de lipídios, embora não favoreceu a produção de AGL enquanto que a uréia causou inibição da biossíntese de lipídios pela linhagem LB-54 de *Mucor* sp. O autolisado de leveduras mostrou ser a segunda fonte mais eficiente, depois do extrato de leveduras, na produção de AGL por este fungo.

#### 4.2.8. Efeito da presença de íons metálicos na produção de biomassa, lipídios totais e ácido g-linolênico de *M. ramosissimus*

Verificou-se que a presença de íons metálicos não afetou significativamente a produção de biomassa, lipídios totais e AGL de *M. ramosissimus*, nas condições propostas. Os resultados são apresentados na Tabela 18.

TABELA 18. Efeito da presença de íons metálicos no meio de cultura na produção de biomassa, lipídios totais e AGL de *M. ramosissimus*, após 3 dias a 25°C, a 150 rpm.

| Meios de cultura | Biomassa seca<br>(g.l <sup>-1</sup> ) | Lipídios totais<br>(g.l <sup>-1</sup> ) | / Biomassa seca<br>(% p/p) | Ácido g-linolênico /                 |                                        |                                          |
|------------------|---------------------------------------|-----------------------------------------|----------------------------|--------------------------------------|----------------------------------------|------------------------------------------|
|                  |                                       |                                         |                            | Ácidos graxos totais<br>(% relativa) | Biomassa seca<br>(mg.g <sup>-1</sup> ) | Meio de cultura<br>(mg.l <sup>-1</sup> ) |
| A                | 10,00                                 | 0,81                                    | 8,12                       | 24,17                                | 8,51                                   | 84,40                                    |
| B                | 9,90                                  | 0,69                                    | 6,98                       | 25,65                                | 6,60                                   | 65,34                                    |
| C                | 8,38                                  | 0,72                                    | 8,56                       | 24,76                                | 8,54                                   | 71,55                                    |
| D                | 9,92                                  | 0,69                                    | 6,99                       | 25,89                                | 6,98                                   | 69,17                                    |

A – Meio GY;

B – Meio GY com: KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (2,4 g); MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (0,3 g); CaCl<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O (10,0 mg); FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (10,0 mg); ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (1,0 mg); MnSO<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O (1,0 mg); CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O (2,0 mg);

C – Meio idêntico ao (B), porém sem magnésio;

D – Meio idêntico ao (B), porém sem cobre e zinco.

A influência de alguns íons metálicos foi estudada no crescimento e produção de lipídios pelo fungo *M. ramanniana* CBS 112.08. A presença dos íons cobre e zinco teve um efeito positivo na acumulação de lipídios e na quantidade de AGL, pois pequenas quantidades de íons metálicos são geralmente necessárias para o crescimento celular e atividade enzimática. Porém nem a adição de manganês nem o aumento do teor de magnésio promoveram qualquer efeito significativo (HANSSON & DOSTÁLEK, 1988).

#### 4.2.9. Efeito da composição do meio de cultura na produção de biomassa, lipídios totais e ácido g-linolênico de *M. ramosissimus*

O efeito da composição do meio de cultura foi verificado com a utilização de meios com diferentes composições. A Tabela 19 apresenta os resultados obtidos com *M. ramosissimus*.

TABELA 19. Efeito da presença de íons metálicos no meio de cultura na produção de biomassa, lipídios totais e AGL de *M. ramosissimus*, após 3 dias a 25°C, a 150 rpm.

| Meios de cultura | Biomassa seca<br>(g.l <sup>-1</sup> ) | Lipídios totais<br>(g.l <sup>-1</sup> ) | / Biomassa seca<br>(% p/p) | Ácido g-linolênico /                 |                                        |                                          |
|------------------|---------------------------------------|-----------------------------------------|----------------------------|--------------------------------------|----------------------------------------|------------------------------------------|
|                  |                                       |                                         |                            | Ácidos graxos totais<br>(% relativa) | Biomassa seca<br>(mg.g <sup>-1</sup> ) | Meio de cultura<br>(mg.l <sup>-1</sup> ) |
| 1                | 1,80                                  | 0,07                                    | 3,64                       | 20,59                                | 5,38                                   | 9,70                                     |
| 2                | 6,42                                  | 0,20                                    | 3,14                       | 22,95                                | 4,40                                   | 28,28                                    |
| 3                | 0,50                                  | nd                                      | nd                         | nd                                   | nd                                     | nd                                       |
| 4                | 6,86                                  | 0,22                                    | 3,15                       | 26,33                                | 5,65                                   | 38,76                                    |
| 5                | 10,27                                 | 0,67                                    | 6,53                       | 25,73                                | 5,91                                   | 60,73                                    |

Legenda: nd = não determinado.

