

ATIVIDADE LIGNINOLÍTICA DE *Fusarium solani* (Mart.) App.
& WR. E *Aspergillus fumigatus* VAR. FRESENIUS

Vânia Aparecida Vicente¹
Aline Aparecida Pizzirani-Kleiner¹
Itamar Soares de Melo²

INTRODUÇÃO

Os materiais lignocelulósicos, constituídos basicamente de celulose, hemicelulose e lignina, representam a maior porção do carbono fixado pela fotossíntese, onde so- mente uma pequena parte é reciclada rapidamente, sendo o restante encontrado na forma de resíduos que podem perfei- tamente ser aproveitados, através de processos que trans- formem esta matéria orgânica em monossacarídeos facilmen- te fermentáveis ou ainda a enriqueçam a nível protéico, gerando energia e alimento. Os métodos utilizados para converter tais substratos compreendem sistemas físicos, químicos e biológicos.

A capacidade que têm certos microorganismos de produ- zir enzimas lignocelulolíticas é uma propriedade que vem sendo usada para a obtenção de celulases e ligninases com fins industriais. Porém, para que a bioconservação se tor- ne um processo economicamente viável, faz-se necessário obter linhagens capazes de hidrolisar integralmente tais substratos em curto período de tempo e que possuam siste- ma enzimático completo e balanceado.

Devido à grande complexidade da estrutura da ligni- na, em ambientes naturais, torna-se necessário o ataque de diversos microorganismos para que sua degradação seja significativa.

¹ Departamento de Genética, ESALQ/USP, Caixa Postal 83, 13400-970 Piracicaba-SP.

² Centro Nacional de Pesquisa de Defesa da Agricultura- EMBRAPA, Caixa Postal 69, 13820 Jaguariúna-SP.

O presente trabalho tem por objetivo básico avaliar a atividade ligninolítica de um isolado celulolítico de *Fusarium solani* e de três isolados celulolíticos de *Aspergillus fumigatus*.

MATERIAL E MÉTODOS

. Isolamento de Fungos

A partir de cavacos de madeira, estocados em pátios de indústria de celulose, foram feitos isolamentos de fungos em meio de cultura seletivo para microorganismos celulolíticos (AMARAL et alii, 1967). Colônias individuais obtidas foram purificadas através de várias réplicas em meio mineral para microorganismos celulolíticos. Os melhores isolados com potencial de atividade celulolítica quando comparados com a linhagem industrial de *Trichoderma reesei* QM 9414 foram avaliados quanto à capacidade ligninolítica.

. Obtenção do substrato lignina a partir de bagaço de cana-de-açúcar

A obtenção da fração lignina, a partir de bagaço de cana-de-açúcar, foi feita através do método estabelecido por KIRK et alii (1978) modificado por CARRAU et alii (1987). O bagaço foi moído e pulverizado a 24 mesh. Feita uma suspensão deste substrato em hidróxido de sódio a 4%, foi este autoclavado por uma hora. Em seguida, a suspensão autoclavada foi filtrada, e o sobrenadante diluído em etanol na proporção de 1:1, sendo a seguir incubado por uma noite à temperatura ambiente. Posteriormente, centrifugou-se a 38.720g por 10 minutos e o sobrenadante foi precipitado por redução do pH para 3,0 com HCl 1N, ocorrendo a precipitação de lignina. Foi realizada uma lavagem com água destilada, pH 3,0 e feita a secagem em liopilizador. Depois do substrato purificado, pesaram-se 4 mg, 8 mg e 16 mg, ressuspendeu-se em Na OH 0,55% e fez-se a leitura em espectrofotômetro. Os resultados obtidos foram comparáveis aos dados da literatura, o que comprova a

obtenção da fração solúvel de lignina, utilizada como substrato no meio para atividade ligninolítica (M.L.A.) (KIRK et alii, 1978).

. Produção de Inóculo e Cultivo

Uma suspensão de esporos, diluída em água salina 0,85% para concentração de 8×10^6 esporos/ml foi utilizada como inóculo em 5 ml de M.L.A. limitado de nitrogênio, na proporção de 1:1, distribuídos em erlenmeyers de 500 ml, para maior aeração. Incubou-se à temperatura ideal de cada fungo e, a cada intervalo de 24 horas, fez-se aeração com ar atmosférico em fluxo laminar.

. Quantificação da degradação da lignina (JANSHEKAR et alii, 1981, modificado por CARRAU et alii, 1987).

A quantificação da degradação foi feita através de análise residual do substrato na absorbância ultravioleta a 281 μm em espectrofotômetro. A cada frasco cultivado foram adicionados 30 ml de NaOH 0,55%. Em seguida, o conteúdo foi macerado por dez segundos e então centrifugado a 38.720g por 15 minutos em centrífuga refrigerada. O sobrenadante foi precipitado em pH 3,0 com HCl, durante uma noite. Posteriormente, a operação de centrifugação foi repetida e se ressolubilizou o precipitado obtido em 5 ml de solução de hidróxido de sódio 4%. Foram determinadas as quantidades de lignina presente no início do cultivo, em intervalos de dois dias e durante 10 dias.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados, em absorbância, da degradação de lignina, que indica em porcentagem a degradação total deste polímero para cada microorganismo avaliado, encontram-se na TABELA I. A linhagem de *Phanerochaeta chrysosporium* conhecida como efetiva na degradação de lignina foi utilizada como padrão neste experimento.

