

Este exemplar corresponde a versão
final da tese defendida pela candidata
Angela Elena Machuca Herrera e aprovada
pelo Conselho Julgador.



Nelson Durán

ANGELA ELENA MACHUCA HERRERA

Thermoascus aurantiacus (CEPA BRASILEIRA) :
ASPECTOS DO CRESCIMENTO, PRODUÇÃO ENZIMÁTICA E UTILIZAÇÃO NO
TRATAMENTO DE MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS

TESE APRESENTADA À UNIVERSIDADE ESTADUAL DE
CAMPINAS PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE
EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS NA ÁREA DE
BIOQUÍMICA

Orientador: Prof. Dr. NELSON EDUARDO DURÁN CABALLERO

CAMPINAS

1991

M185t

14701/BC

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

A Juanito y Maria

AGRADECIMIENTOS

Esta página, sin lugar a dudas, será la única de la tesis libre de correcciones de portugués. Espero que de castellano también.

Mis agradecimientos:

A Nelson, por la orientación de esta tesis y por toda la confianza depositada.

A Marcela, Lucia e Hiroshi, miembros de mi pre-banca, por las correcciones y sugerencias hechas a este trabajo.

A Celso G. Auer, quien gentilmente cedió la cepa brasileira del hongo utilizado en este trabajo.

A Pedro, por los cálculos estadísticos y por muchas otras cosas.

A todos los compañeros del grupo, que de alguna u otra forma, colaboraron con mi trabajo. Especialmente a Regina, quien "voluntariamente" corrigió casi 100 páginas del más puro "portuñol".

A todos los compañeros y amigos del segundo piso del Bloco D. Especialmente a Chico por la ayuda en el Análisis de Aminoácidos.

Y finalmente a quien garantizó mi "sobrevivencia" en Brasil: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

ÍNDICE

RESUMO

ABSTRACT

ABREVIATURAS

1.- INTRODUÇÃO	1
1.1.- BIOMASSA	1
1.2.- RESÍDUOS LIGNOCELULÓSICOS: ESTRUTURA, BIODEGRADAÇÃO E ENZIMOLOGIA DA BIODEGRADAÇÃO	3
1.2.1.- Celulose	3
1.2.2.- Hemicelulose	8
1.2.3.- Lignina	11
1.3.- MADEIRA COMO MATÉRIA PRIMA	16
1.3.1.- Biodegradação por microrganismos	17
1.3.2.- Alguns aspectos da madeira de Eucalipto	19
1.4.- PRODUÇÃO DE PROTEÍNA UNICELULAR (SCP)	19
1.5.- MICRORGANISMOS TERMÓFILOS: CARACTERÍSTICAS GERAIS	21
1.5.1.- <i>Thermoascus aurantiacus</i> : Antecedentes Bibliográficos ..	22
1.6.- FATORES QUE INFLUENCIAM O CRESCIMENTO DE UM MICRORGANISMO	23
1.6.1.- Métodos de quantificação do crescimento microbiano	24
1.6.2.- Métodos estatísticos de otimização do crescimento microbiano	25
2.- OBJETIVOS	28

3. - MATERIAL E MÉTODOS	29
3.1. - Equipamentos	29
3.2. - Reagentes e procedência	29
3.3. - Microrganismo e meio de cultivo	30
3.4. - Escolha de uma fonte de carbono e nitrogênio para <i>Thermoascus aurantiacus</i>	31
3.5. - Métodos utilizados na otimização do crescimento de <i>Thermoascus aurantiacus</i>	32
3.5.1. - Método do Tubo Horizontal	32
3.5.2. - Métodos estatísticos de otimização	33
3.6. - Determinação de proteína e análise de aminoácidos	34
3.6.1. - Determinação de proteína no micélio	34
3.6.2. - Método do Biureto	34
3.6.3. - Análise de aminoácidos	34
3.6.4. - Método de Bradford para determinação de proteína solúvel	35
3.7. - Análise do caldo de cultivo após crescimento fúngico	35
3.8. - Determinações enzimáticas	36
3.8.1. - Método com "celulose azure"	36
3.8.2. - Atividade em papel filtro (FPA)	37
3.8.3. - Atividade Endo-1,4- β -D-glicanase	37
3.8.4. - Atividades β -glicosidase e β -xilosidase	37
3.8.5. - Atividade Xilanase	38
3.8.6. - Descoloração de Remazol Brilliant Blue (RBB-R)	38
3.8.7. - Atividade ligninase por oxidação de álcool veratrílico	39
3.8.8. - Atividade fenol oxidase	39
3.9. - Determinação de açúcares redutores	40
3.9.1. - Método do DNS	40

3.10.- Análise de madeira de <i>Eucalyptus grandis</i> tratada com <i>Thermoascus aurantiacus</i>	40
3.10.1.- Perda de peso	41
3.10.2.- Determinação de extrativos	41
3.10.3.- Determinação de celulose	42
3.10.4.- Determinação de hemicelulose	42
3.10.5.- Determinação de lignina Klason	43
3.10.6.- Determinação do índice de degradação	43
4.- RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
4.1.- Crescimento de <i>Thermoascus aurantiacus</i>	44
4.1.1.- Otimização das condições de crescimento de <i>Thermoascus</i> <i>aurantiacus</i>	44
4.2.- Produtos do crescimento de <i>Thermoascus aurantiacus</i> em meio líquido	59
4.2.1.- Produção de proteína unicelular (SCP)	59
4.2.2.- Metabólitos presentes na cultura	61
4.2.3.- Produção de enzimas lignocelulósicas	63
4.2.3.1.- Produção de enzimas celulolíticas	63
4.2.3.2.- Produção de enzimas hemicelulolíticas	71
4.2.3.3.- Produção de enzimas ligninolíticas	74
4.3.- Biodegradação de madeira de <i>Eucalyptus grandis</i> por <i>Thermoascus aurantiacus</i>	83
5.- CONCLUSÃO GERAL	87
6.- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	89

RESUMO

A cepa brasileira de *Thermoascus aurantiacus*, um fungo termófilo, foi estudada quanto as condições de crescimento, produção de enzimas e ação sobre materiais lignocelulósicos.

O fungo mostrou capacidade para crescer em meios de cultivo que continham materiais lignocelulósicos como bagaço de cana, casca de arroz e serragem de *Eucalyptus grandis*, como únicas fontes de carbono. O crescimento do fungo nestes substratos foi melhor do que em substratos celulósicos.

As condições ótimas de crescimento do fungo foram determinadas através de métodos estatísticos de otimização. As condições ótimas obtidas em meio Czapek modificado foram: 0,8% (8,0 g/l) de glicose como fonte de carbono, 37,8 mEq/l (3,2 g/l) de NaNO_3 como fonte de nitrogênio, em pH 6,0 a 48°C. Nestas condições o fungo alcançou uma velocidade máxima de crescimento de $4,74 \pm 0,02$ (mm/h).

Um teor de 27,4% (p/p) de proteína foi obtida do micélio de *Thermoascus aurantiacus*, aos 10 dias de crescimento em meio contendo 1,5% de glicose, sob condições estacionárias. A proteína micelial foi hidrolisada e sua composição em aminoácidos foi determinada. A qualidade da proteína de *T.aurantiacus*, é semelhante à proteína da soja e à sugerida pela FAO, apresentando uma alta concentração de aminoácidos essenciais.

Na cultura contendo 1,5% de glicose, sob condições estacionárias e de agitação, foi detectada a presença de etanol e metanol, provavelmente, produtos da fermentação de glicose pelo fungo.

O fungo produziu enzimas celulolíticas, hemicelulolíticas e ligninolíticas, em maior ou menor quantidade, quando cultivado em meios que continham diferentes substratos de crescimento. As máximas atividades de endo-glicanase (1,49 UI/ml) e xilanase (1,20 UI/ml), foram obtidas em meio contendo 1,5% de glicose. Os máximos valores foram obtidos quando a glicose alcançou uma concentração de 0,3%, no sexto dia de crescimento, sob condições estacionárias. A atividade celulolítica de *Thermoascus aurantiacus* foi comparável

à do fungo *Trichoderma reesei* (cepa selvagem).

O fungo apresentou, atividade enzimática capaz de descolorir Remazol brilliant blue R, sendo que a máxima descoloração ocorreu quando foram adicionados ao meio 1,5% de glicose e 0,5% de serragem de *Eucalyptus grandis*, simultaneamente. Uma ligeira descoloração ocorreu quando o meio continha somente glicose.

Uma alta atividade fenol oxidase foi obtida quando o fungo foi cultivado em meio que continha 1,5% de serragem de *Eucalyptus grandis* e 0,5% de glicose. Nenhuma atividade foi obtida utilizando-se apenas glicose como fonte de carbono.

Foi estudada a biodegradação dos componentes da madeira de *Eucalyptus grandis* (serragem e cavacos). Após 21 dias de tratamento da madeira com *Thermoascus aurantiacus*, sob condições estacionárias e 50°C, obteve-se uma perda de peso de 6,7% para serragem e de 6,2% para cavacos, em cultura contendo 0,5% de glicose. Em ambos os casos (serragem e cavacos), o fungo atacou, principalmente, os componentes extraíveis em etanol/benzeno, provocando uma perda em peso de 64,4% na serragem e 59,0% nos cavacos.

ABSTRACT

Growth conditions, enzymes production and lignocellulosic materials degradation by brazilian strain of *Thermoascus aurantiacus*, were studied.

The fungus showed ability to grow on lignocellulosic materials such as sugar cane bagasse, rice hull and *Eucaliptus grandis* sawdust, as single carbon sources. Growth of the fungus in these substrates was better than cellulosic one.

Statistical methods were applied for optimization of the growth conditions. Optimal growth conditions in Czapek-glucose (0.8%) modified medium in pH 6.0 at 48°C and a NaNO₃ concentration of 37.8 mEq/l (3.2 g/l) were observed. The growth rate value obtained in these conditions was 4.74 ± 0.02 mm/h.

Cultures of *Thermoascus aurantiacus* using glucose (1.5%) showed a 27.4% (w/w) of mycelial protein after 10 days incubation. Mycelial protein showed essential amino acids content similar to soybean protein and FAO standard requirements.

Ethanol and methanol were detected in the extracellular medium of *Thermoascus aurantiacus* agitated as well as in stationary cultures using glucose 1.5%.

Cellulolytic, hemicellulolytic and ligninolytic activities were produced when the fungus grown on a variety of substrates. High endo-glucanase (1.49 UI/ml) and xylanase (1.20 UI/ml) activities were detected on glucose 1.5%. A higher enzyme activity was reached when the glucose concentration was reduced to 0.3% (sixth day). *Thermoascus aurantiacus* exhibits cellulolytic similar to *Trichoderma reesei* (wild strain).

The higher decolorization of Remazol brilliant blue (RBB-R) by cultures of *Thermoascus aurantiacus* in the presence of glucose (0.5%) and *Eucaliptus grandis* sawdust (1.5%) simultaneously was observed. A light decolorization was observed when glucose was used as single carbon source.

High phenol-oxidase activity was reached when the fungal growth was on *Eucaliptus grandis* sawdust (1.5%) plus glucose (0.5%). No phenol-oxidase activity was observed when glucose was

used as single carbon source.

Sawdust and chips of *Eucalyptus grandis* biodegradation was studied. Growth of *Thermoascus aurantiacus* on *Eucalyptus grandis* resulted in a weight loss of 6.7% and 6.2%, for sawdust and chips respectively after 21 days of incubation at 50°C on glucose 0.5%. Fungal attack was more efficient on the extractives than other wood components. An extractive loss of 64.4% in sawdust and 59.0 % in chips was obtained.

ABREVIATURAS

ABS: Absorbância

Ac: O-acetila

Araf: Arabinofuranosideo

ALC.VER.: Alcool veratrílico

CBQ: Celobiose quinona oxidoreductase

CMC: Carboximetilcelulose

CMCase: Carboximetilcelulase (Endo-glicanase)

DNS: Ácido 3,5-dinitrosalicílico

FAO: Food and Agriculture Organization

FPA: Filter paper activity (Atividade Celulase total)

MeGlcA: Ácido 4-O-metilglicorônico

pNPG: *p*-nitrofenil- β -D-glicopiranosideo

pNPX: *p*-nitrofenil- β -D-xilopiranosideo

RBB-R: Remazol Brilliant Blue R

SCP: Single cell protein

XBQ: Xilose quinona oxidoreductase

Xil: Xilose

1.- INTRODUÇÃO

1.1.- BIOMASSA

Nos últimos 20 anos um grande interesse tem se voltado para a possibilidade da utilização de material biológico como fonte de energia. As investigações sobre o aproveitamento da biomassa através da biotecnologia, vem se expandindo nos últimos anos como uma solução alternativa para o problema da diminuição progressiva das reservas de combustíveis derivados do petróleo e de matérias primas de interesse industrial. Estima-se que a produção anual de biomassa na terra alcance a 100 bilhões de toneladas (Dekker, 1989a).

O termo biomassa refere-se a toda a matéria orgânica produzida por organismos vivos, sejam estes animais ou vegetais, constituída por 95% de material lignocelulósico como madeira, resíduos das indústrias de polpa e papel, resíduos agrícolas, etc.. Estima-se que no futuro os resíduos florestais crescerão dos atuais 4 milhões até 10 a 15 milhões de toneladas/ano, dependendo do destino e utilização que se der à madeira (Wagemann, 1984).

O material lignocelulósico, componente estrutural das plantas, é restabelecido através da fotossíntese e seus constituintes principais são: celulose (40-50%), hemicelulose, (15-30%) e lignina (10-30%) (Dekker, 1989b).

Os processos de conversão de resíduos lignocelulósicos a formas úteis de energia incluem hidrólise ácida, hidrotermólise e tratamentos biológicos. Os tratamentos biológicos de conversão são mais econômicos e específicos que os processos químicos. O maior problema que se apresenta na bioconversão dos resíduos lignocelulósicos a partir da sua forma natural, é a inacessibilidade aos polímeros de carboidratos pelo tratamento empregado, devido à estreita associação destes com a lignina, que atua como uma barreira física (Fan e col., 1982). Assim, um tratamento prévio é necessário na conversão biológica do material lignocelulósico.

A Figura 1, mostra uma variedade de produtos que podem ser obtidos a partir do material lignocelulósico através de processos químicos ou biológicos, que envolvem a ação de microrganismos ou enzimas.

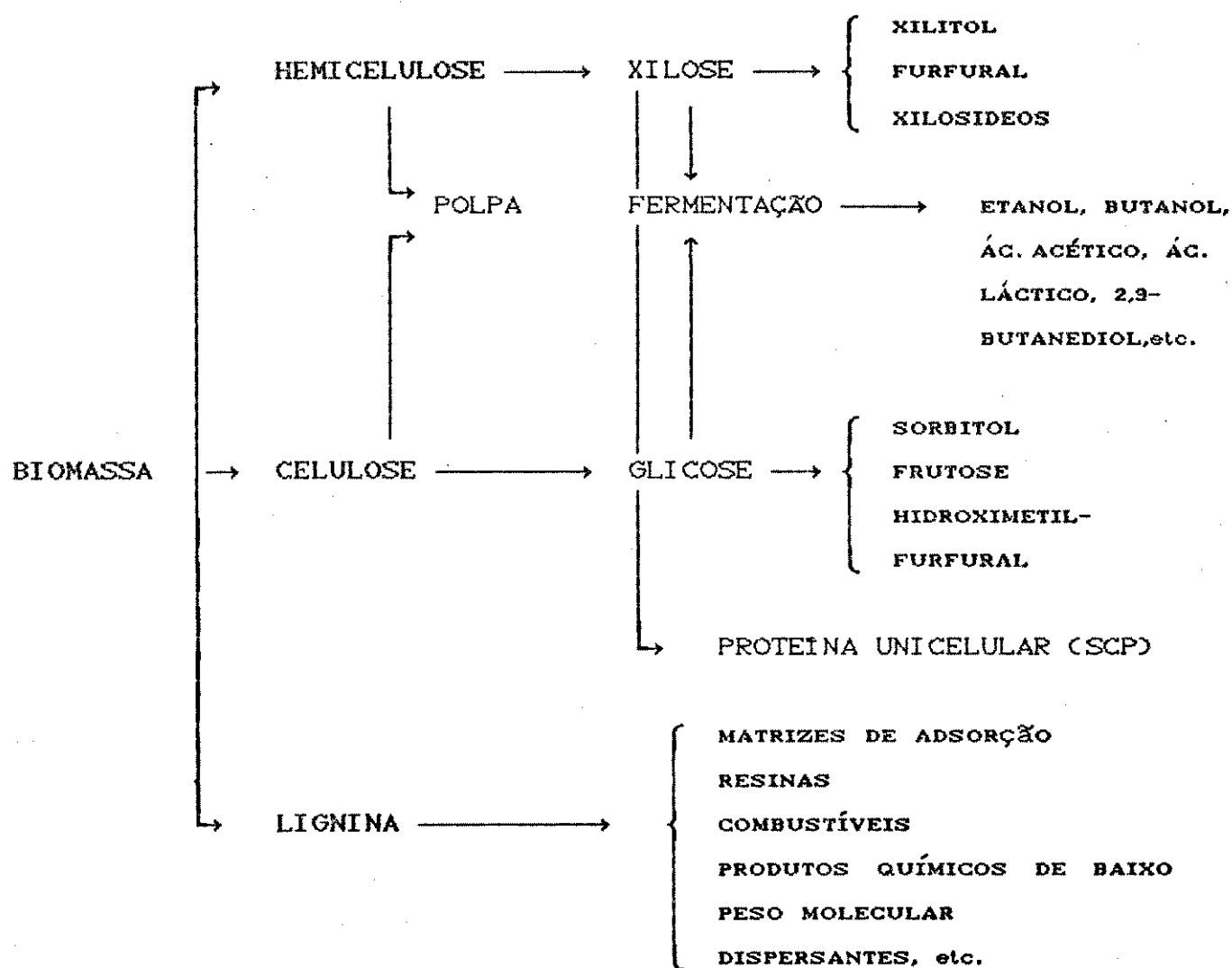


FIGURA 1: Vias de utilização da biomassa (Phillips, 1985)

1.2.- RESÍDUOS LIGNOCELULÓSICOS : ESTRUTURA, BIODEGRADAÇÃO E ENZIMOLOGIA DA BIODEGRADAÇÃO

1.2.1.- CELULOSE

A celulose é o material orgânico mais abundante sobre a terra e constitui aproximadamente 50% da biomassa, representando uma das fontes mais importantes para obtenção de açúcares solúveis. Na natureza encontra-se associada a outras moléculas como hemicelulose e lignina (Fengel e Wegener, 1984).