Em todos os meios de cultura, a glicose foi utilizada como fonte de carbono, contudo apresentou concentrações diferentes. Várias fontes de nitrogênio foram utilizadas. O meio 5 (meio GY) foi utilizado como padrão e fonte de comparação com os demais, utilizou somente extrato de leveduras como fonte de N. O meio 2 com cinco fontes de N (extrato de leveduras, extrato de malte, sulfato de amônio, peptona e uréia) e o meio 4 com duas (extrato de leveduras e nitrato de potássio) apresentaram resultados semelhantes, contrastando com o meio 1 que utilizou três fontes de N (sulfato de amônia, extrato de malte e peptona), contudo *M. ramosissimus* não cresceu nos meios contendo fontes inorgânicas de N, assim como em uréia, e apresentou baixo rendimento em extrato de malte e peptona.

No meio três com duas fontes de N (uréia e extrato de leveduras), além da presença inibidora da uréia, a concentração de glicose foi três vezes maior do que a do meio 5, conseqüentemente, exerceu aumento da pressão osmótica, inviabilizando o crescimento do fungo. CARVALHO (1994) obteve resultados melhores com a utilização destes meios de cultura, após 5 dias a 28°C com a linhagem de *Mucor* sp LB-54. O meio 1 apresentou maior relação entre os lipídios totais e a biomassa seca



(26,73%), porém com a menor produção de biomassa ( $3,90 \text{ g.l}^{-1}$ ). O meio 5 foi melhor que os demais que apresentaram resultados semelhantes entre si.

## 5. CONCLUSÕES

- Dentre os fungos isolados do solo da Estação Ecológica de Juréia-Itatins, SP, o que apresentou maior atividade da CMCase foi a espécie de *Trichoderma longibrachiatum*. *Chalara paradoxa* e *Trichoderma inhamatum* apresentaram as maiores atividades da xilanase.
- As atividades enzimáticas da CMCase e da xilanase dependeram do fungo utilizado, da metodologia de extração de enzimas e das condições de cultivo, tais como, temperatura, pH e composição do meio de cultura.
- Quanto aos ácidos graxos, *M. ramosissimus* apresentou maior potencial de produção para o ácido  $\gamma$ -linolênico (AGL).
- Melhores condições de cultivo para produção de ácido  $\gamma$ -linolênico a partir de *M. ramosissimus* foram: glicose como fonte de carbono, extrato de levedura como fonte de nitrogênio e pH inicial do meio 4,5.
- A produção de ácido  $\gamma$ -linolênico por fungos varia de acordo com o microrganismo utilizado, com a fase de crescimento em que o mesmo se encontra e com a composição do meio de cultura.

- Esta pesquisa permite inferir que muitas outras substâncias bioativas são passíveis de serem exploradas nos fungos isolados da Mata Atlântica, na Estação Ecológica de Juréia-Itatins, SP.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AGGELIS, G. Two alternative pathways for substrate assimilation by *Mucor circinelloides*. *Folia Microbiol.*, v.41, n.3, p.254-6, 1996.
2. AGGELIS, A.; PINA, M.; GRAILLE, J. Localisation de l'acide gamma linolénique dans les mycéliums et dans les spores chez deux mucorales. *Oléagineux*, v.45, n.5, p.229-32, 1990.
3. AGGELIS, G.; KOMAITIS, M. E.; DIMITROULIAS, G.; PINA, M.; GRAILLE, J. Possibilité de production d'acide gamma linolénique par culture de *Mucor circinelloides* CBS 172-27 sur quelques huiles végétales. *Oléagineux*, v.46, n.5, p.208-12, 1991.
4. AGGELIS, G.; PINA, M.; RATOMAHENINA, R.; ARNAUD, A.; GRAILLE, J.; GALZY, P.; MARTIN-PRIVAT, P.; PERRAUD, J. P. Production d'huiles riches en acide gamma linolénique par diverses souches de Phycomycètes. *Oléagineux*, v.42, n.10, p.379-86, 1987.
5. AGGELIS, G.; RATOMAHENINA, R.; ARNAUD, A.; GALZY, P.; MARTIN-PRIVAT, P.; PERRAUD, J. P.; PINA, M.; GRAILLE, J. Etude de l'influence des conditions de culture sur la teneur en acide gamma linolénique de souches de *Mucor*. *Oléagineux*, v.43, n.7, p.311-7, 1988.
6. ALEF, K.; NANNIPIERI, P. (Ed.) *Methods in applied soil microbiology and biochemistry*. London: Academic Press, 1995, cap.9, p.419-62.
7. ALEXOPOULOS, C. J.; MIMS, C. W.; BLACKWELL, M. *Introductory mycology*. 4.ed. New York: John Wiley & Sons, 1996. 869p.
8. ALLSOPP, D.; SEAL, K. J. *Introduction to biodeterioration*. London: Edwards,