TABELA I. Atividade ligninolítica dos isolados, comparada com a linhagem *Phanerochaeta chrysosporium* (os dados apresentados constituem a média de duas repetições).

Linhagens	Absorbância em ultravioleta - 281 μ m					% final de degradação	
<i>P. chrysosporium</i>	0,191	0,122	0,085	0,081	0,071	0,056	70,68
<i>F. solani</i> FC53	0,176	0,159	0,122	0,103	0,092	0,083	52,84
<i>A. fumigatus</i> FC77	0,190	0,171	0,168	0,140	0,122	0,110	42,10
<i>A. fumigatus</i> FC88	0,200	0,188	0,188	0,171	0,144	0,133	33,50
<i>A. fumigatus</i> FC102	0,185	0,181	0,176	0,169	0,145	0,137	25,95

Não foi encontrada nenhuma linhagem com atividade superior à de *P. chrysosporium*. No entanto, o *Fusarium solani* foi considerada a melhor entre os isolados. Degrada 53% do substrato e apresenta capacidade de degradação semelhante à da *P. chrysosporium*. Esta linhagem de *F. solani* mostrou-se altamente celulolítica (VICENTE, 1989).

Durante os ensaios ligninolíticos, foi observada uma fase de latência em relação à atividade, durante os dois primeiros dias de incubação. Tal fato, também relatado por LEISOLA et alii (1983) e CARRAU et alii (1987) sugere que este período corresponda à fase de germinação dos conídios e de indução do sistema ligninolítico. O máximo de atividade ocorreu após o período de 10 dias de incubação. Após este período, a quantidade de lignina degradada se manteve constante. Sendo assim, pode-se concluir que o período de incubação em torno de 10 dias é o ideal para a determinação da atividade.

Fusarium solani e *Aspergillus fumigatus*, avaliados neste trabalho, apresentaram a habilidade de degradar a lignina. Na literatura, os dois gêneros têm sido relatados como decompositores efetivos deste polímero. IWAHARA (1980) identificou espécies de *Fusarium* encontradas no solo que degradam lignina.

RESUMO

Fusarium solani, linhagem FC₅₃ considerada a melhor entre as demais linhagens, degradou 53% do substrato e apresentou capacidade de degradação semelhante à do fungo lignolítico *Phanerochaeta chrysosporium*. No entanto, *A. fumigatus* também se revelou promissora na decomposição de lignina.

Palavras-chave: Atividade ligninolítica, *Fusarium solani*, *Aspergillus fumigatus*

SUMMARY

LIGNINOLYTIC ACTIVITY OF *Fusarium solani* (Mart.) App. & WR. *Aspergillus fumigatus* Var. FRESSENIUS

Among the selected strains, *Fusarium soani* FC₅₃ was

considered the best lignolytic enzyme producer and possibly very useful for further genetics and breeding studies. This strain degraded 53% of the substrate, presenting activity similar to *Phanerochaeta chrysosporium*. However, *A. fumigatus* also presented lignolytic activity.

Key words: Ligninolytic activity, *Fusarium solani*, *Aspergillus fumigatus*.

LITERATURA CITADA

- AMARAL, D.; S.O.P. COSTA; A. SCHWAB; E.N.S. OLIVEIRA; C. L. BLANCO; A. CURY & L.A. TRAVASSOS, 1967. Experimentos de Microbiologia Geral. 3.ed. Curitiba, MEC/Universidade Federal do Paraná. 170p.
- CARRAU, F.M.; E. NEIROTTI; C. GAGGERO & J. L. AZEVEDO, 1987. Separation and biodegradation of rice hulls and sugarcane alkali lignins. *Arquivos de Biologia e Tecnologia*, Curitiba, 30: 577-84.
- IWAHARA, S., 1980. Microbial Degradation of DHP. In: KIRK, T.K.; T. HIGUCHI & H.M. CHANG, 1980. *Lignin Biodegradation: Microbiology, Chemistry and Applications*. Boca Raton, CRC Press. Vol. 1, 151p.
- JANSHEKAR, H.; C. BROWN & A. FIECHTER, 1981. Determination of biodegraded lignin by ultraviolet spectrophotometry. *Analytica Chimica Acta*, Amsterdam, 130: 81-91.
- KIRK, T.K.; E. SHULTZ; W.J. CONNORS; L.F. LORENZ & J. G. BEIKUS, 1978. Influence of culture parameters on lignin metabolism by *P. chrysosporium*. *Archives of Microbiology*, Berlin, 117: 277-285.
- LEISOLA, M.; D. ULMER & A. FIECHTER, 1983. Problem of osirgen transfer luring degradation of lignin by *Phanerochaeta chrysosporium*. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, Berlin, 17: 113-116.
- VICENTE, V.A., 1989. Isolamento e Seleção de Fungos Lignocelulolíticos. Piracicaba. 173p. (Mestrado - ESALQ/USP).