O polímero é linear, insolúvel em água e de um peso molecular que varia entre 50 mil e 2,5 milhões de daltons dependendo da origem da amostra. Consiste de unidades de anidro glicose associadas por ligações β -1-4 glicosídicas. A unidade repetitiva de celulose é celobiose, um dissacarídeo de glicose (Fengel e Wegener, 1984) (Figura 2).

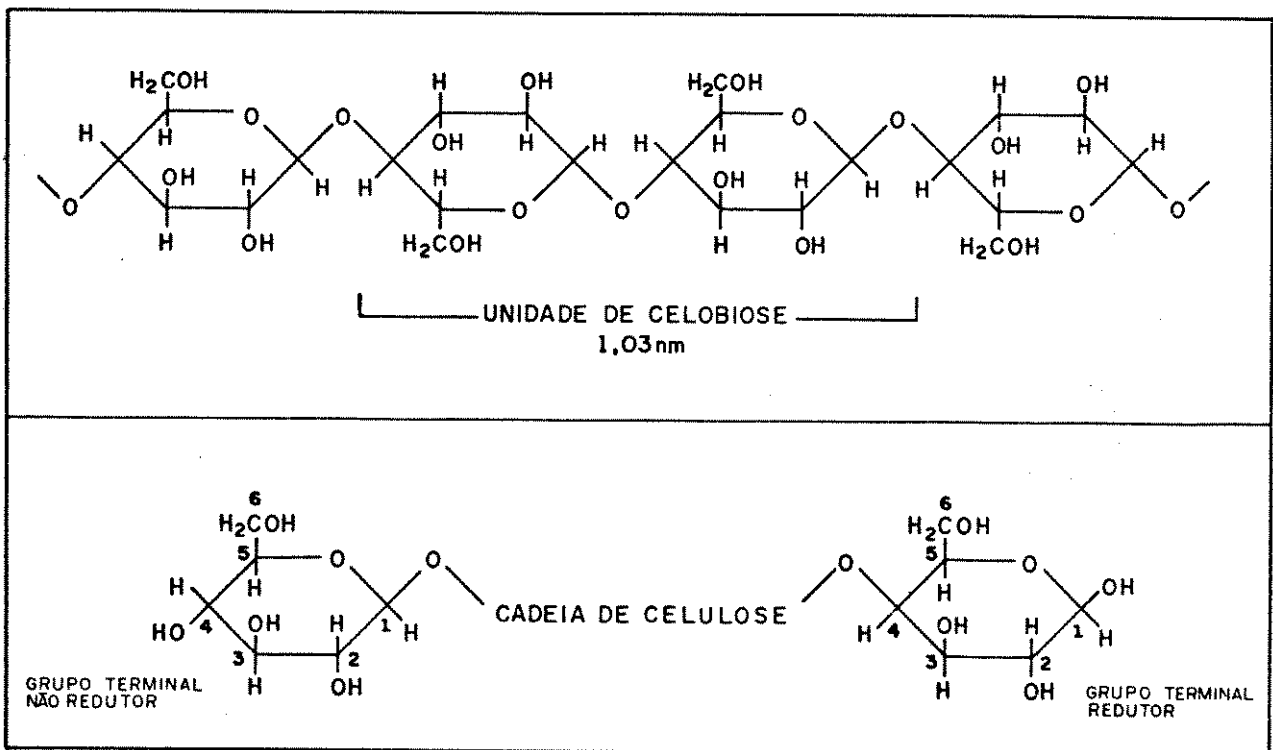


FIGURA 2: Estrutura da celulose

A utilização da celulose como substrato de bioconversão depende da acessibilidade às enzimas celulolíticas o que está relacionado à estrutura da celulose. Assim pode-se distinguir uma porção mais exposta ao ataque enzimático e portanto mais facilmente hidrolisável chamada de região amorfa e outra resistente à hidrólise conhecida como região cristalina (Bisaria e Ghose, 1981).

Biodegradação

A primeira etapa no processo de utilização da celulose é a conversão de celulose em glicose. A glicose pode ser posteriormente fermentada até etanol e o etanol utilizado diretamente na indústria química, como intermediário na produção de outros produtos químicos ou como combustível (Goldstein, 1981).

A degradação de celulose por microrganismos pode ocorrer através da produção de enzimas extracelulares que se difundem ao meio para quebrar a cadeia de celulose ou por contato direto entre as enzimas do microrganismo, presentes em sua superfície, e as fibras de celulose. Porém, na maioria dos casos, as enzimas celulolíticas são do tipo extracelular (Poincelot e Day, 1972).

Trichoderma reesei, um fungo mesófilo filamentososo, e seus mutantes (QM-9123, QM-9414, MCG-77, entre outras), são conhecidos como os melhores produtores de celulases (Mandels, 1975; Kawamori e col., 1985, Eriksson, 1990). O complexo celulase de *T. reesei*, têm sido extensamente estudado, observando-se que o sistema enzimático deste fungo é o mais eficiente sobre celulose nativa ou cristalina (Wood e McCrae, 1979; Dekker, 1989b). Uma generalização sobre o mecanismo de ação das celulases fungais surgiu como resultado do estudo do sistema celulolítico de *T. reesei* (Wood, 1985).

A produção de celulases é um dos processos mais importantes na conversão enzimática da biomassa celulósica a combustíveis como o etanol. As celulases podem ser utilizadas diretamente na hidrólise de resíduos celulósicos a produtos finais específicos, e indiretamente para aumentar a qualidade de forragem ou facilitar os processos tradicionais de fermentação. O crescimento de fungos celulolíticos sobre resíduos celulósicos, seguido por uma digestão

enzimática, tem uma grande potencialidade na produção de rações animais (Dekker, 1989a).

A celulose é hidrolizada a glicose por um complexo enzimático formado por :

1) Exo-1,4- β -glicanases ou Exo-celulases, existem sob duas formas, atuando ambas sobre o grupo terminal não redutor das cadeias maiores de celulose ou de cadeias mais curtas originadas pela ação de endo-glicanases. As exo-glicanases podem ser :

i) Celobioidrolases (1,4- β -D-glicano celobioidrolases, CBH, C₁) com capacidade de degradar celulose microcristalina e que atuam liberando unidades de celobiose, e

ii) Glicoidrolases (1,4- β -D-glicano 4 glicoidrolases) que atuam liberando unidades de glicose.

2) Endo-1,4- β -glicanases (endo-1,4- β -D-glicanoidrolase, C_x) atuam produzindo quebras internas na cadeia de celulose, liberando principalmente celo-oligossacarídeos (ex.: celobiose) e também alguma glicose. As endo-glicanases atuam nas regiões amorfas da celulose.

3) Celobiasas (1,4- β -glicosídeo, β -D-glicósido glicoidrolase) que catalisam a etapa de velocidade limitante na hidrólise de celulose a glicose. Atuam sobre a celobiose e outras celodextrinas produzidas como resultado da ação de endo e exo-celulases.

Numa ação combinada e sinérgica as endo-celulases agem na cadeia de celulose quebrando-a e criando extremos sobre os quais podem atuar as exo-celulases. O sinergismo se sucede até que a cadeia de celulose é finalmente degradada a celobiose e algumas celodextrinas de baixo PM (Eriksson e Wood, 1985). Os diversos produtos finais liberados exercem um efeito inibitório sobre cada uma das enzimas relacionadas com a hidrólise de celulose, por exemplo : a celobiose é inibidora (inibidor competitivo) da ação de celobioidrolase e também de algumas endo-celulases, dependendo da fonte, enquanto que glicose é um poderoso inibidor da ação de celobiasas e de algumas celulases (Dekker, 1989a) (Figura 3).

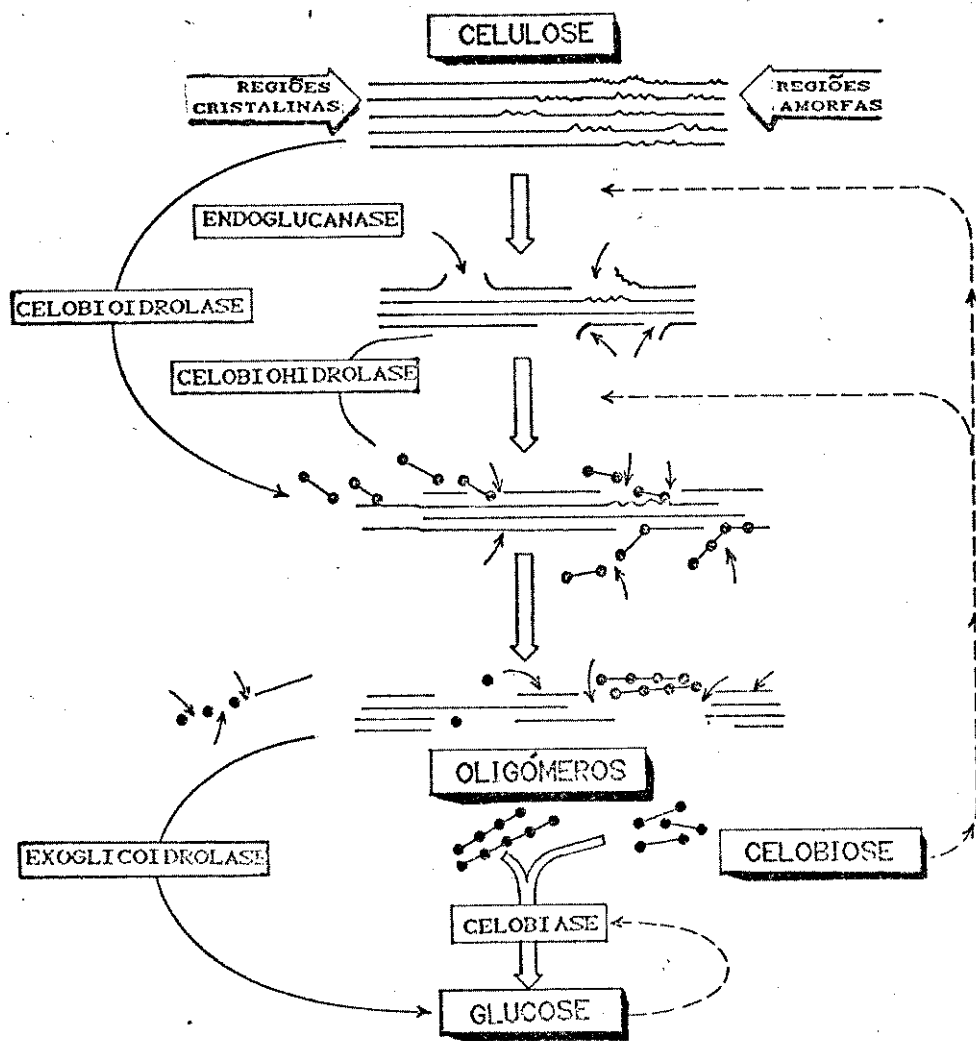


FIGURA 3: Esquema da ação sinérgica do complexo celulolítico (Eveleigh, 1987)

Uma grande variedade de métodos pode ser aplicada na análise da atividade enzimática total ou parcial do complexo celulolítico, utilizando-se para isto uma diversidade de substratos (Tabela 1) (Bisaria e Ghose, 1981; Mullings, 1985).

TABELA 1 : SUBSTRATOS UTILIZADOS NA DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE
CELULOLÍTICA E HEMICELULOLÍTICA

ENZIMA	SUBSTRATO	PRODUTO/CARACTERÍSTICA
Celobiase (EC 3.2.1.21)	Celobiose Celodextrinas	Glicose
β -D-Glicosidase (EC 3.2.1.21)	2-Nitrofenil- β -D- glucósideo	2-Nitrofenol
Exo-1,4- β -D-Glicanases :		
Celobioidrolase (C ₁) (EC 3.2.1.91)	Celulose cristalina (algodão) Avicel Celodextrinas	Celobiose
D-Glicoidrolase (EC 3.2.1.74)	Celulose cristalina Avicel Celodextrinas	D-Glicose
Endo-1,4- β -D-Glicanase (C _x) (EC 3.2.1.4)	Carboximetilcelulose Celulose amorfa	Açúcares redutores e/ou perda da viscosidade
Celulase total	Papel filtro Avicel Celulose-corante ("celulose azure")	Açúcares redutores, perda de peso, liberação do corante
Xilobiase (EC 3.2.1.37)	Xilobiose Xilodextrinas	Xilose
β -D-Xilosidase (EC 3.2.1.37)	2-Nitrofenil- β -D- xilopiranosídeo	2-Nitrofenol
Xilanase (EC 3.2.1.8)	Xilana Arabinoxilana	Xilose, açúcares redutores

1.2.2. - HEMICELULOSE

A hemicelulose constitui um 20 a 35% do peso da madeira e resíduos agrícolas e serve como uma fonte abundante e barata de carboidratos fermentáveis.

Estruturalmente as hemiceluloses são cadeias poliméricas relativamente curtas, com um PM que varia entre 1000 e $2,28 \times 10^5$ daltons. A maior parte delas é constituída por unidades β -xilopirranose com ligações β -1,4, com ou sem ramificações laterais contendo outros açúcares e ligadas por grupos hidroxilas nas posições 2 ou 3 de uma ou mais unidades xilopirranose (Lodh, 1986), (Figura 4).

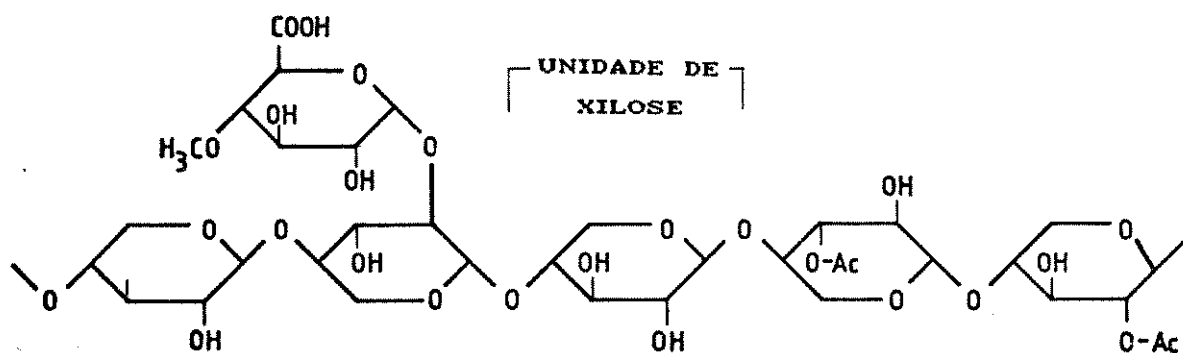


FIGURA 4: Representação de um segmento de 4-O-metil glucouranoxilana de madeiras duras

A hemicelulose, solúvel em meio básico, está localizado na parede das células vegetais e é constituída principalmente de D-galactose, D-manose, D-xilose, L-arabinose, outros açúcares e seus ácidos urónicos. A classificação é feita geralmente de acordo com o resíduo de açúcar presente, exemplo : D-galactana, D-manana, D-xilana, etc. As hetero-1,4-xilanas e as glicomananas são os dois tipos de hemiceluloses presentes mais frequentemente nos resíduos

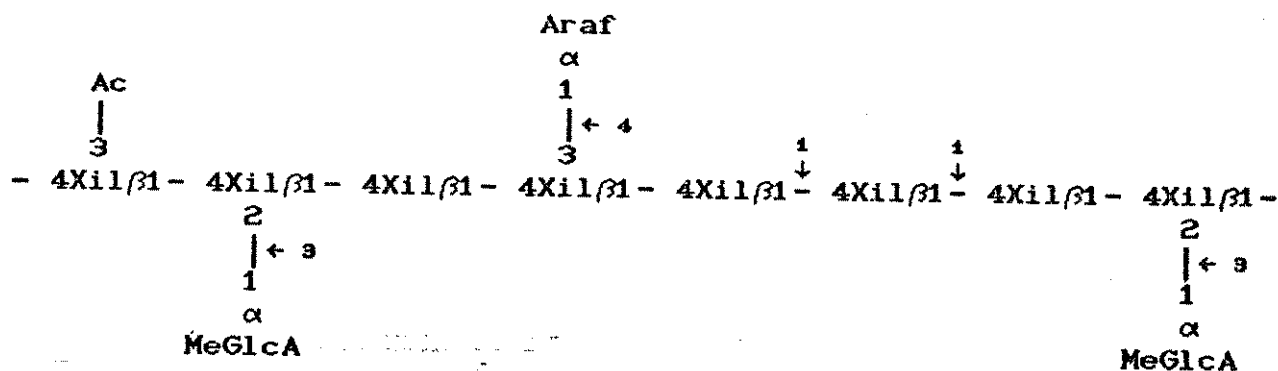
lignocelulósicos agrícolas e florestais (Dekker, 1985; Dekker, 1989a).