- 1986, 136p.
9. ATTILI, D. S. *Isolamento, identificação e ecologia de fungos celulolíticos do solo da Estação Ecológica de Juréia-Itatins, SP.* 1994. 148p. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista. Rio Claro, 1994.
  10. BAILEY, M. J.; POUTANEN, K. Production of xylanolytic enzymes by strains of *Aspergillus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v.30, p.5-10, 1989.
  11. BANSOD, S. M.; DUTTA-CHOUDHARY, M.; SRINIVASAN, M. C.; RELE, M. V. Xylanase active at high pH from an alkalotolerant *Cephalosporium* species. *Biotechnol. Lett.*, v.15, n.9, p.965-70, 1993.
  12. BDT: Base de Dados Tropical. Disponível em: <http://www.bdt.org.br>. Acesso em: 23 out. 2000.
  13. BONONI, V. L.; CAPELARI, M.; MAZIERO, R.; TRUFEM, S. F. B. *Cultivo de cogumelos comestíveis*. São Paulo: Ícone, 1995. 206p.
  14. BONONI, V. L. R. (Org.) *Zigomicetos, basidiomicetos e deuteromicetos: noções básicas de taxonomia e aplicações biotecnológicas*. São Paulo: Secretaria de Estado do Meio Ambiente, 1998. 184p.
  15. BONONI, V. L. R.; TRUFEM, S. F. B. *Cogumelos comestíveis*. 2.ed. São Paulo: Ícone, 1985. 83p.
  16. BOTHA, A.; KOCK, J. L. F.; ROUX, C.; COETZEE, D. J.; BOTES, P. J. An isolation medium for gamma-linolenic acid producing mucoralean fungi. *System. Appl. Microbiol.*, v.18, n.3, p.448-54, 1995.
  17. CAPOBIANCO, J. P. R. (Coord.) *Dossiê Mata Atlântica 1992*. São Paulo: Fundação SOS Mata Atlântica, 1992. 106p.

18. CARMONA, E. R. *Produção, purificação e caracterização de xilanase de Aspergillus versicolor*. 1995. 111p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas, Área de Microbiologia Aplicada) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista. Rio Claro, 1995.
19. CARVALHO, P. O. *Produção de ácido gama linolênico por nova linhagem de Mucor sp e estudo das condições de fermentação*. 1994. 129p. Tese (Mestrado em Ciências de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 1994.
20. CASTILLO, M. R.; GUTIERREZ-CORREA, M.; LINDEN, J. C.; TENGERTDY, R. P. Mixed culture solid substrate fermentation for cellulolytic enzyme production. *Biotechnol. Lett.*, v.16, n.9, p.967-72, 1994.
21. CERTÍK, M.; BERHAN, S. S.; SAJBIDOR, J. Lipid production and fatty acid composition of selected strains belonging to Mucorales. *Acta Biotechnol.*, v.13, n.2, p.193-6, 1993a. In: *Biol. Abstr.*
22. CERTÍK, M.; SAJBIDOR, J.; STREDANSKA, S. Effect of carbon and nitrogen sources on growth, lipid production and fatty acid composition of *Mucor mucedo* F-1384. *Microbios*, v.74, n.298, p.7-15, 1993b. In: *Biol. Abstr.*
23. CHEN, H. C.; CHANG, C. C. Production of gamma-linolenic acid by the fungus *Cunninghamella echinulata* CCRC 31840. *Biotechnol. Progress*, v.12, n.3, p.338-41, 1996. In: *Biol. Abstr.*
24. CHEN, H. C.; CHANG, C. C. Screening of microbes for the production of polyunsaturated fatty acids. *J. Chin. Agric. Chem. Soc.*, v.32, n.1, p.33-46, 1994. In: *Biol. Abstr.*
25. CHEN, H. C.; LIU T. M. Inoculum effects on the production of  $\gamma$ -linolenic acid by

- the shake culture of *Cunninghamella echinulata* CCRC 31840. *Enzyme Microb. Technol.*, v.21, n.2, p.137-42, 1997.
26. CHRISTIE, W. W. *Lipid Analysis*. 2.ed. Oxford: Pergamon Press, 1982. 207p.
  27. CIOLA, R. *Fundamentos da cromatografia a gás*. 2.ed. São Paulo: Edgar Blücher, 1985, cap.8, p.184-224.
  28. COSTA, S. M. G. *Efeito da adição de vinhaça na dinâmica da microflora do solo do cerrado de Corumbataí, SP*. 1983. 129p. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista. Rio Claro, 1983.
  29. DEVEN, J. M.; MANOCHA, M. S. Effect of glutamic acid on the fatty acid and lipid composition of *Choanephora cucurbitarum*. *Can. J. Microbiol.*, v.21, n.11, p.1827-33, 1975.
  30. DUBACQ, J. P.; PHAM-QUOC, K. Biotechnology of *Spirulina* lipids: A source of gamma-linolenic acid. *Bull. Inst. Oceanograph.*, sp. iss.12, p59-64, 1993. In: *Biol. Abstr.*
  31. EMELYANOVA, E. V.  $\gamma$ -linolenic acid production by *Cunninghamella japonica* in solid state fermentation. *Proc. Biochem.*, v.31, n.5, p.431-4, 1996.
  32. EMELYANOVA, E. V. Lipid and  $\gamma$ -linolenic acid production by *Mucor inaequisporus*. *Proc. Biochem.*, v.32, n.3, p.173-7, 1997.
  33. FUKUDA, H.; MORIKAWA, H. Enhancement of  $\gamma$ -linolenic acid production by *Mucor anbiguus* with nonionic surfactants. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v.27, n.1, p.15-20, 1987.
  34. GARLIPP, A. B. *Isolamento e identificação de fungos filamentosos do solo do banhado grande, na Estação Ecológica de Juréia-Itatins, SP*. 1995. 92p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas, Área de Microbiologia Aplicada) –

- Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista. Rio Claro, 1995.
35. GASHE, B. A. Cellulase production and activity by *Trichoderma* sp A-001. *J. Appl. Bacteriol.*, v.73, p.79-82, 1992.
36. GIANNOTTI, A. M. D. *Isolamento, identificação e atividade enzimática de fungos xilófagos (Aphylllophorales) de podridão branca, da Estação Ecológica de Juréia-Itatins, SP.* 1997. 104p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas, Área de Microbiologia Aplicada) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista. Rio Claro, 1997.
37. GOMORI, G. Preparation of buffers for use in enzyme studies. *Methods Enzymol.*, v.1, p.138-46, 1955.
38. GONG, C. S.; TSAO, G. T. Cellulase and biosynthesis regulation. In: PERLMAN, D. (Ed.). *Annual reports on fermentation*. New York: Academic Press, 1979, v.3, cap.5, p.111-40.
39. GUIL-GUERRERO, J. L.; GÓMEZ-MERCADO, F.; GARCÍA-MAROTO, F.; CAMPRA-MADRID, P. Occurrence and characterization of oils rich in  $\gamma$ -linolenic acid. Part I: *Echium* seeds from Macaronesia. *Phytochemistry*, v.53, n.4, p.451-6, 2000.
40. GUNSTONE, F. D. Gamma linolenic acid-occurrence and physical and chemical properties. *Prog. Lipid Res.*, v.31, n.2, p.145-61, 1992.
41. HALTRICH, D.; PREISS, M.; STEINER, W. Optimization of a culture medium for increased xylanase production by a wild strain of *Schizophyllum commune*. *Enzyme Microb. Technol.*, v.15, n. 10, p.854-60, 1993.
42. HALTRICH, D.; NIDETZKY, B.; KULBE, K. D.; STEINER, W.; ZUPANCIC, S. Production of fungal xylanases. *Biores. Technol.*, v.58, n.2, p.137-61, 1996.