Consideráveis diferenças apresentam-se nas hemiceluloses de tecidos lenhosos de diferentes espécies, assim, madeiras duras são ricas em pentosanos (exemplo: xilose) enquanto que madeiras moles são ricas em hexosanos (exemplo: manose) (D'Almeida, 1988).

Biodegradação

O processo de conversão de hemiceluloses inclui hidrólise com a finalidade de obter uma mistura de açúcares simples, tendo como componente principal a D-xilose. A xilose e outras pentoses de madeiras podem ser convertidas a furfural sob condições ácidas ou reduzidas a xilitol. Por sua vez, a xilose pode ser também fermentada a etanol (Lee e col., 1988) (Figura 1).

Enquanto a hidrólise de celulose só precisa de um sistema enzimático que hidrolise ligações β -1,4-glicosídicas, a hidrólise de hemicelulose requer um conjunto de enzimas bem mais complexo que o anterior, devido a estrutura de heteropolissacarídeo altamente ramificado presente na hemicelulose. Na Figura 5 está representada uma molécula hipotética de xilana com os sítios para o ataque por enzimas hemicelulolíticas microbianas (Eriksson, 1990).



(1) Endo- 1,4- β - Xilanase (EC 3.2.1.8)

(2) β - Xilosidase (EC 3.2.1.37)

(3) α - Glicoronidase (EC 3.2.1)

(4) α - L- Arabinofuranosidase (EC 3.2.1.55)

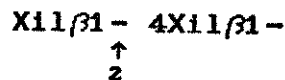


FIGURA 5: Sítios de ataque, por enzimas hemicelulolíticas microbianas, numa molécula hipotética de xilana

A maioria dos microrganismos celulolíticos que cresce sobre celulose é capaz de produzir hemicelulases do tipo xilanases como *T. reesei* (Chaudhary e Tauro, 1982; Beldman e col., 1985), porém altos rendimentos de xilanases têm sido obtidos também de fungos considerados não celulolíticos.

A caracterização de enzimas hemicelulolíticas é importante devido a seu envolvimento nas bioconversões industriais e suas potencialidades de aplicação comercial em grande escala, como na biopolpação de madeira, branqueamento de polpas, aumento da digestibilidade de rações animais, etc. (Jurasek e Paice, 1988; Wong e col., 1988; Eriksson, 1990).

A degradação completa da xilana requer a ação combinada de diferentes enzimas hidrolíticas, incluindo endo- β -1,4-xilanase, β -1,4-xilosidase, α -D- glicoronidase, α -L-arabinase, etc.. As hemicelulases são definidas de acordo com o substrato sobre o qual elas atuam, por exemplo: β -D-galactanases, α -L-arabinases, β -D-mananases e β -D-xilanases, que são as mais conhecidas. Não estão incluídas no grupo das hemicelulases as diversas exo-glicosidases como β -xilosidase, α -arabinosidase, etc., as quais participam na quebra dos monossacarídeos (ou oligossacarídeos) anexos à cadeia ramificada principal da hemicelulose (Dekker, 1989a).

Embora as enzimas que degradam hemiceluloses tenham sido bem caracterizadas (Dekker e Richards, 1976; Dekker, 1985; Mishra e col., 1990), o mecanismo de degradação dos componentes da hemicelulose por microrganismos e enzimas é ainda pouco conhecido. Atualmente as endo-xilanases são as hemicelulases melhor caracterizadas. Estas hidrolisam ligações β -D-xilopiranosídicas ao acaso, para produzir xilobiase e xilose a partir de xilana. As β -xilosidases são empregadas na conversão posterior de oligômeros, dímeros, etc., em xilose (Eriksson, 1990).

A importância da participação das β -xilosidases na hidrólise de xilanas é análoga à de celobíases na hidrólise de celulose (Dekker, 1989b). Os produtos finais da degradação de heteroxilanas são o ácido acético, a xilose, a arabinose, o ácido glicorónico e um derivado 4-O-metil. Alguns dos métodos utilizados na

determinação da atividade das hemicelulases são mostrados na Tabela 1 (página 7).

1.2.3. - LIGNINA

A lignina é o terceiro maior componente da parede celular das plantas. Considerado um material amorfo, rodeia os espaços entre as fibrilas de celulose, dando às plantas resistência ao esforço mecânico e formando uma barreira protetora contra o ataque de microrganismos.

A lignina é um produto polimérico originado de uma polimerização desidrogenativa iniciada por enzimas a partir de três precursores primários : álcool trans-p-cumarílico, álcool trans-coniferílico e álcool trans-sinapílico. A copolimerização radicalar destes álcoois produz um polímero heterogêneo, opticamente inativo e altamente polidisperso. A quantidade relativa dos álcoois no polímero determina o tipo de lignina (Higuchi, 1990).

O polímero de lignina, com um alto PM, se caracteriza por ligações estáveis do tipo C-C e éter entre os núcleos aromáticos (unidades fenil propano). Estruturas hipotéticas para lignina têm sido sugeridas através da combinação de informações sobre frações da molécula que são analisadas num sistema computacional, que fornece a estrutura possível. A estrutura da figura 6 representa uma lignina típica de madeiras duras (Nimz, 1974).

Biodegradação

A degradação de lignina envolve múltiplas reações bioquímicas que ocorrem mais ou menos simultaneamente : ruptura de ligações intermonoméricas, demetilações, hidroxilações, etc. A insolubilidade do polímero de lignina junto com a falta de estereoregularidade na estrutura, fazem dele um substrato de difícil degradação pela microflora (Tien e Kirk, 1983; Kirk, 1987; Leisola e col., 1987). Porém, pode ser finalmente degradado a humus, água e CO₂.

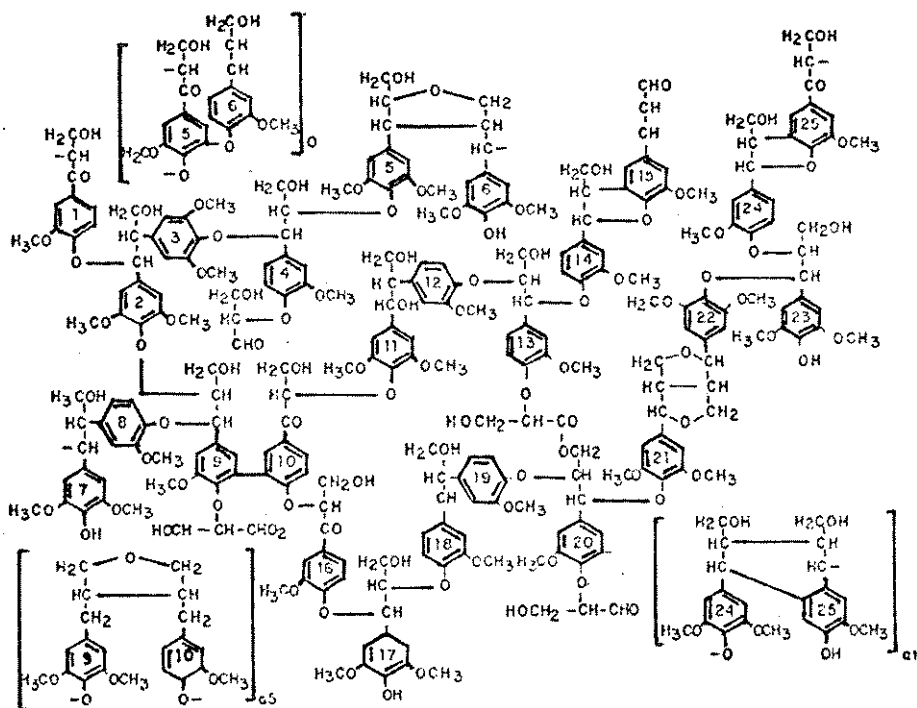


FIGURA 6: Estrutura possível para lignina de folhosas

Dos fungos estudados, os mais eficientes na degradação de lignina são os de decomposição branca ("white-rot fungi"). A utilização do termo "degradação" refere-se não só a completa decomposição de lignina até CO₂ e H₂O, bem como às diversas modificações ou bioalterações produzidas na molécula. Destaca-se entre os fungos de decomposição branca, *Phanerochaete chrysosporium* (ou *Sporotrichum pulverulentum*), cujas enzimas têm sido isoladas, purificadas e caracterizadas (Linko, 1988; Schoemaker e Leisola, 1990).

A elucidação do mecanismo de biodegradação de lignina têm sido realizado seja pelo estudo das mudanças químicas na lignina após ataque fungal ou pela utilização de compostos modelo que apresentam semelhanças estruturais à lignina (Higuchi, 1990).

Algumas das aplicações potenciais dos microrganismos e enzimas que degradam lignina incluem polpação, branqueamento de polpas, liberação de carboidratos a partir de lignocelulósicos, conversão de materiais lignocelulósicos em rações animais e tratamento de resíduos derivados de lignina (Haemmerli e col., 1988; Paice e col., 1989; Ho e col., 1990; Eriksson, 1990; Oriaran e col., 1990).

As enzimas extracelulares que participam nas reações que levam a degradação ou transformação da lignina por fungos, incluem ligninases, peroxidases dependentes de Manganês (Mn peroxidases), fenol-oxidases (lacases, peroxidases) e enzimas que produzem H_2O_2 .

A ligninase, isolada pela primeira vez em 1983 de culturas do fungo *P. chrysosporium* (Tien e Kirk, 1983; Glenn e col., 1983), é uma hemoproteína que tem um importante desempenho na despolimerização de lignina na presença de H_2O_2 . Atualmente a enzima é referida como lignina-peroxidase (LiP). A produção destas enzimas tem lugar durante o metabolismo secundário (idiófase) e é induzida pelo substrato (Kirk e Farrell, 1987).

A produção e atividade das ligninases variam de um microrganismo para outro e são influenciadas pelas condições de cultivo. A atividade de ligninase em *P. chrysosporium* é detectada quando o fungo cresce em concentrações limitantes de nitrogênio e pode ser estimulada pela adição de álcool veratrílico à cultura (Kirk e Farrel, 1987). O álcool veratrílico é um metabólito secundário produzido por alguns fungos basidiomicetos de decomposição branca e também pode ser oxidado a aldeído pela ligninase de *P. chrysosporium*; assim esta reação têm sido utilizada como método de determinação de ligninase (Tien e Kirk, 1984).

As fenol oxidases têm sido detectadas extracelularmente na maioria dos fungos de decomposição branca e numa ação cooperativa com outras enzimas fúngicas (ex.: glicose oxidase e/ou celulases) podem participar da decomposição de lignina (Ander e Eriksson, 1978; Kirk e Shimada, 1985; Szklarz e col., 1989). Existem tres tipos de fenol oxidases : peroxidases, tirosinases e lacases (Crawford, 1981).

As peroxidases são enzimas que contêm ferro e que catalizam a oxidação de o- e p-difenóis na presença de H_2O_2 . Tirosinases e lacases contêm cobre, não requerem H_2O_2 e se diferenciam na especificidade pelo substrato. As tirosinases, em geral, não são de relevância na degradação de lignina, já que são produzidas intracelularmente. As lacases (EC 1.10.3.2), catalizam a oxidação de monofenóis, o- e p-difenóis, aminofenóis e compostos diaminoaromáticos usando oxigênio molecular (Reinhammar, 1984).

Numerosos estudos feitos com o fungo de decomposição branca *Corioulus versicolor*, indicam que ele produz fenol oxidases do tipo lacase que despolimerizam a lignina (Katayama e col., 1989; Morohoshi e col., 1989). Szklarz e colaboradores (1989), classificaram *C.versicolor* como um fungo produtor de lacases, com capacidade de oxidar sirigaldazine, o-dianisidina e vanililacetona (composto modelo de lignina).

Kuwahara e colaboradores (1984) descobriram uma atividade peroxidase diferente de ligninase em culturas do fungo *P.chrysosporium*. A enzima isolada requer H_2O_2 , Mn (II) e lactato para sua atividade.

As vias de degradação de lignina e celulose estão provavelmente interligadas e podem existir aspectos comuns na regulação das atividades ligninolíticas, celulolíticas e hemicelulolíticas (Figura 7).

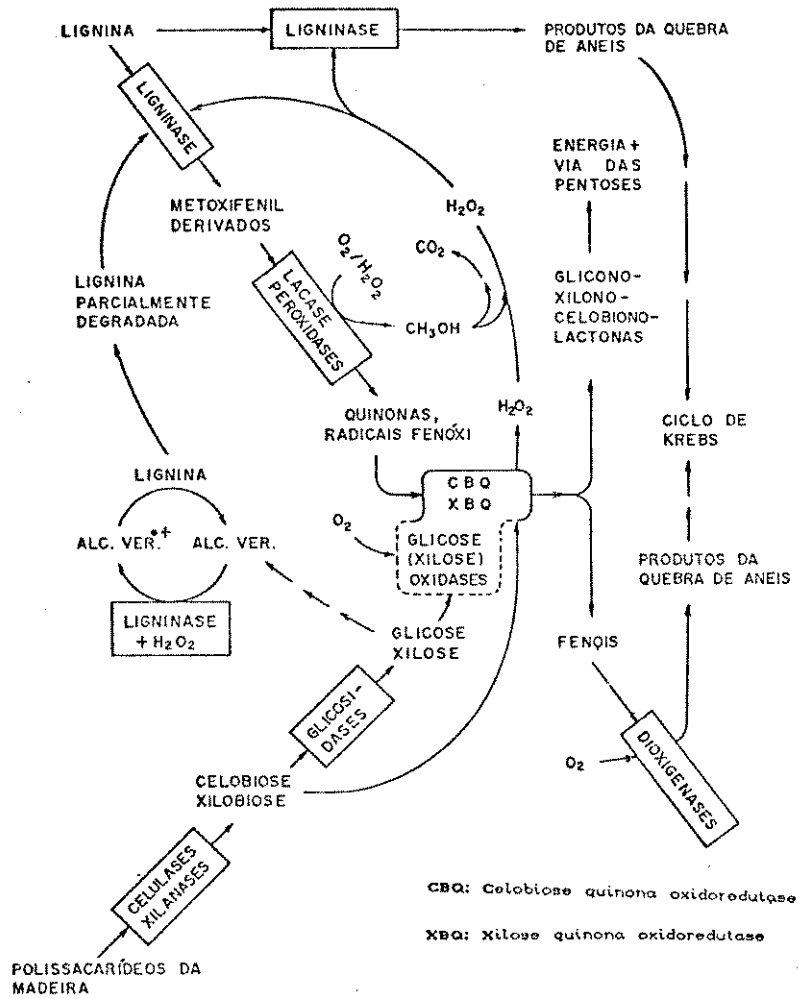


FIGURA 7: Vias metabólicas para a degradação dos componentes de materiais lignocelulósicos (Eriksson, 1990)

1.3. - MADEIRA COMO MATÉRIA PRIMA

A madeira constitui uma das fontes renováveis mais abundantes, ocupando um terço da superfície terrestre (300 bilhões de m³ de madeira) (Fengel e Wegener, 1984). As perspectivas de aplicação da madeira como matéria prima e fonte de energia estão dirigidas principalmente para a obtenção de polpa e papel, produtos químicos, combustíveis, aditivos, etc., e outros produtos desenvolvidos ou modificados através de novos processos biotecnológicos.

A madeira é um copolímero constituído principalmente de celulose, lignina e hemicelulose, com pequenas quantidades de extrativos e substâncias minerais. Aproximadamente 30 a 40 % da parede celular dos tecidos lenhosos consiste de celulose, sendo portanto o maior componente em peso seco da madeira. As hemiceluloses, em estreita associação com celulose na parede celular, constituem 20 a 35% da madeira e formam a ligação entre lignina e celulose. A lignina, que age como um agente permanente de ligação entre as células conferindo rigidez estrutural, constitui 20 a 35% da madeira. A lignina está associada a hemicelulose na parede celular através de interações físicas e ligações covalentes (Fengel e Wegener, 1984).

O teor, a proporção e às vezes a composição química dos diferentes componentes da madeira variam grandemente com a espécie. As madeiras duras, por exemplo, contem mais hemiceluloses que as moles e a composição de açúcares é diferente. A quantidade de lignina é maior em madeiras moles que em duras com diferenças estruturais entre ambas as ligninas (Fengel e Wegener, 1984).

O termo madeira dura e mole é aplicado para diferenciar a procedência dos diferentes tipos de fibras vegetais. As fibras vegetais de maior importância econômica e industrial são as provenientes de árvores do grupo das folhosas, duras ou "hardwood" e das coníferas, moles ou "softwood". Exemplos de madeiras duras incluem eucaliptos, bétula, nogueira, etc., e de madeiras moles, cedros, pinus, cipreste, etc. (Koga, 1988).

Os componentes encontrados em menor proporção na madeira são substâncias de baixo peso molecular chamadas de componentes menores. Com base na solubilidade em água ou em solventes neutros os componentes menores podem ser classificados em "extraíveis" e "não extraíveis". Os extraíveis ou extrativos por sua vez podem ser divididos em tres grupos : terpenos, resinas e fenóis, os quais podem ser extraídos com água, solventes orgânicos neutros ou volatilizados a vapor. Outros compostos orgânicos podem estar presentes nos extrativos como gorduras, ceras, ácidos graxos, álcoois, esteróides, etc.. Os componentes não extraíveis da madeira consistem principalmente de substâncias inorgânicas (Fengel e Wegener, 1984; D'Almeida, 1988).