43. HANSSON, L.; DOSTÁLEK, M. Effect of culture conditions on mycelial growth and production of  $\gamma$ -linolenic acid by the fungus *Mortierella ramanniana*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v.28, n.3, p.240-6, 1988.
44. HASELWANDTER, K.; BERRECK, M.; BRUNNER, P. Fungi as bioindicators of radiocaesium contamination: pre- and post-Chernobyl activities. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, v.90, p.171-4, 1988.
45. HAWKSWORTH, D. L. The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance, and conservation. *Mycol. Res.*, v.95, p.641-55, 1991.
46. HAWKSWORTH, D. L.; KIRSOP, B. E. *Living resources for biotechnology: filamentous fungi*. Cambridge: Cambridge University Press, 1988. 209 p.
47. HESSELTINE, C. W.; ANDERSON, R. F. Microbiological production of carotenoids I. Zygospores and carotene produced by intraspecific and interspecific crosses of *Choanephora* in liquid media. *Mycologia*, v.69, p.449-52, 1957.
48. HORROBIN, D. F. Nutritional and medical importance of gamma-linolenic acid. *Prog. Lipid Res.*, v.31, n.2, p.163-94, 1992.
49. JOHNSON, K. G.; SILVA, M. C.; MACKENZIE, C. R.; SCHNEIDER, H.; FONTANA, J. D. Microbial degradation of hemicellulosic materials. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, v.20/21, p.245-58, 1989.
50. KATES, M. Techniques of lipidology: isolation, analysis and identification of lipids. Amsterdam: North-Holland, 1982, v.3, part.2, p.269-610.
51. KENDRICK, A.; RATLEDGE, C. Lipids of selected molds grown for production of n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids. *Lipids*, v.27, n.1, p.15-20, 1992.
52. KIM, S. W.; KANG, S. W.; LEE, J. S. Cellulase and xylanase production by *Aspergillus niger* KKS in various bioreactors. *Biores. Technol.*, v.59, n.1, p.63-7,

1997.

53. KOBAYASHI, G. S. Fungos. In: McCARTY, M. (Org.) *Microbiologia de Davis: Infecções bacterianas e micóticas*. 2.ed. São Paulo: Harper & Row do Brasil, 1979, v.3, cap.43, p.1145-95.
54. KUHAD, R. C.; SINGH, A. Enhanced production of cellulases by *Penicillium citrinum* in solid state fermentation of cellulosic residue. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, v.9, n.1, p.100-1, 1993.
55. KURASAWA, T.; YACHI, M.; SUTO, M.; KAMAGATA, Y.; TAKAO, S.; TOMITA, F. Induction of cellulase by gentiobiose and its sulfur-containing analog in *Penicillium purpurogenum*. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.58, n.1, p.106-10, 1992.
56. LARPENT, J. P.; LARPENT-GOURGAUD, M. *Microbiologia prática*. São Paulo: Edgard Blücher, 1975, 162p.
57. LINDBERG, A. M.; HANSSON, L. Production of  $\gamma$ -linolenic acid by the fungus *Mucor rouxii* on cheap nitrogen and carbon sources. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v.36, n.1, p.26-8, 1991.
58. MANDELS, M.; HONTZ, L.; NYSTROM, J. Enzymatic hydrolysis of waste cellulose. *Biotechnol. Bioeng.*, v.16, p. 1471-93, 1974.
59. MARTELLI, H. L.; PANEK, A. D. *Bioquímica experimental*. Rio de Janeiro: Ao Livro Técnico, 1968, 112p.
60. MIURA, Y.; SODE, K.; NAKAMURA, N.; MATSUNAGA, N.; MATSUNAGA, T. Production of gamma-linolenic acid from the marine green alga *Chlorella* sp. *Microbiol. Lett.*, v.107, n.2-3, p.163-7, 1993. In: *Biol. Abstr.*
61. MOORE-LANDECKER, E. *Fundamentals of the Fungi*. 4.ed. New Jersey: Prentice Hall, 1996, 574p.

62. NEVES, M. C. P.; LIMA, I. T.; DOBEREINER, J. Efeito da vinhaça sobre a microflora do solo. *Rev. Bras. Ciên. Solo*, v.7, p.131-6, 1983.
63. PELCZAR, M.; REID, R.; CHAN, E. C. S. *Microbiologia*. São Paulo: Mc Graw-Hill do Brasil, 1981, v.1, 556p.
64. RAJ, K. C.; CHANDRA, T. S. A cellulase-free xylanase from alkali-tolerant *Aspergillus fischeri* Fxn1. *Biotechnol. Lett.*, v.17, n.3, p.309-14, 1995.
65. RODRIGUES, E. C. Caracterização citogenética e bioquímica do fungo celulolítico *Humicola* sp. 1987. 152p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo. Piracicaba, 1987.
66. ROUSSOS, S.; RAIMBAULT, M.; SAUCEDO-CASTAÑEDA, G.; LONSANE, B. K. Efficient leaching of cellulases produced by *Trichoderma harzianum* in solid state fermentation. *Biotechnol. Techniques*, v.6, n.5, p.429-32, 1992.
67. ROUX, M. P.; KOCK, J. L. F.; BOTHA, A.; DU PREEZ, J. C.; WELLS, G. V.; BOTES, P. J. *Mucor* - a source of cocoa butter and gamma-linolenic acid. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, v.10, n.4, p.417-22, 1994.
68. ROUX, M. P.; KOCK, J. L. F.; DU PREEZ, J. C.; BOTHA, A. The influence of dissolved oxygen tension on the production of cocoa butter equivalents and gamma-linolenic acid by *Mucor circinelloides*. *System. Appl. Microbiol.*, v.18, n.3, p.329-34, 1995.
69. ROYER, J. C.; NAKAS, J. P. Interrelationship of xylanase induction and cellulase induction of *Trichoderma longibrachiatum*. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.56, n.8, p.2535-9, 1990.
70. SAJBIDOR, J.; CERTÍK, M.; DOBRONOVÁ, S. Influence of different carbon