Os extrativos cumprem funções fundamentais de proteção e são os responsáveis por certas características do aspecto da madeira como cor, cheiro ou de resistência ambiental, isto é, de resistência ao ataque de microrganismos. Estas substâncias podem ser extraídas da madeira sem alterar a estrutura da parede celular (D'Almeida, 1988).

Uma grande variedade de espécies de madeira são caracterizadas pelos extrativos que elas contém e a utilização de algumas espécies nas indústrias de produtos químicos e de papel é fortemente influenciada por estas substâncias, assim a presença deles em madeiras interfere nos processos de polpação e branqueamento (Fan e col.,1982). A influência negativa que a presença dos extrativos pode ter na fabricação de pastas celulósicas e de papel manifesta-se como redução no rendimento, aumento de consumo de reagentes, corrosão dos equipamentos, baixa qualidade da pasta celulósica, etc. (D'Almeida, 1988).

1.3.1. - Biodegradação por microrganismos

A madeira pode ser atacada na natureza por uma variedade de organismos, entre os quais bactérias e fungos desempenham um papel preponderante.

A degradação de madeira por bactérias é limitada devido à incapacidade delas se movimentarem dentro da madeira. Ao contrário das bactérias, os fungos tem capacidade de se expandir rapidamente dentro da madeira por crescimento de suas hifas. As hifas são uns filamentos que em conjunto formam o micélio fungal e, no caso dos fungos que degradam efetivamente a madeira, estas hifas penetram até o lúmen celular, onde através da excreção de enzimas começa o processo de decomposição da parede celular. Diferentes tipos de fungos darão origem a diferentes tipos de decomposição da madeira (Fengel e Wegener, 1984).

Os fungos de decomposição parda ou "Brown-rot fungi", degradam principalmente a celulose e hemicelulose da madeira. Os fungos de decomposição branca ou "White-rot fungi", degradam lignina e outros componentes da madeira em forma mais ou menos simultânea (Fengel e Wegener, 1984). Porém, existem alguns fungos de decomposição branca que removem lignina de forma seletiva (Kirk e Moore, 1972; Blanchette e col., 1988). *C.versicolor* é um exemplo de fungo de decomposição branca que degrada simultaneamente todos os componentes da parede celular. *P.chryso sporium*, *Phlebia radiata*, *Pycnoporus cinnabarinus* e *Pleurotus ostreatus*, entre outros, estão incluídos nos fungos de decomposição branca que degradam eficiente e mais ou menos seletivamente lignina. Os fungos de decomposição branda ou "Soft-rot fungi", degradam carboidratos e lignina a velocidades muito baixas. Estes fungos provocam um amolecimento superficial na madeira (Käärik, 1974).

Quando se fala em biodegradação de madeira, deve-se diferenciar entre a biodegradação natural e a induzida. A primeira é aquela que ocorre nos solos envolvendo a ação simultânea de uma ampla variedade de microrganismos. A segunda é aquela dirigida sob condições controladas no laboratório, onde um determinado microrganismo é inoculado sobre madeira estéril. Este tipo de biodegradação tem merecido diversos estudos nos últimos tempos devido, principalmente, a aspectos tecnológicos relacionados com as indústrias de celulose e papel. Assim, um especial interesse tem-se voltado à seletividade de degradação de lignina com relação à celulose, através da obtenção de mutantes de fungos de

decomposição branca celulase negativos, como é o caso de *P. chrysosporium* (Johnsrud e Eriksson, 1985; Kirk e col., 1986), e através do controle das condições físico-químicas durante a biodegradação (Tran e Chambers, 1987; Reid, 1989; Durán e col., 1990 e referências ali citadas).

1.3.2. - Alguns aspectos da madeira de Eucaliptus

O gênero *Eucaliptus* é uma das espécies arbóreas mais utilizadas no Brasil, como fonte de matéria prima para produção de polpa. Estima-se que os plantios de eucaliptos no Brasil cobrem uma área superior a 3 milhões de hectares (Inst. Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, 1985). As três maiores espécies de eucalipto utilizados na produção de polpa e papel são *Grandis*, *Globulus* e *Rostrata* (Sidaway, 1988). A madeira de eucalipto apresenta as características morfológicas e de composição química próprias de folhosas ou madeiras duras (*hardwood*). Estas propriedades da madeira influenciam tanto os processos de obtenção de polpa quanto as características do papel resultante. No que diz respeito a composição química, a madeira de eucalipto, semelhante à maioria das folhosas, possui um menor teor de lignina e um maior teor de xilanas do que as coníferas. Assim, o processo de deslignificação da madeira requer um menor gasto de reagentes químicos e de tempo (Sidaway, 1988).

1.4. - PRODUÇÃO DE PROTEÍNA UNICELULAR (SCP)

Novos processos desenvolvidos nos últimos tempos tem utilizado fontes agrícolas pouco convencionais na obtenção de produtos proteicos para alimentação humana e animal (Durán, 1990). Uma de tais fontes é a biomassa microbiana, proveniente de microrganismos unicelulares como algas, bactérias, leveduras e fungos, conhecida mais comumente como "proteína unicelular" ou SCP (*single cell protein*) (Litchfield, 1983).

A proteína unicelular pode ser utilizada como complemento na alimentação humana ou em rações animais. Na alimentação humana pode ser utilizada como aditivo para melhorar o sabor dos alimentos, e no caso de rações animais pode ser utilizada para substituir suplementos proteicos tradicionais, como peixe e soja (Smith, 1988).

A quantidade e a qualidade são os principais objetivos na produção de proteína unicelular. O potencial nutritivo do produto resultante da biomassa microbiana é determinado pela composição de aminoácidos da proteína, principalmente pela composição em aminoácidos essenciais, que são aqueles que não podem ser sintetizados em quantidades adequadas pelos animais superiores e devem, por tanto, ser obtidos através da dieta (arginina, leucina, valina, isoleucina, lisina, histidina, metionina, treonina, fenilalanina e triptofano). Em relação à composição de aminoácidos as bactérias em geral possuem um alto conteúdo em metionina e no caso de leveduras tem-se verificado que o limitante primário é representado pelos sulfurados (Waslien, 1975).

Os substratos utilizados para o preparo da biomassa protéica incluem desde açúcares simples até resíduos agrícolas e industriais como bagaço de cana, casca de arroz, serragem, papel, petróleo e outros. Destes substratos, os resíduos lignocelulósicos tem sido os mais estudados nos últimos tempos como fontes renováveis de carboidratos na produção de proteína unicelular (Tanaka e Matsuno, 1985).

A conversão de material lignocelulósico em proteína unicelular pode ser realizada através de dois processos diferentes. O primeiro envolve a produção de proteína unicelular através do crescimento direto do microrganismo sobre o material lignocelulósico pré-tratado. As desvantagens deste processo são que, geralmente, o conteúdo proteico dos microrganismos celulolíticos é baixo e a separação do microrganismo do resíduo não hidrolizado é difícil. Porém, a simplicidade do processo o faz economicamente atrativo. O segundo processo envolve a produção de proteína unicelular através do crescimento de microrganismos, especialmente leveduras, sobre uma solução de açúcar obtida após

hidrólise enzimática ou ácida do material lignocelulósico. As desvantagens deste processo estão associadas ao maior número de etapas exigidas em relação ao anterior, que são pré-tratamento, produção de celulasas, hidrólise enzimática e assimilação ou fermentação (Tanaka e Matsuno, 1985).

1.5. - MICRORGANISMOS TERMÓFILOS : CARACTERÍSTICAS GERAIS

Os microrganismos termófilos tem recebido considerável atenção nos últimos tempos, devido a seu potencial de aplicação industrial. Estes microrganismos apresentam uma serie de vantagens frente a mesófilos, tais como : rápido crescimento, relativamente alta estabilidade de suas enzimas, ausência de patogenicidade e facilidade na destilação para recuperar o produto em elevadas temperaturas, em processos de fermentação para produção de solventes (Eveleigh, 1983).

Definem-se como termófilos aqueles organismos que apresentam uma temperatura ótima de crescimento acima da temperatura observada no ambiente, isto é, acima de 45 ou 50°C. Cooney e Emerson (1964), definiram os fungos termófilos como "aqueles que tem uma temperatura máxima de crescimento igual ou maior a 50°C e uma mínima igual ou maior a 20°C, porém nunca inferior".

O fator primário que determina a temperatura limite de crescimento para um organismo é sua constituição genética (Dowding, 1981). Numerosas hipóteses tem surgido tentando explicar os parâmetros responsáveis pela resistência e/ou crescimento em altas temperaturas (Wiegel, 1990).

Os ambientes de onde mais frequentemente tem sido isolados estes fungos, são aqueles capazes de gerar calor de forma espontânea, ou auto-aquecimento, e incluem : feno, grãos armazenados em sistemas inadequados, bagaço, materiais orgânicos resultantes dos processos de compostagem, etc. Também tem sido encontrados em pilhas de cavacos na Suécia, Canadá e nos E.U.A., onde os cavacos são armazenados ao ar livre por longos períodos de tempo até serem utilizados na produção de papel e derivados. A

temperatura nas pilhas de cavacos as vezes aumenta até provocar ignição espontânea do material (Sharma, 1989, e referências ali citadas).

Embora existam controvérsias a respeito da degradação de materiais lignocelulósicos, principalmente da fração de lignina, por estes fungos, existem evidências de que eles utilizariam celulose, hemicelulose e extractivos da madeira como fonte de energia (Rosemberg, 1978; Jain e col., 1979). Sobre a produção enzimática, existe bastante informação indicando que estes fungos produzem celulasas, hemicelulasas, amilases, proteases, etc. (Ogundero, 1979; Grajek, 1987a; Wojczak e col., 1987).

O interesse no estudo de fungos termófilos basea-se no fato destes apresentarem uma elevada velocidade de crescimento e produção de celulasas, alcançando em alguns casos, níveis superiores aos microorganismos mesófilos.

1.5.1. - *Thermoascus aurantiacus*: Antecedentes bibliográficos

O fungo pertencente ao grupo dos termófilos *Thermoascus* espécie *aurantiacus*, é um ascomiceto que foi isolado pela primeira vez em 1907 por Hugo Miede, a partir de pilhas de feno auto-aquecido, armazenado em depósitos (Miede, 1907). A presença deste fungo tem sido relatada nos mais diversos meios como : plantas de tabaco, solo, cavacos de madeira, vagem de cacau, esterco de aves, efluentes, etc. (Sharma, 1989).

Numa revisão bibliográfica sobre *T.aurantiacus* encontrou-se uma série de trabalhos relacionados ao seu metabolismo e à sua produção enzimática. Tashpulatov e Yusupova (1976), observaram a produção de altos níveis de celulase e hemicelulase por uma cepa de *T.aurantiacus*. Ogundero (1979) estudou a produção de celulasas e amilases de uma variedade de fungos termófilos, entre os quais *T.aurantiacus*, isolados a partir de produtos do tabaco. A maioria dos fungos testados apresentou as duas atividades enzimáticas, enquanto *T.aurantiacus* apresentou apenas atividade amilolítica.

Tong e colaboradores (1980) e Shepherd e colaboradores (1981) purificaram três celulasas e uma β -glicosidase de uma cepa de

T.aurantiacus, e estudaram a especificidade pelo substrato. Testore e Obert (1986) purificaram uma α e uma β -glicosidase intracelulares, extraídas do micélio de *T.aurantiacus* (Miehe) e estudaram suas propriedades estruturais e o seu mecanismo de ação.

Grajek (1986, 1987a, 1987b) estudou a temperatura e pH ótimos das celulasas de uma série de fungos termófilos isolados de pilhas de cavacos, onde *T.aurantiacus* (Miehe) apresentou a maior termoestabilidade de exo e endo-1,4- β -glicanases e β -glicosidase. A maior produção de celulasas e xilanase foi relatada quando a fermentação teve lugar em meio sólido.

Diversos trabalhos informam sobre a capacidade de produção de celulasas e xilanases por *T.aurantiacus* utilizando uma variedade de substratos para o crescimento. Uma endo- β -D-xilanase (1,4- β -D-xilana xilanaidrolase, EC 3.2.1.8) foi purificada e caracterizada da cepa C 436 (Yu e col., 1987; Tan e col., 1987; Kawamori e col., 1987; Feldman e col., 1988).

Estudos recentes com uma cepa de *T.aurantiacus*, na Índia, informam sobre a produção e purificação de grandes quantidades de xilanase, β -glicosidase, exo-celulase e endo-celulase. Uma α -D-glicoronidase, presente também nesta cepa indiana do fungo, foi purificada e caracterizada (Khandke e col., 1989 a, b e c).

1.6.- FATORES QUE INFLUENCIAM O CRESCIMENTO DE UM MICRORGANISMO

O crescimento de um microrganismo e a formação de produto ocorrem em resposta às condições ambientais, sendo, por tanto, essencial compreender a relação que existe entre a regulação do metabolismo microbiano e seu ambiente físico e químico (Cooney, 1981).

Melhorias nos processos de fermentação são geralmente atribuídas ao desenvolvimento de cepas superiores através de mutação. Porém, modificações no ambiente nutritivo e físico ao qual o microrganismo é exposto, produzem também alterações no rendimento do produto. Um meio apropriado para o cultivo de microrganismos de interesse industrial, deve incluir nutrientes

economicamente atraentes, não só quanto ao valor comercial como também quanto aos custos de armazenamento, pré-tratamento, esterilização, etc. O desenvolvimento de um meio apropriado requer a seleção de fontes de carbono, nitrogênio, fósforo, enxofre, potássio e elementos traço. Outros parâmetros importantes na otimização de um meio incluem pH, nível de oxigênio dissolvido e temperatura da cultura (Greasham e Inamine, 1986).

Diferentes tipos de microrganismos respondem a diferentes formas de crescimento, assim deve-se diferenciar entre bactérias, leveduras e fungos (Cooney, 1981). Os fungos crescem através de um processo de alongamento das hifas (ou crescimento apical) e posterior ramificação das mesmas. As hifas são formações filamentosas que consistem de células dispostas em sucessão linear e que em conjunto formam o micélio do fungo. O comprimento que uma hifa pode alcançar depende do ambiente de crescimento do fungo. Quando o ambiente permanece sem perturbação, como na superfície de um agar, as hifas podem crescer por períodos prolongados de tempo alcançando grandes comprimentos. Em culturas submersas existem forças que provocam fragmentações das hifas, dando como resultado hifas curtas e altamente ramificadas. Neste tipo de cultura o micélio pode existir numa forma dispersa ou pode formar *pellets*. O tipo de crescimento tem um efeito importante sobre o crescimento total alcançado por um microrganismo e sobre a formação de produto (Cooney, 1981).

1.6.1. - Métodos de quantificação do crescimento microbiano

Uma variedade de métodos destinados a medir o crescimento microbiano é descrito na literatura (Cooney, 1981). Entre os mais conhecidos estão a contagem direta do número de células no microscópio, a medição da absorvância de uma cultura em crescimento ou método turbidimétrico e medição de peso seco expresso como gramas de massa celular. Embora o método do peso seco seja um método simples e rápido os resultados obtidos são frequentemente difíceis de interpretar.

Um método simplés para quantificar o crescimento microbiano consiste em medir o crescimento linear de uma cultura de fungos ou bactérias sobre uma superfície sólida como uma placa com agar, onde o aumento do raio da colônia é medido em função do tempo. Outro método, equivalente ao anterior foi desenvolvido para medir o avanço da fronteira micelial do fungo quando cresce dentro de um tubo de vidro horizontal que contém meio sólido. O método do tubo, além de ser um método não destrutivo, é especialmente útil no estudo da velocidade de crescimento de microrganismos que se caracterizam por apresentar um crescimento rápido (Ryan e col., 1943; Moore-Landecker, 1972; Ferraz e Durán, 1989).

1.6.2.- Métodos estatísticos de otimização do crescimento microbiano

Melhorias no crescimento de um microrganismo, aumento na produção de metabólitos, enzimas, etc., podem ser obtidos através da aplicação de técnicas de engenharia genética. Porém estes objetivos podem ser também atingidos melhorando ou otimizando as condições de crescimento de um determinado microrganismo.

O método clássico de otimização das condições de crescimento envolve a mudança de uma variável independente como nutriente, pH, temperatura, etc., enquanto fixa-se as outras num certo nível. Este método é extremamente laborioso e lento, especialmente quando o número de variáveis a ser estudado é grande, além de não garantir a determinação das condições ótimas. Um método alternativo consiste num estudo ou planejamento fatorial, que pode examinar cada possível combinação de variáveis independentes em níveis apropriados (Greasham e Inamine, 1986; Strange, 1990).

Na realização de um planejamento fatorial o pesquisador deve selecionar um número fixo de "níveis" (ou "versões") para cada variável (ou "fator"), obtendo como resultado o número de corridas experimentais a serem desenvolvidas a partir de todas as possíveis combinações de níveis e variáveis. Se existem n_1 níveis para a primeira variável, n_2 para a segunda, ... , e n_k para a k variável, a combinação completa de $n_1 \times n_2 \times \dots \times n_k$ experiências

a serem desenvolvidas é chamada de $n_1 \times n_2 \times \dots \times n_k$ planejamento fatorial. Por exemplo, um $2 \times 3 \times 5$ planejamento fatorial, requer $2 \times 3 \times 5 = 30$ ensaios experimentais, e um $2 \times 2 \times 2 \times 2 = 2^4$ planejamento fatorial requer 16 ensaios experimentais (Box e col., 1978; Strange, 1990).

Num planejamento fatorial, o efeito principal de uma variável e os efeitos de interação entre duas ou mais variáveis, podem ser determinados. O efeito de uma variável A corresponde à variação na resposta quando se passa de um nível inferior (-) a um nível superior (+), e pode ser determinado da seguinte forma:

$$\text{Efeito da variável A} = \bar{y}_+ - \bar{y}_- \dots$$

onde \bar{y}_+ é a resposta média no nível superior (+) de A e \bar{y}_- é a resposta média no seu nível inferior (-) (Box e col., 1978). Por exemplo :

$$\text{Efeito de A} = A = \frac{x_1+x_2+x_3}{3} - \frac{x_4+x_5+x_6}{3} \dots$$

onde x_1, x_2 e x_3 correspondem aos valores de A no nível (+) e x_4, x_5 e x_6 correspondem aos valores de A no nível (-).

Quando duas ou mais variáveis não agem aditivamente se diz que interagem ou interatuam. A interação entre duas variáveis é determinada pela diferença entre o efeito médio de uma variável, A, na presença de uma segunda variável, B, no seu nível (+) e o efeito médio da variável A no nível (-) da variável B (Box e col., 1978; Strange, 1990). A "interação A com B" é representada em símbolos por $A \times B$.

Assim, por exemplo :

Variável (nível)	Efeito médio de A	
B (+)	\bar{x}_1	$A \times B = \frac{(\bar{x}_1 - \bar{x}_2)}{2}$
B (-)	\bar{x}_2	

Outros métodos estatísticos, tais como o simplex, podem ser utilizados nos processos de otimização. O simplex é uma figura geométrica formada por $(N+1)$ pontos experimentais (ou vértices), onde N é o número de dimensões ou de variáveis independentes do sistema em estudo. Em duas dimensões o simplex toma a forma de um triângulo, em três de um tetraedro, etc. Este método não pode ser começado com um ponto só, mas sim com $(N+1)$ pontos, que definem o simplex inicial (Press e col., 1987).

Depois de definida a figura geométrica, uma série de etapas se sucedem no simplex com o objetivo de alcançar o ponto de máximo rendimento. O primeiro passo consiste em "conduzir" o ponto de menor rendimento da figura geométrica em direção ao lado oposto da figura, onde o rendimento é maior, gerando um novo ponto por "reflexão" (o ponto "reflete" no lado oposto da figura). O rendimento no ponto gerado pelo simplex é obtido experimentalmente e é integrado e comparado com os rendimentos nos pontos do simplex inicial. O ponto com o mais baixo rendimento é eliminado do sistema. Estas etapas se sucedem até o ponto de máximo rendimento ser alcançado. Quando o ponto de máximo rendimento for atingido o simplex se detém. As vezes, dependendo da natureza do processo em estudo, os erros experimentais fazem com que exista uma região de pontos de ótimo rendimento próximos uns dos outros e do ponto de máximo rendimento. Neste caso, o simplex gera uma série de pontos de rendimentos ótimos muito parecidos (Shavers e col., 1979; Greasham e Inamine, 1986; Press e col., 1987).

Quando um processo de otimização está sendo desenvolvido, mais de um método estatístico pode ser aplicado. Assim, quando a região ótima tenha sido encontrada através de um planejamento fatorial, o ponto de máxima resposta pode ser encontrado pela aplicação posterior de um simplex.

2. - OBJETIVOS

Como existe pouca informação na literatura a respeito da cepa brasileira de *T.aurantiacus*, isolada de pilhas de cavacos, o presente trabalho tem como objetivos analisar alguns aspectos relacionados com a fisiologia do fungo, tais como: crescimento, produção de proteína unicelular, produção de enzimas e sua utilização no tratamento de materiais lignocelulósicos.

As condições ótimas de cultivo de *T.aurantiacus* serão definidas, quanto a fonte de carbono e nitrogênio, pH e temperatura.

Será avaliada a qualidade da proteína unicelular produzida pelo fungo a partir de açúcares simples.

A produção de enzimas lignocelulolíticas pelo fungo será avaliada, utilizando diferentes substratos de crescimento, lignocelulósicos e não lignocelulósicos.

Finalmente, serão estudadas a capacidade do fungo de degradar os componentes da madeira de *Eucalyptus grandis* e o efeito da concentração de glicose na degradação de madeira.

3. - MATERIAL E MÉTODOS

3.1. - EQUIPAMENTOS

Analisador de Aminoácidos Aminochrom II
Autoclave Phoenix, mod. AV 75
Centrifuga Fanem, mod. 205 N
Cromatógrafo de Gas Van Eden, mod. 50890 A
Espectrofotômetro Micronal, mod. B-382
Espectrofotômetro UV/Vis Intralab, mod. DMS-100
Estufa de Cultivo Fabbe, mod. 116
Fluxo laminar Veco, mod. VLFS 12
Incubador com agitação New Brunswick Scientific, mod. G-25
Potenciômetro Metrohm Herisau, mod. E-512

3.2. - REAGENTES E PROCEDÊNCIA

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico, sendo que os mais específicos são listados a continuação.

Ácido 3,5- dinitrosalicílico (DNS). Merck
Agar. MicroMed
Albúmina bovina. Sigma
Álcool veratrílico. Aldrich
Amido. Vetec
Arabinose. Riedel-de Haën
Azul de Coomassie Brilhante G-250. Fluka AG
 β -Mercaptoetanol. Merck
Carboximetilcelulose (CMC). Sigma
 α - celulose. Sigma
Celobiose. Sigma
Celulose Azure. Sigma
Frutose. Merck
Glicose. Vetec
Guaiacol. Aldrich

Manose. Riedel-de Haën
 o- Dianisidina. Sigma
 Orcinol. Sigma
 Papel filtro N^o1. Whatman
 p- Nitrofenil- β -D-glicosideo (pNPG). Sigma
 p- Nitrofenil- β -D-xilosideo (pNPX). Sigma
 p- Nitrofenol. Riedel-de Haën
 Peróxido de hidrogênio. Merck
 Remazol Brilliant Blue (RBB-R). Sigma
 Sacarose. Nuclear
 Siringaldazine. Sigma
 Xilana larchwood. Sigma
 Xilose. Fluka

3.3. - MICRORGANISMO E MEIO DE CULTIVO

O fungo utilizado neste trabalho foi o termófilo *Thermoascus aurantiacus*, pertencente à classe dos Ascomicetos. Uma cepa brasileira de *T. aurantiacus* foi isolada de pilhas de cavacos de Eucaliptus sp., armazenadas nos pátios da indústria Champion Papel e Celulose, Ltda. (Mogi Guaçu, S.P.) e foi cedida pelo Professor C. G. Auer (ESALQ, Piracicaba).

T. aurantiacus (cepa brasileira), foi mantido em placas com meio agar Czapek (DIFCO, 1978) com a seguinte composição:

Agar	15,0	g/l
Sacarose	30,0	g/l
NaNO ₃	2,0	g/l
K ₂ HPO ₄	1,0	g/l
MgSO ₄	0,5	g/l
KCl	0,5	g/l
CaCl ₂	0,3	g/l
CuSO ₄ x5H ₂ O	0,10	mg/l
FeSO ₄ x7H ₂ O	0,20	mg/l
MnSO ₄	0,02	mg/l
ZnCl ₂	0,15	mg/l

O pH final do meio após esterilizar por 20 minutos a 121°C foi de 7,1. As placas agar Czapek foram inoculadas e incubadas a 50°C até obter o máximo crescimento micelial (48- 72 h).

Na otimização das condições de crescimento de *T. aurantiacus*, diferentes fontes de carbono e nitrogênio foram adicionadas em meio Czapek, na ausência de sacarose e NaNO₃.

Para o estudo da produção enzimática pelo fungo utilizou-se meio líquido Czapek, sem sacarose e sem agar (pH 7,1), e na presença de diferentes fontes de carbono. Quando especificado o pH do meio foi ajustado a 6,5 por adição de ácido. Os meios foram inoculados com uma suspensão de micélio. A suspensão foi preparada por transferência de uma alçada de micélio para um Erlenmeyer contendo 20 ml de água destilada e esterilizada; a suspensão foi agitada intensamente até dispersão total e 0,5 ml desta solução foram utilizados para inocular erlenmeyers contendo 20 ml de meio.

3.4.- ESCOLHA DE UMA FONTE DE CARBONO E NITROGÊNIO PARA *T.aurantiacus*

Na escolha de uma fonte de carbono apropriada para o crescimento de *T.aurantiacus*, foram testados: glicose, manose, frutose, arabinose, amido, xilose, xilana, sacarose, α -celulose, celobiose, casca de arroz, bagaço de cana, serragem de *Eucaliptus grandis* e serragem de *E.grandis* extraído com etanol/benzeno (Item 3.10.2). Os substratos foram adicionados ao meio agar Czapek em concentração de 1,5% (15 g/l). A fonte de nitrogênio do meio agar Czapek foi NaNO₃ (24 mEq/l).

Para escolher a melhor fonte de nitrogênio os seguintes compostos foram utilizados: NaNO₃, NH₄NO₃, NH₄H₂PO₄ e (NH₄)₂SO₄; adicionados ao meio agar Czapek em concentração de 24 mEq/l. Utilizando-se 1,5% de glicose como fonte de carbono. A velocidade de crescimento com cada substrato (fonte de carbono ou nitrogênio), foi determinada pelo método do tubo horizontal. Os ensaios foram realizados em triplicata.

A composição dos resíduos lignocelulósicos utilizados foi a seguinte :

Casca de arroz: 29,4% de lignina, 38,4% de celulose, 23,7% de hemicelulose (Durán e col., 1988).

Bagaço de cana: 19,9% de lignina, 46,0% de celulose, 24,5% de hemicelulose (Imrie e Tilbury, 1972).

Serragem de *E. grandis*: 28,0% de lignina, 53,0% de celulose, 19,0% de hemicelulose (Valores determinados neste trabalho, segundo normas ASTM, item 3.10).

3.5.- MÉTODOS UTILIZADOS NA OTIMIZAÇÃO DO CRESCIMENTO DE *T. aurantiacus*

3.5.1.- Método do Tubo Horizontal (Ryan e col., 1943)

O crescimento de *T. aurantiacus* foi determinado através da velocidade do avanço da fronteira micelial num tubo de vidro horizontal com meio apropriado. Os tubos de vidro utilizados neste ensaio tinham as seguintes dimensões : 40 cm de comprimento, 11 mm de diâmetro interno e dois extremos formando um ângulo de 45° (Figura 8). O meio de cultivo agar-Czapek e os tubos de vidro foram esterilizados separadamente por 15 minutos a 121°C. Após esterilização, 10 ml de meio foram adicionados a cada tubo e deixados em posição horizontal durante toda a noite. O inóculo, que consistiu numa alçada de micélio, foi aplicado num dos extremos do tubo. O avanço da fronteira micelial foi medido em intervalos convenientes de tempo e uma resposta linear foi obtida. A inclinação da reta obtida, correspondeu à velocidade de crescimento fúngico e foi expressa em mm/h . Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

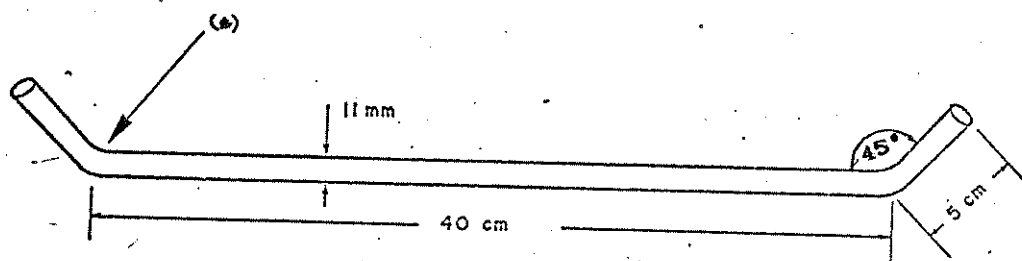


FIGURA 8: Esquema de um tubo horizontal, utilizado para o crescimento de *T. aurantiacus*. No desenho são indicadas as dimensões e o ponto de inoculação(*)

3.5.2.- Métodos Estatísticos de Otimização

Planejamento Fatorial (Box e col., 1978, Strange, 1990)

O planejamento fatorial utilizado neste trabalho foi um 2^4 , onde quatro variáveis foram estudadas em dois níveis diferentes. Da combinação de variáveis e níveis surgiu um planejamento com 16 ensaios experimentais. Com dados da literatura para temperatura, pH, concentração de carbono e nitrogênio, se estabeleceu um ponto central ou de referência para o crescimento de *T. aurantiacus*. Assim, os níveis para as variáveis do primeiro planejamento fatorial foram escolhidos com um valor acima e um valor abaixo do ponto de referência. Os efeitos principais e de interação de variáveis, foram determinados.

Método Simplex (Press e col., 1987)

Neste trabalho o simplex inicial foi definido por 4 pontos experimentais ($N=3$), sendo que os pontos corresponderam aos de maior rendimento do segundo planejamento fatorial. Em seguida deu-se início à procura dos pontos onde o *T. aurantiacus* apresentaria a maior velocidade de crescimento, através de uma sucessão de movimentos do simplex por uma rotina computacional chamada "AMOEBAS", em linguagem FORTRAN (Press e col., 1987).

3.6. - DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNA E ANÁLISE DE AMINOÁCIDOS

3.6.1. - Determinação de Proteína no Micélio

Após 10 dias de crescimento em meio líquido Czapek, 1,5% de glicose, o micélio de *T. aurantiacus* foi seco a 100°C por 4 horas para posterior análise. O micélio foi submetido a extração com 1,0 M de NaOH a 100°C durante 10 minutos. A solução resultante foi neutralizada com HCl 1,0 M e centrifugada a 2000 rpm por 15 minutos. O teor de proteínas foi quantificado no sobrenadante pelo método do Biureto.

3.6.2. - Método do Biureto (Plummer, 1978)

Para análise de proteína, 1,5 ml de Reagente do Biureto foi adicionado a 1,0 ml de solução investigada, misturou-se e aqueceu-se durante 10 minutos à 37°C. Esfriou-se à temperatura ambiente e a absorbância foi lida em 540 nm. A concentração de proteína na amostra foi determinada através de uma curva de calibração usando albumina bovina como padrão.

O reagente do Biureto foi preparado adicionando 2,6 g de $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{ H}_2\text{O}$ e 9,0 g de tartarato de Na/K a 500 ml de uma solução de NaOH 0,2 N contendo 5,0 g de KI. O volume foi completado a 1 l com uma solução de NaOH 0,2 N.

3.6.3. - Análise de Aminoácidos (Boyer, 1986)

Este método está baseado na diferença do tempo de retenção dos diversos aminoácidos quando passados por uma coluna cromatográfica. Sendo possível quantificar e identificar os diversos aminoácidos comparando-os com um padrão.

O micélio do fungo foi hidrolisado com HCl 6,0 N, na presença de β -mercaptoetanol (5,0 μl /10 ml de HCl 6,0 N), em atmosfera de nitrogênio por 24 horas e em tubo fechado. O material obtido foi seco a vácuo e posteriormente analisado em analisador de aminoácidos Aminochrom II.

3.6.4.- Método de Bradford para determinação de proteína solúvel (Bradford, 1976)

O teor de proteína solúvel no caldo de cultivo do fungo, previamente filtrado, foi determinado por adição de 5,0 ml de reagente Azul de Coomassie brilhante G-250 a 0,1 ml de caldo. Misturou-se e a absorbância foi lida a 595 nm. Uma curva de calibração com albúmina bovina foi utilizada para determinar a concentração de proteína.

O reagente Azul de Coomassie brilhante, foi preparado dissolvendo 100 mg do reagente em 50 ml de etanol 95%. Foram adicionados 100 ml de ácido fosfórico 85% p/v e a solução resultante foi diluída para um volume final de 1 l.

3.7.- ANÁLISE CROMATOGRÁFICA DO CALDO DE CULTIVO APÓS CRESCIMENTO FÚNGICO

Após 15 dias de crescimento do fungo em caldo Czapek, contendo 1,5% de glicose, em cultura estacionária e agitada, os caldos resultantes foram filtrados para posterior análise.

Os filtrados foram destilados, num sistema de destilação fracionada e os destilados obtidos foram analisados em cromatógrafo a gás Van Eden 50890A, coluna LM-100 - polietilenoglicol, utilizando nitrogênio como gás de arraste com um fluxo de 3,7 ml/min. e com detector de ionização de chama. A identificação das substâncias voláteis resultantes foi feita através de contaminação das amostras com um padrão externo.

3.8. - DETERMINAÇÕES ENZIMÁTICAS

A produção enzimática por *T.aurantiacus* foi determinada em meio líquido Czapek (sem sacarose), cultura estacionária, 50°C, utilizando os seguintes substratos de crescimento: α -celulose, glicose, xilana, serragem de *E.grandis* (com e sem fonte de carbono adicional), cavacos de *E.grandis* e casca de arroz. Todos os substratos foram adicionados ao meio líquido em concentração de 1,5%, exceto xilana, utilizada em concentração de 1,0%. A glicose foi utilizada em diferentes concentrações (0,2, 0,5, 1,0 e 1,5%), com e sem agitação no estudo da produção enzimática.

As culturas foram realizadas em triplicata, em Erlenmeyers de 125 ml com 20 ml de meio. O tempo de incubação variou entre 12 ou 15 dias, e os caldos de cultivo foram analisados em intervalos de tempo. O caldo de cultivo foi filtrado para separar o micélio fúngico, através de filtro millipore, e nos filtrados resultantes foram determinadas as atividades enzimáticas.