- sources on growth, lipid content and fatty acid composition in four strains belonging to mucorales. *Biotechnol. Lett.*, v.10, n.5, p.347-50, 1988.
71. SHAW, R. The occurrence of  $\gamma$ -linolenic acid in fungi. *Biochim. Biophys. Acta*, v.98, p.230-7, 1965.
  72. SHIMIZU, S.; KAWASHIMA, H.; SHINMEN, Y.; AKIMOTO, K.; YAMADA, H. Production of eicosapentaenoic acid by *Mortierella* fungi. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, v.65, n.9, p.1455-9, 1988.
  73. SINGH, A.; KUHAD, R. C.; KUMAR, M. Xylanase production by a hyperxylanolytic mutant of *Fusarium oxysporum*. *Enzyme Microb. Technol.*, v.17, p.551-3, 1995.
  74. SINISTERRA, J. V. Application of ultrasound to biotechnology: an overview. *Ultrasonics*, v.30, n.3, p.180-5, 1992.
  75. SMITH, D.; ONIONS, A. H. S. *The preservation and maintenance of living fungi*. Norwick: Page Bros, 1983, 51p.
  76. SOKAL, R. R.; ROHLF, F. J. Assumptions of analysis of variance. In: \_\_\_\_\_. *Biometry*. New York: W. H. Freeman, 1995, p.392-450.
  77. STEWART, J. C.; LESTER, A.; MILBURN, B.; PARRY, J. B. Xylanase and cellulase production by *Aspergillus fumigatus* Fresenius. *Biotechnol. Lett.*, v.5, n.8, p.543-8, 1983.
  78. STREDANSKY, M.; CONTI, E.; STREDANSKA, S.; ZANETTI, F.  $\gamma$ -linolenic acid production with *Thamnidium elegans* by solid-state fermentation on apple pomace. *Biores. Technol.*, v.73, p.41-5, 2000.
  79. TAUKE, S. M.; RUEGGER, M. J. S. Alguns aspectos da microbiota do solo sob vegetação de cerrado, tratado com vinhaça, no município de Corumbataí, SP. *Rev.*

- Microbiol.*, v.18, p.67-76, 1987.
80. TAUKE, S. M.; SCHOENLEIN-CRUSIUS, I. H.; PETENATE, A. Modelo ecológico dos nutrientes, microrganismos e atividade enzimática de solo sob vegetação de cerrado tratado com vinhaça, Corumbataí, SP. *Rev. Microbiol.*, v.21, p.99-108, 1990.
  81. TEUNISSEN, M. J.; CAMP, H. J. M. O. Anaerobic fungi and their cellulolytic and xylanolytic enzymes. *Antonie Leeuwenhoek*, v.63, p.63-76, 1993.
  82. TORLANOVA, B. O.; FUNTIKOVA, N. S.; KONOVA, I. V.; BABANOVA, N. K. Synthesis of the lipid complex containing gamma-linolenic acid and carotenoids by a mucorous fungus under various cultivation conditions. *Mikrobiologiya*, v.64, n.4, p.492-6, 1995. In: *Biol. Abstr.*
  83. TORLANOVA, B. O.; KONOVA, I. V.; FUNTIKOVA, N. S.; BABANOVA, N. K.; KATOMINA, A. A.; MYSYAKINA, I. S. Influence of the conditions of culturing of a *Mucor* fungus, treatment of biomass, and extraction ability on the production of lipids containing  $\gamma$ -linolenic acid. *Appl. Biochem. Microbiol.*, v.28, n.4, p.461-8, 1992.
  84. WEETE, J. D.; SHEWMAKER, F.; GANDHI, S. R.  $\gamma$ -Linolenic acid in zygomycetous fungi: *Syzygites megalocarpus*. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, v.75, n.10, p.1367-72, 1998.
  85. WONG, K. K. Y.; SADDLER, J. N. *Trichoderma* xylanases, their properties and application. *Crit. Rev. Biotechnol.*, v.12, p.413-35, 1992.
  86. YOSHIOKA, H.; CHAVANICH, S.; NILUBOL, N.; HAYASHIDA, S. Production and characterization of thermostable xylanase from *Talaromyces byssochlamydoides* YH-50. *Agric. Biol. Chem.*, v.45, p.579-86, 1981.