3.8.1. - Método com "Celulose azure" (Poincelot e Day, 1972)

A "celulose-azure" é uma celulose ligada ao corante Remazol Brilliant Blue R (RBB-R). Usando-a como substrato de crescimento é possível observar de forma qualitativa (meio sólido) ou de forma quantitativa (medindo a absorbância em meio líquido) a liberação de corante, à medida que a ligação entre a celulose e o corante vai sendo hidrolizada pelas celulases extracelulares do microorganismo.

T.aurantiacus foi cultivado em meio líquido Czapek, contendo 0,1 % de "celulose azure" como única fonte de carbono. A incubação foi realizada a 50°C, em cultura estacionária, e as amostras foram analisadas a intervalos convenientes de tempo. Os caldos foram centrifugados e a absorbância lida em 595 nm.

3.8.2.- Atividade em papel filtro (FPA) (Mandels e col., 1976)

Através deste ensaio é possível medir a atividade celulolítica total de um caldo de cultivo ou de uma solução de enzima, quando esta atua sobre um material celulósico padrão (papel filtro Whatman N^o1).

Um volume de 0,5 ml de caldo filtrado e 1,0 ml de tampão citrato 0,05 M pH 4,8 foram adicionados num tubo com tampa de rosca contendo uma tira de papel filtro Whatman N^o1, de 1x6 cm. Após 1 hora de incubação à 50^oC, os açúcares liberados foram determinados pelo método do DNS (item 3.9). Uma unidade de atividade em papel filtro corresponde a 1 μ mol de açúcares redutores, expressos como glicose, liberados por minuto.

3.8.3.- Atividade Endo-1,4- β -D- Glicanase (Mandels e col., 1976)

Este ensaio mede os açúcares liberados de uma celulose solúvel, após a ação de endo-glicanase. A 0,5 ml de uma solução 1,0% de carboximetilcelulose (CMC) em tampão citrato 0,5 M pH 4,8 foram adicionados 0,5 ml de caldo de cultivo filtrado. A mistura foi incubada por 30 minutos à 50^oC e os açúcares liberados foram determinados pelo método do DNS. Uma unidade de atividade endo-1,4- β -glicanase corresponde a quantidade de enzima que libera 1 μ mol de açúcares redutores, expressos como glicose, por minuto.

3.8.4.- Atividade β -Glicosidase e β -xilosidase (Tan e col., 1987)

O método utiliza p-nitrofenil- β -D-glicosídeo (pNPG) como substrato para atividade β -glicosidase e p-nitrofenil- β -xilosídeo (pNPX) para atividade β -xilosidase. Para a determinação da atividade 0,1 ml de caldo filtrado e 0,4 ml de uma solução 0,2% (p/v) de pNPG ou pNPX, em 50 mM de tampão acetato de sódio (pH 4,8), foram incubados a 50^oC durante 30 minutos. Após incubação, a reação foi interrompida pela adição de 1,0 ml de uma solução 10% (p/v) de bicarbonato de sódio. O p-nitrofenol liberado foi medido por absorvância em 410 nm, e comparado com uma curva de calibração

com p-nitrofenol. Uma unidade de atividade β -glicosidase ou β -xilosidase corresponde a quantidade de enzima que libera 1 μ mol de p-nitrofenol por minuto.

3.8.5.- Atividade Xilanase (Khandke e col., 1989a)

A atividade xilanase foi determinada utilizando xilana "larchwood" como substrato. A mistura de reação continha 0,5 ml de caldo filtrado e 0,5 ml de uma solução 1,0 % de xilana em tampão acetato de sódio 50 mM (pH 5,0). Após 30 minutos de incubação a 50°C, os açúcares liberados foram determinados pelo método do DNS. Uma unidade de atividade xilanase corresponde a quantidade de enzima que libera 1 μ mol de açúcares redutores, expressos como xilose, a partir de xilana, por minuto.

3.8.6.- Descoloração de "Remazol Brilliant Blue" (Ulmer e col., 1984)

Este método baseia-se na degradação do corante Remazol brilliant blue (RBB-R) com concomitante perda da cor. O método consistiu em adicionar 100 μ l de uma solução de RBB, 2,0%, a 10 ml de cultura a diferentes tempos depois de iniciada a incubação. Após 1 hora à temperatura ambiente a cultura foi filtrada e 100 μ l do filtrado foram diluídos para 1,0 ml com água destilada. Em seguida foram medidas as absorvâncias à 585 e 500 nm. O resultado foi expresso segundo a seguinte fórmula:

$$\Delta \text{ RAZÃO DE ABSORBÂNCIA} = \text{ABS } 585/500 \text{ (branco)} - \text{ABS } 585/500 \text{ (amostra)}$$

A razão da absorvância do branco foi obtida utilizando meio de cultivo não inoculado.

3.8.7.- Atividade Ligninase por oxidação de álcool veratrílico (Tien e Kirk, 1984)

Para a determinação da atividade ligninase, foram adicionados 550 μ l de caldo de cultivo filtrado e 200 μ l de H_2O_2 2,0 mM a 250 μ l de uma solução de álcool veratrílico 8,0 mM, em tampão tartarato de sódio 0,4 M (pH 3,0). O aparecimento do aldeído veratrílico foi determinado lendo-se a absorbância a 310 nm ($\epsilon = 9.300 M^{-1}.cm^{-1}$). Uma unidade de ligninase corresponde a quantidade de enzima que oxida 1,0 μ mol de álcool veratrílico por minuto.

3.8.8.- Atividade Fenol oxidase (Szklarz e col., 1989)

A atividade fenol oxidase foi determinada como lacase, utilizando siringaldazine ou o-dianisidina, como substratos enzimáticos de acordo com o método de Szklarz e colaboradores (1989).

A atividade lacase foi determinada espectrofotometricamente, pela oxidação de siringaldazine até sua forma quinona em 525 nm ($\epsilon = 65000 M^{-1}.cm^{-1}$). A mistura de reação continha, em 1,0 ml, 0,4 ml de tampão tartarato 0,4 M (pH 3,0), 0,1 ml de uma solução 1 mM de siringaldazine em etanol e caldo filtrado. Uma unidade de atividade lacase corresponde a quantidade de enzima necessária para oxidar 1 μ mol de substrato por minuto.

Quando o-dianisidina foi utilizada como substrato enzimático, a mistura de reação continha num volume total de 3,0 ml, 1,0 ml de caldo filtrado, 1,5 ml de o-dianisidina 1,0 mM e 0,3 ml de tampão tartarato 0,4 M (pH 3,0). A atividade foi medida pela absorção de o-dianisidina oxidada a 460 nm ($\epsilon = 29400 M^{-1}.cm^{-1}$).

3.9. - DETERMINAÇÃO DE AÇÚCARES REDUTORES

3.9.1. - Método do DNS (Miller, 1959)

Para a determinação de açúcares redutores 3,0 ml de reagente DNS foram adicionados a 1,5 ml de amostra. A mistura foi incubada num banho de água à 100°C por 5 minutos. Esfriada a temperatura ambiente e a absorbância foi lida a 550 nm e comparada com uma curva padrão.

Quando a atividade celulolítica foi estudada a curva de calibração foi feita com glicose como padrão, principal açúcar redutor resultante da ação de celulases. Quando a atividade xilanase foi determinada, a curva de calibração foi feita com xilose como padrão, principal açúcar redutor resultante da atividade de xilanases.

O reagente do DNS foi preparado dissolvendo em 1,4 l de água os seguintes compostos :

Ácido 3,5-dinitrosalicílico	10,6 g
NaOH	19,8 g
KNaC ₄ H ₄ O ₆	306,0 g
Fenol	7,6 ml
Bissulfito de sódio	8,3 g

3.10. - ANÁLISE DA MADEIRA DE *Eucalyptus grandis* TRATADA COM *T. aurantiacus*

Amostras de serragem (45 mesh) e cavacos de *Eucalyptus grandis* (7 anos), foram incubadas com o fungo *T. aurantiacus*. As incubações foram realizadas em Erlenmeyers de 500 ml que continham 2,0 g de serragem ou 2,5 g de cavacos (3 a 4 cavacos de 1x2 cm), caldo Czapek com 0,3, 0,5 ou 1,0 % de glicose como fonte de carbono adicional a pH 6,5 ajustado com HCl 1,0 M. As madeiras, serragem e cavacos, foram esterilizadas separadamente do caldo Czapek, a 100°C sob 1 atm por 15 minutos. Em seguida cada Erlenmeyer foi inoculado com 10 ml de uma suspensão homogênea de micélio em água destilada. Controles foram preparados da mesma

forma que as amostras anteriores, não contendo o inóculo. As incubações foram realizadas a 50°C, sem agitação, durante 21 dias.

No fim da incubação as culturas foram tratadas com nitrogênio líquido para separar o micélio da madeira, no caso da utilização de serragem. Em seguida, serragem e cavacos foram lavados várias vezes com água destilada. Após lavados, os cavacos foram moidos e peneirados. Foi utilizada a madeira moída que passou por malha de 45 mesh e foi retida em malha de 60 mesh.

As madeiras, livres de fungo, foram secas a 100°C durante uma noite. A madeira obtida no final do processo foi analisada quanto a perda de peso, teor de extrativos, lignina, celulose e hemicelulose, e índice de degradação. As culturas e as análises foram feitas em triplicata.

3.10.1. - Perda de Peso

A perda de peso nas amostras inoculadas foi determinada como a diferença de peso da madeira seca no início do tratamento e a madeira seca no fim do tratamento, após separar a madeira do micélio fúngico. A perda de peso no controle foi descontada da perda de peso nas amostras inoculadas.

3.10.2. - Determinação de Extrativos (ASTM Methods, 1966a)

Uma amostra de 100 mg de madeira, foi colocada num cartucho de papel filtro e posteriormente dentro de um extrator Soxhlet. Extraiu-se por 4 horas com uma mistura etanol/benzeno (1:2), para remover resinas, óleos, graxas e ceras. Em seguida extraiu-se com uma solução de etanol 95 %, por 4 horas ou até a perda de cor da solução, para remover taninos e catecóis. O cartucho de papel contendo a madeira foi retirado do soxhlet e seco ao ar. Finalmente a amostra foi extraída com água a 100°C por 3 horas para remover materiais solúveis restantes. O material resultante foi seco durante uma noite a 100°C e pesado.

A perda de extrativos, igualmente aos demais componentes, foi calculada da seguinte forma :

$$\% \text{ Perda Componente} = \frac{m \text{ componente inicial} - m \text{ componente final}}{m \text{ componente inicial}}$$

onde :

m componente inicial = Massa madeira inicial x %componente inicial

m componente final = Massa madeira final x % componente final

3.10.3. - Determinação de Celulose (Pereira e Sardinha, 1984)

O método consiste na solubilização de lignina e hemicelulose da madeira com uma mistura de $\text{HNO}_3/\text{CH}_3\text{COOH}$ (9,0 ml de HNO_3 concentrado + 73,0 ml de CH_3COOH 80 %, completada para 100 ml com água destilada). Uma amostra de 100 mg de madeira foi tratada com 2,5 ml da mistura $\text{HNO}_3/\text{CH}_3\text{COOH}$ a 100°C durante 45 minutos. O material resultante foi filtrado em cadinho de vidro sinterizado, previamente tarado, seco a 100°C durante uma noite e finalmente pesado.

O teor de celulose foi determinado como :

$$\% C = \frac{P_2}{P_1} \times 100\%$$

onde : C = % de celulose

P_1 = Peso seco inicial (g)

P_2 = Peso do resíduo seco (g)

3.10.4. - Determinação de Hemicelulose

O teor de hemicelulose foi calculado como : $100\% - (\text{lignina} + \text{celulose})$.

3.10.5. - Determinação de lignina Klason (ASTM Methods, 1966b)

O método consiste na determinação de lignina na madeira utilizando H_2SO_4 72% (66,5% v/v); este ácido, como outros ácidos fortes, hidrolisa os carboidratos da madeira deixando um resíduo insolúvel denominado lignina Klason.

Aproximadamente 200 mg de madeira moída, seca e previamente extraída, foram tratadas com 3,0 ml de H_2SO_4 72% durante 2 horas a $19 \pm 1^\circ\text{C}$, sob agitação constante. A solução de ácido no resíduo resultante foi diluída para uma concentração final de 3,0% por adição de água destilada e posteriormente colocada sob refluxo por 2 horas. Finalmente, o material resultante foi transferido quantitativamente para um cadinho filtrante, previamente seco e tarado, e lavou-se com aproximadamente 100 ml de água destilada quente. O material foi seco em estufa a 100°C durante uma noite ou até peso constante.

O teor de lignina Klason foi determinado da mesma forma que para celulose.

3.10.6. - Determinação do Índice de Degradação (ASTM Methods, 1966c)

O índice de degradação ou decaimento (Rot-index) foi obtido como a porcentagem de substâncias solúveis em uma solução de NaOH 1,0%. Uma amostra de madeira, 100 mg, foi tratada com 5,0 ml de NaOH 1,0%, a 100°C durante 1 hora, com agitação em Vortex aos 10, 15 e 25 minutos após iniciado o tratamento. O material resultante foi filtrado em cadinho, previamente seco e tarado, lavado com 5,0 ml de uma solução de CH_3COOH 10% e posteriormente lavado com 100 ml de água quente. O cadinho mais o resíduo, secos durante uma noite a 100°C , foram pesados.

A solubilidade em NaOH 1,0% foi determinada através de:

$$\% \text{ Solubilidade em NaOH 1,0\%} = \frac{P_1 - P_2}{P_1} \times 100$$

onde : P_1 = Peso madeira seca (g)

P_2 = Peso madeira seca tratada com NaOH 1,0% (g)

4. - RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. - CRESCIMENTO DE *Thermoascus aurantiacus*

Thermoascus aurantiacus cresceu em meio agar Czapek que continha sacarose ou glicose como fonte de carbono (3,0%), a 50°C em condições aeróbicas. O micélio do fungo, após 24 horas ocupou toda a superfície da placa de Petri (de 10 cm de diâmetro). No início do cultivo, o micélio apresentava-se branco, tornando-se marrom a marrom escuro após 4-5 dias de crescimento. Um crescimento ativo foi observado entre 24 horas e o terceiro dia de cultivo, tempo durante o qual a cor do micélio era branca. A preparação dos inóculos neste estudo foi feita utilizando sempre uma placa de 72 horas de cultivo (micélio branco).

4.1.1. - OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO DE *T. aurantiacus*

- QUANTIFICAÇÃO DO CRESCIMENTO DE *T. aurantiacus*

No estudo do crescimento de *T. aurantiacus* foi utilizado o método do tubo horizontal (como descrito no item 3.5.1, de Material e Métodos), no qual o avanço da fronteira micelial foi medido em função do tempo.

Observou-se que quando o cultivo do fungo foi feito em meio Czapek a 50°C, o método do tubo horizontal apresentou uma resposta linear do crescimento em função do tempo, entre 25 e 130 horas (Figura 9). Assim, a velocidade de crescimento fúngico (mm/h), foi obtida da inclinação da reta no intervalo de tempo mencionado.

É importante ressaltar que este método relaciona linearmente o avanço da fronteira micelial com o tempo, e não a produção de massa fúngica com o tempo (relação esta que poderia ser não linear).

Aplicando o método do tubo horizontal, foram escolhidas experimentalmente as melhores fontes de carbono e nitrogênio para o crescimento do fungo (Tabelas 2 e 3), e posteriormente as condições de cultivo do fungo foram otimizadas, quanto a

temperatura, pH e concentração de fontes de carbono e nitrogênio (Tabelas 4-10).

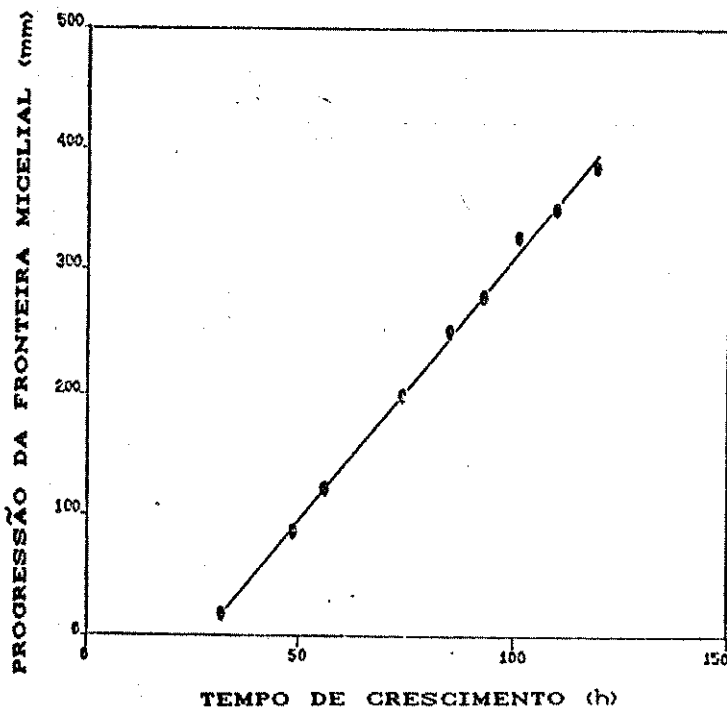


FIGURA 9: Linearidade do método do Tubo Horizontal. Progressão da fronteira micelial de *T. aurantiacus* contra o tempo. Condições de crescimento em meio agar-Czapek: 1,0 % de glicose, 24 mEq/l de NaNO_3 , pH 6,8 e 50°C .

- ESCOLHA DE UMA FONTE DE CARBONO E NITROGÊNIO PARA *T. aurantiacus*

Na escolha da melhor fonte de carbono para o fungo, diferentes substratos foram adicionados ao meio Czapek (sem sacarose), em concentração de 1,5% (p/v) (15 g/l), utilizando 24 mEq/l de NaNO_3 como fonte de nitrogênio (Tabela 2). Os resultados obtidos revelam a capacidade de *T. aurantiacus* crescer sobre uma ampla variedade de substratos, que incluem desde carboidratos como glicose, sacarose, frutose, xilose, amido, etc., até substratos lignocelulósicos como casca de arroz, serragem de *E. grandis* e bagaço de cana. Esta observação sugere a produção de um amplo espectro de atividades enzimáticas por parte do fungo, tais como

celulases, amilases, xilanases, ligninases, etc.. A alta eficiência relativa de crescimento observada (acima de 50%), quando serragem, casca de arroz e outros, foram utilizados como únicas fontes de carbono no meio, reforça esta ideia (Tabela 2).

TABELA 2 : CRESCIMENTO DE *T. aurantiacus* EM DIFERENTES FONTES DE CARBONO

SUBSTRATO(1,5%) ¹	VELOCIDADE DE CRESCIMENTO(mm/h)	EFICIÊNCIA(%)
Glicose	3,98 ± 0,04	100
Amido	3,89 ± 0,01	97,7
Frutose	3,82 ± 0,02	95,9
Manose	3,40 ± 0,50	85,4
Arabinose	3,22 ± 0,40	80,9
Xilose	3,17 ± 0,03	79,6
Casca de arroz	2,98 ± 0,20	74,9
Serragem Eucaliptus grandis	2,48 ± 0,08	62,3
Sacarose	2,29 ± 0,07	57,5
Serragem Eucaliptus grandis extraída ²	2,07 ± 0,07	52,0
Bagaço de cana	2,06 ± 0,10	51,8
Xilana	2,00 ± 0,09	50,3
α-Celulose	1,75 ± 0,40	43,9
Celobiose	0,66 ± 0,09	16,6
Controle ³	0,00	----

Cada valor corresponde a media de três medidas ± desvio

1: O substrato foi adicionado ao meio Czapek (sem sacarose), pH 7,1, 24 mEq/l de NaNO₃. As culturas foram incubadas a 50°C

2: Serragem de Eucaliptus grandis extraída com etanol/benzeno

3: Meio agar Czapek sem fonte de carbono

A eficiência relativa de crescimento foi maior com substratos lignocelulósicos do que com substratos celulósicos. O conteúdo de lignina nos substratos lignocelulósicos aqui utilizados, acha-se na seguinte ordem: casca de arroz (29,4%) > serragem de *E. grandis* (28,0%) > bagaço de cana (19,9%). A velocidade de crescimento nestes substratos acha-se na mesma ordem, sendo 2,98, 2,48 e 2,06, respectivamente (Tabela 2).

T. aurantiacus, utilizou com ótima eficiência para seu crescimento os açúcares manose, arabinose e xilose, principais constituintes de hemicelulose. Ao contrário, α -celulose e celobiose foram pobremente utilizadas pelo fungo para seu crescimento. Uma diferença de 10% na velocidade de crescimento foi obtida quando serragem tratada e não tratada foi utilizada como substrato de crescimento. Observou-se que quando os extrativos foram retirados da madeira de *E. grandis* com etanol/benzeno (Item 3.10.2 de Material e Métodos), a velocidade de crescimento do fungo diminuiu. Isto indica que as substâncias extraídas desempenharam algum papel relevante, não inibitório, no crescimento de *T. aurantiacus*.

Na presença de glicose, fonte de carbono preferencial da maioria dos fungos (Moore-Landecker, 1972), *T. aurantiacus* apresentou a maior velocidade de crescimento (3,98 mm/h). Portanto, a glicose substituiu a sacarose do meio Czapek original (Item 3.3 de Material e Métodos).

As diferentes fontes de nitrogênio foram testadas numa concentração de 24 mEq/l, em meio Czapek (pH 7,1), contendo glicose (1,5%) (Tabela 3). A velocidade de crescimento do fungo foi similar nos meios que continham nitrato como fonte de nitrogênio, aos que continham amônio. Porém, a máxima velocidade de crescimento (3,22 mm/h), foi obtida com NaNO_3 . Contrariamente ao experimento na ausência de uma fonte de carbono (Tabela 2), observou-se que quando nenhuma fonte de nitrogênio foi adicionada, ao meio o fungo era capaz de crescer, embora com uma velocidade de apenas 0,50 (mm/h).

Tendo escolhido a glicose e o NaNO_3 como as melhores fontes de carbono e nitrogênio respectivamente, deu-se continuidade à otimização das condições de crescimento para *T. aurantiacus*.

TABELA 3: CRESCIMENTO DE *T.aurantiacus* EM DIFERENTES FONTES DE NITROGÊNIO

SUBSTRATO (24 mEq/l) ¹	VELOCIDADE DE CRESCIMENTO (mm/h)
NaNO ₃	3,22 ± 0,40
NH ₄ NO ₃	2,83 ± 0,30
NH ₄ H ₂ PO ₄	2,52 ± 0,05
(NH ₄) ₂ SO ₄	2,34 ± 0,07
Controle ²	0,50 ± 0,06

Cada valor corresponde a media de três medidas ± desvio

1: O substrato foi adicionado ao meio Czapek, 1,5 % glicose, pH 7,1. As culturas foram incubadas a 50°C.

2: Meio agar Czapek sem fonte de nitrogênio

- APLICAÇÃO DE MÉTODOS ESTATÍSTICOS NA OTIMIZAÇÃO

A otimização de um meio mínimo para o crescimento da cepa brasileira de *T.aurantiacus*, foi feita através da aplicação de métodos estatísticos. Estes métodos foram preferidos aos métodos clássicos de otimização (onde uma variável independente é modificada enquanto as outras são fixadas), devido a que os métodos clássicos geralmente resultam ser extremamente laboriosos e demorados, principalmente para um número grande de variáveis em estudo. Além disso, frequentemente não garantem a determinação das condições ótimas (Greasham e Inamine, 1986).

Um método estatístico, o planejamento fatorial, foi aplicado com o objetivo de definir uma região aproximada onde o *T.aurantiacus* apresentasse uma boa velocidade de crescimento. Além disso, o planejamento fatorial permitiu determinar o efeito de cada variável sobre o crescimento do fungo, e a existência de interação entre as variáveis (Strange, 1990).

Numa primeira etapa da otimização das condições de crescimento para *T.aurantiacus*, um planejamento fatorial 2⁴ foi realizado (quatro variáveis independentes em dois níveis diferentes). As variáveis em estudo foram : temperatura (°C), pH, concentração de glicose (%) e concentração de NaNO₃ (mEq de N/l).

Cada variável foi estudada em dois níveis diferentes (Tabela 4).

Para iniciar o planejamento fatorial foi necessário definir um ponto central ou de referência, com dados obtidos da literatura, sobre as condições de crescimento de cepas de *T.aurantiacus*, diferentes da cepa brasileira (Tansey, 1971; Rosenberg, 1975). Sob as condições mostradas na Tabela 4, para o ponto central, foram preparados os tubos de crescimento horizontal, obtendo-se uma velocidade de crescimento de $3,93 \pm 0,2$ (mm/h), para a cepa brasileira de *T.aurantiacus*. Este valor correspondeu ao rendimento no ponto ou de referência para o começo da otimização, onde supõe-se, existir o máximo rendimento. A escolha dos diferentes níveis das variáveis em estudo, foi feita como descrito em material e métodos (Item 3.5.2).

TABELA 4: DEFINIÇÃO DE VARIÁVEIS E NÍVEIS PARA O PRIMEIRO PLANEJAMENTO FATORIAL 2^4

VARIÁVEL	NÍVEL		PONTO CENTRAL ¹
	(+)	(-)	
Temperatura (°C)	55,0	45,0	50,0
pH	7,8	5,8	6,8
Concentração Glicose(%)	1,5	0,5	1,0
Concentração NaNO ₃ (mEq/l)	44,0	4,0	24,0

1: Valores obtidos da literatura (Tansey, 1971; Rosenberg, 1975)

O primeiro planejamento fatorial 2^4 foi desenvolvido, obtendo-se os valores de velocidade de crescimento mostrados na tabela 5. A partir dos valores da tabela 5, obteve-se a tabela 6, onde são mostrados o efeito de cada variável sobre a velocidade de crescimento e o efeito de interação de duas variáveis (obtidos de acordo com o item 3.5.2, de Material e Métodos, página 33).

A tabela 5 mostra a proximidade do ponto central, onde a velocidade foi de 3,93 (mm/h), após o primeiro planejamento fatorial, pela obtenção de velocidades de crescimento de 3,46 e 3,49 (mm/h) (Experiências 13 e 16).

TABELA 5 : RESULTADOS DO PRIMEIRO PLANEJAMENTO FATORIAL 2⁴

EXPERIÊNCIA	T	pH	C	N	RENDIMENTO ¹
1	+	+	+	+	2,51 ± 0,18
2	+	+	+	-	0,66 ± 0,08
3	+	+	-	-	1,72 ± 0,16
4	+	+	-	+	0,82 ± 0,15
5	+	-	+	+	1,65 ± 0,03
6	+	-	+	-	0,76 ± 0,03
7	+	-	-	-	1,45 ± 0,07
8	+	-	-	+	2,07 ± 0,08
9	-	+	+	+	2,76 ± 0,15
10	-	+	+	-	2,63 ± 0,02
11	-	+	-	-	1,73 ± 0,07
12	-	+	-	+	1,07 ± 0,17
13	-	-	+	+	3,46 ± 0,04
14	-	-	+	-	2,91 ± 0,09
15	-	-	-	-	2,95 ± 0,01
16	-	-	-	+	3,49 ± 0,01

1: Velocidade de crescimento ± desvio (mm/h)

Nota: As letras T, C e N, correspondem as variáveis temperatura, concentração de glicose e concentração de NaNO₃, respectivamente, em seus níveis (+) e (-).

TABELA 6 : EFEITOS PRINCIPAIS E EFEITO DA INTERAÇÃO DE VARIÁVEIS PARA O PRIMEIRO PLANEJAMENTO FATORIAL 2^4

EFEITO	VALOR CALCULADO
Efeitos principais	
Temperatura (T)	- 1,17
pH	- 0,61
Concentração glicose (C)	0,26
Concentração NaNO ₃ (N)	0,31
Interação de 2 variáveis	
T*pH	0,55
T*C	- 0,38
T*N	0,24
pH*C	0,55
pH*N	- 0,27
C*N	0,48

A Tabela 6 mostra que a variação de temperatura e pH teve um efeito superior sobre a velocidade de crescimento do fungo que a variação da concentração de glicose e NaNO₃. Segundo Box e colaboradores (1978), a variação de uma variável ou a interação de duas ou mais variáveis, não tem efeito sobre a velocidade de crescimento quando o valor calculado desse efeito for zero ou um valor muito próximo de zero (<0,1). Ao mesmo tempo, quando o valor calculado de um efeito apresentar sinal negativo, significa que quando a variável em estudo passa de um nível inferior (-) a outro superior (+), o rendimento diminui (Strange, 1990).

Os resultados da tabela 6 mostram que a velocidade de crescimento de *T. aurantiacus*, teve uma tendência a diminuir quando a temperatura e o pH aumentaram (sinal negativo para o efeito de ambas variáveis). Isto pode ser confirmado voltando-se a tabela 5, onde os maiores rendimentos encontraram-se no nível (-) (45°C). O mesmo foi observado com a variação do pH. Porém, a tabela 6 mostrou que as variáveis em estudo não podem ser interpretadas independentemente, já que existe uma interação entre elas, sendo

as mais importantes T*pH, pH*C e C*N.

O fato de existir interação entre as variáveis, indica que a velocidade de crescimento de *T.aurantiacus* é afetada pela variação da temperatura de cultivo, pelo pH do meio e pela concentração de glicose e nitrogênio, em forma simultânea, ou seja não existe independência entre as variáveis. Assim por exemplo, a existência da interação T*pH, indica que a velocidade de crescimento em função do pH sera diferente em diferentes temperaturas. Isto traz como consequência a impossibilidade de otimizar as condições de cultivo para *T.aurantiacus* modificando uma variável por vez, enquanto as outras mantem-se fixas.

Um segundo planejamento fatorial foi aplicado, com o objetivo de uma maior aproximação da região de máximo crescimento para o fungo. Os dados da tabela 7, correspondem aos novos níveis definidos para o segundo planejamento fatorial. Os novos níveis foram definidos entre o ponto central e os níveis do primeiro planejamento fatorial. Por exemplo, para a variável temperatura o novo nível superior (+), definiu-se entre 50 e 55°C.

TABELA 7 : DEFINIÇÃO DE NÍVEIS PARA O SEGUNDO PLANEJAMENTO FATORIAL 2⁴

VARIÁVEL	NÍVEL	
	(+)	(-)
Temperatura (°C)	53,0	48,0
pH	7,3	6,3
Concentração glicose(%)	1,2	0,7
Concentração NaNO ₃ (mEq/l)	34,0	14,0

As velocidades de crescimento para *T. aurantiacus*, aumentaram no segundo planejamento fatorial, alcançando valores de 3,91 e 4,05 (mm/h), similares e até superiores à do ponto central (3,93 mm/h). Os maiores valores de velocidade de crescimento foram observados no nível (-) da temperatura, 48°C (Tabela 8). Os efeitos de cada variável e da interação das variáveis sobre a velocidade de crescimento, foram determinados, com o objetivo de estudar os efeitos das diferentes variáveis nesta nova região, mais próxima do ponto central (Tabela 9).

TABELA 8 : RESULTADOS DO SEGUNDO PLANEJAMENTO FATORIAL 2⁴

EXPERIÊNCIA	T	pH	C	N	RENDIMENTO
1	+	+	+	+	1,67 ± 0,06
2	+	+	+	-	1,81 ± 0,11
3	+	+	-	-	1,52 ± 0,13
4	+	+	-	+	1,06 ± 0,01
5	+	-	+	+	2,08 ± 0,12
6	+	-	+	-	2,65 ± 0,03
7	+	-	-	-	2,32 ± 0,19
8	+	-	-	+	2,83 ± 0,21
9	-	+	+	+	3,07 ± 0,04
10	-	+	+	-	2,85 ± 0,07
11	-	+	-	-	2,74 ± 0,05
12	-	+	-	+	2,56 ± 0,07
13	-	-	+	+	3,91 ± 0,05
14	-	-	+	-	3,87 ± 0,04
15	-	-	-	-	2,91 ± 0,02
16	-	-	-	+	4,05 ± 0,06

TABELA 9 : EFEITOS PRINCIPAIS E EFEITO DE INTERAÇÃO DE VARIÁVEIS PARA O SEGUNDO PLANEJAMENTO FATORIAL 2^4

EFEITO	VALOR CALCULADO
Efeitos Principais	
Temperatura (T)	-1,250
pH	-0,920
Concentração glicose (C)	0,240
Concentração NaNO_3 (N)	0,071
Interação de 2 variáveis	
T*pH	-0,036
T*C	-0,119
T*N	-0,230
pH*C	0,140
pH*N	-0,210
C*N	-0,180

Os efeitos da temperatura e o pH continuaram sendo os mais importantes, ao mesmo tempo o efeito da concentração de NaNO_3 , que foi baixo após o primeiro planejamento fatorial, não esteve presente após o segundo planejamento. Isto indica que uma variação entre 14 e 34 mEq/l de NaNO_3 não afeta a velocidade de crescimento do fungo, devido a proximidade do ponto central. O efeito da interação de variáveis sobre a velocidade de crescimento, diminuiu quando comparado com o do primeiro planejamento fatorial (Tabela 9).

A diminuição do efeito da interação de variáveis no segundo planejamento fatorial, foi o resultado da maior aproximação do ponto central. Por tanto, pode-se afirmar que o segundo planejamento, definiu uma região ótima para o crescimento de *T. aurantiacus*, onde a variação das variáveis concentração de glicose e nitrogênio não afeta a velocidade de crescimento. Ao contrário, temperatura e pH, continuaram tendo um efeito importante. As maiores velocidades de crescimento continuaram apresentando-se nos níveis inferiores (-) de temperatura e pH

(48°C e 6,3, respectivamente).

Na região de ótimo crescimento, obtida do segundo planejamento fatorial, foi procurado o ponto de máximo crescimento através do método simplex. O andamento do simplex foi feito de acordo com o item 3.5.2 (Material e Métodos). O simplex inicial foi construído com os quatro melhores rendimentos da tabela 8. Na aplicação deste método a variável temperatura foi fixada em 48°C, já que nesta temperatura foram obtidas as maiores velocidades de crescimento. O simplex inicial, foi definido por (N+1) pontos experimentais, com N=3.

As velocidades de crescimento experimentais obtidas através dos pontos gerados pelo simplex (Tabela 10), foram, em todos os casos, maiores que as obtidas após o segundo planejamento fatorial (Tabela 8) e maiores que a velocidade de crescimento no ponto central (3,93 mm/h).