## APÊNDICE 1 – MEIOS DE CULTURA

### **Ágar extrato de malte – (SMITH & ONIONS, 1983)**

Glicose: 20,0 g; peptona: 1,0 g; extrato de malte: 20,0 g; ágar: 20,0 g; água destilada: q.s.p. 1000,0 ml.

### **Meio sintético para *Mucor* – (HESSELTINE & ANDERSON, 1957)**

Glicose: 40,0 g; asparagina: 2,0 g;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ : 0,5 g;  $\text{MgSO}_4$ : 0,25 g; tiamina: 0,05 mg; ágar: 20,0 g; água destilada: q.s.p. 1000,0 ml.

### **Meio com acetato de sódio – (BOTHA et al., 1995)**

Acetato de sódio: 20,0 g;  $\text{NH}_4\text{Cl}$ : 1,0 g;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ : 0,5 g;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ : 0,25 g; extrato de leveduras: 0,5 g;  $\text{CaCl}_2$ : 0,05 g;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ : 10 mg;  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ : 10 mg;  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ : 0,8 mg;  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ : 0,05 mg; ágar: 16,0 g; água destilada: 1000,0 ml; pH = 5,5.

### **Ágar com rosa-bengala – (LARPENT & LARPENT-GOURGAUD, 1975)**

Peptona bacteriológica: 5,0 g; glicose: 10,0 g;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ : 1,0 g;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ : 0,5 g; solução aquosa de rosa-bengala a 1:3000: 100,0 ml; ágar: 20,0 g; água destilada: 900,0 ml.

### **Meio de farelo de trigo - MFT (YOSHIOKA et al., 1981)**

Farelo de trigo: 5,0 g; água de torneira: 5,0 ml.

**Meio de farelo de trigo com NaOH**

Farelo de trigo: 5,0 g; água de torneira: 4,5 ml; solução de NaOH 1 N: 0,5 ml.

**Meios com substratos celulósicos**

1. Farelo de trigo: 5,0 g; água de torneira: 5,0 ml.
2. Farelo de arroz: 5,0 g; água de torneira: 5,0 ml.
3. Palha de arroz: 5,0 g; água de torneira: 5,0 ml.
4. Sabugo de milho triturado: 5,0 g; água de torneira: 5,0 ml.
5. Farelo de trigo: 2,5 g; farelo de arroz: 2,5 g; água de torneira: 5,0 ml.
6. Farelo de trigo: 2,5 g; palha de arroz: 2,5 g; água de torneira: 5,0 ml.
7. Farelo de trigo: 2,5 g; sabugo de milho: 2,5 g; água de torneira: 5,0 ml.
8. Farelo de arroz: 2,5 g; palha de arroz: 2,5 g; água de torneira: 5,0 ml.
9. Farelo de arroz: 2,5 g; sabugo de milho: 2,5 g; água de torneira: 5,0 ml.
10. Palha de arroz: 2,5 g; sabugo de milho: 2,5 g; água de torneira: 5,0 ml.

**Meio GY (SHIMIZU et al., 1988)**

Glicose: 20,0 g; extrato de leveduras: 10,0 g; água destilada: 1000,0 ml.

**Meios de cultura com diferentes fontes de carbono**

1. Acetato de sódio: 27,3 g; extrato de leveduras: 10,0 g; água destilada: 1000,0 ml.
2. Frutose: 20,0 g; extrato de leveduras: 10,0 g; água destilada: 1000,0 ml.
3. Galactose: 20,0 g; extrato de leveduras: 10,0 g; água destilada: 1000,0 ml.
4. Glicerol: 20,4 g; extrato de leveduras: 10,0 g; água destilada: 1000,0 ml.

5. Glicose: 20,0 g; extrato de leveduras: 10,0 g; água destilada: 1000,0 ml.
6. Lactose: 20,0 g; extrato de leveduras: 10,0 g; água destilada: 1000,0 ml.
7. Maltose: 19,0 g; extrato de leveduras: 10,0 g; água destilada: 1000,0 ml.
8. Manitol: 20,0 g; extrato de leveduras: 10,0 g; água destilada: 1000,0 ml.
9. Melezitose: 18,7 g; extrato de leveduras: 10,0 g; água destilada: 1000,0 ml.
10. Sacarose: 19,0 g; extrato de leveduras: 10,0 g; água destilada: 1000,0 ml.
11. Sorbitol: 20,0 g; extrato de leveduras: 10,0 g; água destilada: 1000,0 ml.
12. Trealose: 19,0 g; extrato de leveduras: 10,0 g; água destilada: 1000,0 ml.
13. Xilose: 20,0 g; extrato de leveduras: 10,0 g; água destilada: 1000,0 ml.

#### **Meios de cultura com diferentes fontes de nitrogênio**

1. Extrato de leveduras: 10,0 g; glicose: 20,0 g; água destilada: 1000,0 ml.
2. Extrato de malte: 10,0 g; glicose: 20,0 g; água destilada: 1000,0 ml.
3. Peptona: 10,0 g; glicose: 20,0 g; água destilada: 1000,0 ml.
4. Triptona: 10,0 g; glicose: 20,0 g; água destilada: 1000,0 ml.
5. Uréia: 10,0 g; glicose: 20,0 g; água destilada: 1000,0 ml.
6. Cloreto de amônio: 10,0 g; glicose: 20,0 g; água destilada: 1000,0 ml.
7. Nitrato de amônio: 10,0 g; glicose: 20,0 g; água destilada: 1000,0 ml.
8. Nitrato de potássio: 10,0 g; glicose: 20,0 g; água destilada: 1000,0 ml.
9. Nitrato de sódio: 10,0 g; glicose: 20,0 g; água destilada: 1000,0 ml.
10. Sulfato de amônio: 10,0 g; glicose: 20,0 g; água destilada: 1000,0 ml.

OBS: Todos os meios foram autoclavados a 121°C por 20 min.



## APÊNDICE 2 – SOLUÇÕES E REAGENTES

### **Reagente de Sumner (MARTELLI & PANEK, 1968)**

Ácido 3,5 dinitro salicílico: 5,0 g; NaOH: 8,0 g; tartarato duplo de sódio e potássio: 150,0 g; água destilada: q.s.p. 500,0 ml.

O ácido 3,5 dinitro salicílico foi dissolvido em 100,0 ml de NaOH 2 N. Separadamente o tartarato duplo de sódio e potássio foi dissolvido em 250,0 ml de H<sub>2</sub>O. As duas soluções foram misturadas e o volume foi completado para 500,0 ml com água destilada.

### **Reagente de cor**

Tampão tris 100 mmol.l<sup>-1</sup>, pH 7,4: 250 ml; contendo 4-aminoantipirina: 133 µmol.l<sup>-1</sup>; fenol: 10 mmol.l<sup>-1</sup>; azida sódica: 7,7 mmol.l<sup>-1</sup>; glicose oxidase ≥ 20000 U.l<sup>-1</sup> e peroxidase ≥ 668 U.l<sup>-1</sup>.

### **Solução estoque de ácido acético 0,2 M**

Ácido acético glacial: 11,55 ml; água destilada: q.s.p. 1000,0 ml.

### **Solução estoque de acetato de sódio 0,2 M**

Acetato de sódio: 16,4 g; água destilada: q.s.p. 1000,0 ml.

### **Solução tampão acetato de sódio 0,05 M, pH 5,0 (GOMORI, 1955)**

Solução estoque de ácido acético: 14,8 ml; solução estoque de acetato de sódio: 35,2 ml; água destilada: 400,0 ml.

**Solução estoque de glicose ( $1 \text{ mg.ml}^{-1}$ )**

Glicose: 1,0 g; água destilada: q.s.p. 1000,0 ml.

Aproximadamente, dois gramas de glicose permaneceram por duas horas em estufa a  $100^{\circ}\text{C}$ . Após esfriar em dessecador por quinze minutos, um grama foi dissolvido em água destilada em balão volumétrico de 1000,0 ml.

**Solução estoque de xilose ( $1 \text{ mg.ml}^{-1}$ )**

Xilose: 1,0 g; água destilada: q.s.p. 1000,0 ml.

O procedimento foi idêntico ao mencionado no item anterior.

**Solução de ácido clorídrico (HCl) 1 M**

HCl: 41,45 ml; água destilada: 500,0 ml.

**Solução de hidróxido de sódio (NaOH) 1 N**

NaOH: 4,0 g; água destilada: 100,0 ml.

**Solução T80 a 0,1% (p/v)**

Tween 80: 0,2 g; água destilada: 200,0 ml.

**Solução salina a 0,85%**

NaCl: 8,5 g; água destilada: 1000,0 ml.

**Solução de hidróxido de sódio metanólico 2 M**

NaOH: 80,0 g; metanol: 1000,0 ml.