TABELA 10: DEFINIÇÃO DO SIMPLEX INICIAL E NOVOS PONTOS GERADOS PELO SIMPLEX COM SEUS RESPECTIVOS RENDIMENTOS

PONTO SIMPLEX	pH	C	N	RENDIMENTO (mm/h)
INICIAL ¹	7,30	1,20	34,0	3,07 ±0,04
	6,30	1,20	14,0	3,87 ±0,04
	6,30	1,20	34,0	3,91 ±0,05
	6,30	0,70	34,0	4,05 ±0,06
1 ²	6,80	1,45	34,0	4,20 ±0,30
2	5,55	1,08	24,0	4,55 ±0,05
3	4,68	1,01	19,0	4,11 ±0,10
4	6,18	1,01	49,0	4,34 ±0,10
5	6,11	0,92	36,5	4,67 ±0,10
6	6,00	0,78	37,8	4,740 ±0,02

1: O simplex inicial (figura geométrica), foi definido por (N+1) pontos experimentais, com N=3

2: Pontos experimentais gerados pelo andamento do simplex

Os valores extremos de pH (6,8 e 4,88), gerados pelo simplex, resultaram nos menores rendimentos para velocidade de crescimento. Consistente com os dados da tabela 9, o efeito da concentração de NaNO_3 sobre a velocidade de crescimento parece não ser muito importante, assim, ao passar de um valor inferior de 19 mEq/l para um superior de 49 mEq/l, a velocidade de crescimento foi de 4,11 a 4,34 (mm/h). Indicando a existência de uma região dentro do intervalo de concentrações de NaNO_3 , onde o crescimento do fungo foi ótimo. A existência de interação entre as variáveis, embora seja pequena perto do ponto central, não pode deixar de ser considerada na interpretação dos resultados.

Os dois últimos pontos gerados pelo simplex, resultaram nos maiores rendimentos para velocidade de crescimento. Observou-se que nestes pontos a variação de um nível para outro, para cada variável, foi mínima. Considerando esta observação e o fato de que, com a aplicação do simplex, a velocidade de crescimento para *T. aurantiacus* superou a velocidade no ponto central (3,93 mm/h), o simplex foi detido no sexto ponto. É importante ressaltar que como resultado da continuação do andamento do simplex, pode-se chegar a obter velocidades de crescimento superiores às já obtidas, porém, novos pontos gerados pelo simplex não deverão ser muito diferentes dos da tabela 10. Por tanto, os últimos valores para as variáveis temperatura, pH, concentração de glicose e NaNO_3 , gerados pelo simplex podem ser considerados como as condições de máximo crescimento para a cepa brasileira de *T. aurantiacus* (Tabela 11).

A velocidade de crescimento obtida nas condições ótimas foi de $4,74^{+0,02}$ (mm/h), 1,2 vezes maior que a velocidade de crescimento no ponto central ($3,93^{+0,2}$ mm/h), obtida experimentalmente a partir de dados da literatura (Tabela 4, página 49).

TABELA 11: CONDIÇÕES PARA O ÓTIMO CRESCIMENTO DE *T. aurantiacus*¹

VARIÁVEL	VALOR ÓTIMO ²
Temperatura (°C)	48,0
pH	6,0
Concentração glicose (%)	0,8 ³
Concentração NaNO ₃ (mEq/l)	37,8 ³

1: Meio de cultivo agar-Czapek (1,5% agar).

2: Velocidade de crescimento neste ponto: $4,74 \pm 0,02$ mm/h

3: 8,0 g/l de glicose e 3,2 g/l de NaNO₃

Através de 32 experiências (primeiro e segundo planejamentos fatoriais), realizadas em duas semanas, foi possível determinar a região de ótimo crescimento para *T. aurantiacus*. O efeito de quatro variáveis foi estudado simultaneamente, utilizando quatro valores diferentes para cada variável (Ex.: A temperatura foi estudada em 45, 53, 55 e 48°C). Altos rendimentos foram obtidos após o segundo planejamento fatorial (Tabela 8). O efeito da interação de variáveis diminuiu no segundo planejamento, quando comparado com o primeiro, indicando a aproximação de um ponto de máximo rendimento. Com os melhores resultados do segundo planejamento, foi aplicado o método simplex, com o objetivo de alcançar o ponto de máximo rendimento. A aplicação do simplex foi mais demorada, sendo necessárias seis semanas de trabalho, já que cada experiência devia chegar ao fim para começar a outra. Porém, um total de dois meses foram necessários na otimização total do processo.

Com a aplicação sucessiva de dois métodos estatísticos (Planejamento fatorial e Simplex), conseguiu-se otimizar as condições para o crescimento da cepa brasileira de *T. aurantiacus*, num curto período de tempo. A obtenção de um meio simples para o crescimento de *T. aurantiacus*, o qual contém 8,0 g/l de glicose (0,8%), e 3,2 g/l de NaNO₃ (37,8 mEq/l) como fontes de carbono e nitrogênio, fazem do fungo um microrganismo pouco exigente quanto

a composição do meio, considerando que nestas condições obteve-se a maior velocidade de crescimento ($4,74 \pm 0,02$ mm/h). O novo meio obtido para o crescimento de *T.aurantiacus* (Czapek modificado), contém 0,8% de glicose em substituição do 3,0% de sacarose do meio Czapek original; sendo que a fonte de nitrogênio se manteve, porém, numa concentração ligeiramente superior de 3,2 g/l contra 2,0 g/l de NaNO_3 do meio original.

É sabido que as modificações físicas e nutricionais do ambiente ao qual um organismo é exposto são capazes de alterar o rendimento de um produto (Greasham e Inamine, 1986). Desta forma, é importante conhecer a composição do melhor meio de cultivo e a temperatura ótima para o crescimento da cepa brasileira de *T.aurantiacus*, considerando a possível utilização do fungo na produção de enzimas, proteína unicelular, metabólitos, etc.. Por outro lado, da mesma forma que métodos estatísticos foram utilizados para otimizar as condições de crescimento de *T.aurantiacus*, estes poderiam ser utilizados em estudos futuros para otimizar processos de produção de enzimas pelo fungo.

4.2. - PRODUTOS DO CRESCIMENTO DE *Thermoascus aurantiacus* EM MEIO LÍQUIDO

A produção e a composição de aminoácidos da proteína unicelular (SCP), e a produção de metabólitos e enzimas pelo *T.aurantiacus*, cultivado em meio líquido Czapek, foram estudadas.

4.2.1. - PRODUÇÃO DE PROTEÍNA UNICELULAR (SCP)

A capacidade de *T.aurantiacus* crescer numa variedade de substratos, que incluem madeira de *E.grandis* (Tabela 2, página 46), fez pensar na possibilidade de utilizá-lo na produção de proteína unicelular. Com este objetivo, a produção de proteína fúngica e a composição em aminoácidos da mesma, foram estudadas com *T.aurantiacus* cultivado em meio Czapek contendo 1,5% (p/v) de glicose.

Os rendimentos de conversão de glicose a massa fúngica (gramas de micélio seco/ gramas de substrato total) foram 0,28 e 0,34 para concentrações de 0,5 e 1,5% de glicose, respectivamente, no décimo dia de crescimento em cultura estacionária.

A porcentagem de proteína encontrada no micélio seco de *T.aurantiacus* foi de $27,4 \pm 0,9\%$ (p/p), quando o fungo cresceu em 1,5% de glicose em condições estacionárias. Este micélio foi hidrolisado e os aminoácidos liberados das proteínas fúngicas foram analisados. A composição de aminoácidos de *T.aurantiacus* foi comparada à de *Saccharomyces cerevisiae*, utilizado em escala industrial por seu alto conteúdo proteico, à de soja, proteína vegetal de alto valor nutritivo, e com os aminoácidos da FAO, apontados como apropriados para uma alimentação balanceada (Tabela 12).

Pode-se observar, que da mesma forma que a maioria dos fungos e leveduras, a proteína de *T.aurantiacus* mostrou-se deficiente em aminoácidos do tipo sulfurados. Porém, o teor de cisteína resultou igual ao mostrado pela FAO. A proteína mostrou também uma boa proporção de aminoácidos essenciais, com valores comparáveis aos de soja, *S.cerevisiae* e FAO, mostrando valores muito superiores para alguns aminoácidos como leucina e treonina.

TABELA 12 : CONTEÚDO DE AMINOÁCIDOS DA PROTEÍNA DE *T. aurantiacus* E DE OUTRAS PROTEÍNAS UTILIZADAS COMERCIALMENTE

AMINOÁCIDO	CONTEÚDO DE AMINOÁCIDOS(g aa/ 100 g proteína)			
	<i>T. aurantiacus</i> ¹	<i>S. cerevisiae</i> ²	Soja ³	FAO ⁴
Alanina	5,12	----	3,30	---
Arginina	5,88	----	7,30	---
Ac. Aspártico	7,90	----	3,70	---
Cisteína	1,21	----	1,90	1,20
Ac. Glutâmico	14,93	----	18,40	---
Glicina	4,22	----	4,00	---
Histidina	2,64	----	2,90	---
Isoleucina	4,37	4,60	6,00	4,20
Leucina	15,40	7,40	8,00	4,80
Lisina	6,26	7,70	6,80	4,20
Metionina	1,13	1,70	1,70	2,20
Fenilalanina	6,03	4,10	5,30	2,80
Prolina	5,05	----	5,00	---
Serina	5,36	----	4,20	---
Treonina	6,64	4,80	3,90	2,80
Triptofano	----	1,00	---	1,40
Tirosina	6,03	----	4,00	2,80
Valina	4,60	5,30	5,30	4,20

1: O micelio de *T. aurantiacus* foi obtido sob as seguintes condições de crescimento: meio Czapek contendo 15 g/l de glicose, 2,0 g/l de NaNO₃, pH 7,1 e 50° C.

2: Kihlberg (1972) 3: Block e Bolling (1951) 4: Food and Agriculture Organization (1957)

A qualidade da proteína unicelular de *T. aurantiacus*, quanto a composição de aminoácidos, mostrou-se comparável à qualidade da proteína indicada pela FAO (Tabela 12), o que sugere a possibilidade da utilização do fungo como complemento alimentar. A boa qualidade da proteína de *T. aurantiacus* e a sua capacidade de crescer em substratos como casca de arroz, serragem de *E. grandis* e

bagaço de cana (Tabela 2), possibilita sua utilização em processos de enriquecimento de substratos lignocelulósicos para rações animais e ao mesmo tempo, possibilita um reaproveitamento de resíduos de baixo custo e disponíveis em grandes quantidades.

4.2.2. - METABÓLITOS PRESENTES NA CULTURA

O *T. aurantiacus* foi cultivado em meio líquido Czapek, contendo 1,5% de glicose, 2,0 g/l de NaN_3 , pH 7,1, durante 15 dias a 50°C. Verificou-se que em cultura estacionária o fungo formou uma densa massa micelial, enquanto que sob agitação (150 rpm) houve formação de *pellets*. Após o quinto dia de crescimento, em cultura estacionária, o fungo começou a produzir um pigmento amarelo. No fim do cultivo (15º dia), a cor do caldo era marrom. A produção de pigmento não foi observada na cultura sob agitação, pelo menos durante os 15 dias de cultivo, sob as mesmas condições da cultura estacionária. Tentou-se identificar o pigmento fazendo extração do caldo com diclorometano, porém as quantidades obtidas foram muito reduzidas. É provável que o pigmento obtido em meio líquido seja o mesmo responsável pela coloração do micélio entre o quinto e sexto dia de crescimento, tanto em meio líquido, quanto em meio sólido (placas agar Czapek).

Numa outra etapa, os caldos de cultivo do fungo foram destilados, com o objetivo de determinar se o fungo tinha capacidade de fermentar a glicose do meio. Assim, os destilados dos caldos de cultivo foram analisados por cromatografia gasosa. As análises mostraram a presença de etanol e metanol nos caldos obtidos tanto em condições estacionárias quanto agitadas (Figura 10a e 10b, respectivamente). A identificação das substâncias voláteis foi feita por contaminação das amostras com etanol (Figura 10c) e metanol (Figura 10d).

A fermentação de glicose a etanol, acontece em microrganismos que crescem em ausência de um aceptor de elétrons, sob condições anaeróbicas (Doelle, 1981). O *T. aurantiacus*, pelo fato de ser um fungo aeróbico, não deveria fermentar glicose até etanol. Porém, pode ocorrer que a densa massa micelial, formada em condições

estacionárias, na superfície do caldo, diminua a tensão de oxigênio na cultura, simulando uma condição de anaeróbiose. Na cultura agitada, a formação de *pellets* teria um efeito similar, sendo que o interior do *pellet* teria também uma baixa tensão de oxigênio (Cooney, 1981).

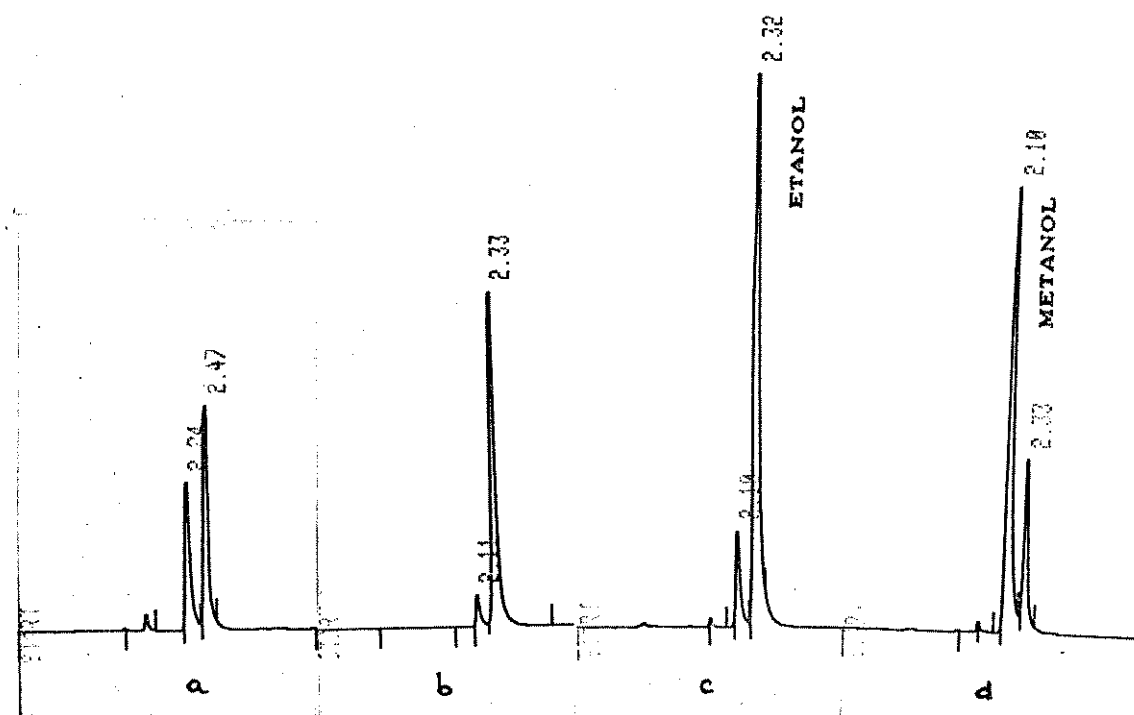


FIGURA 10 Cromatografia gasosa dos caldos de cultivo de *T. aurantiacus* obtidos após 15 dias de incubação a 50°C: (a) Voláteis obtidos em cultura estacionária, (b) Voláteis obtidos em cultura sob agitação (150 rpm), (c) Voláteis de (a) contaminados com etanol, (d) Voláteis de (a) contaminados com metanol. Condições das culturas (a) e (b): 15 g/l de glicose, 2,0 g/l de NaNO₃, pH 7,1

A obtenção de metanol nas culturas é de difícil explicação. Embora existam referências quanto a produção de metanol por microrganismos, esta produção esteve sempre relacionada à presença

de substratos ligninolíticos na cultura, sendo sugerido que a presença de metanol seria devida à desmetoxilação de lignina, provocada por microrganismos (Ander e Eriksson, 1985; Ander e col., 1985).

Assim, estudos posteriores deverão ser desenvolvidos com o objetivo de esclarecer as vias metabólicas que levam o *T.aurantiacus* a produzir etanol e metanol, a partir de glicose.

4.2.a. - PRODUÇÃO DE ENZIMAS LIGNOCELULOLÍTICAS

A produção enzimática por *T.aurantiacus* foi estudada quando o fungo cresceu em meio líquido Czapek, com diferentes fontes de carbono a 50°C. As atividades enzimáticas estudadas foram as celulolíticas, hemicelulolíticas e ligninolíticas extracelulares. Outros parâmetros como pH, proteína solúvel e peso seco também foram determinados, em alguns casos. As atividades enzimáticas, extracelulares, foram medidas num volume determinado do extrato cru (caldo de cultivo filtrado).

4.2.3.1. - PRODUÇÃO DE ENZIMAS CELULOLÍTICAS

Um método simples, rápido e sensível, foi aplicado com o objetivo de determinar a capacidade do fungo *T.aurantiacus* produzir celulasas extracelulares. O método consistiu em incubar o fungo em meio líquido Czapek, com "celulose-azure", um substrato insolúvel, como única fonte de carbono. É sabido que fungos com capacidade celulolítica, provocam a liberação do corante que se difunde no meio, aumentando a absorbância a 595 nm (Poicelot e Day, 1972; Smith, 1977).

O *T.aurantiacus* mostrou-se capaz de produzir celulasas extracelulares quando cultivado em meio contendo 0,1% de "celulose-azure" (Figura 11). O fungo causou um aumento da absorbância a 595 nm. Nos primeiros dias de cultivo o crescimento do fungo foi lento, assim como a liberação de corante para o meio. Provavelmente, um certo tempo de contato entre o fungo e o substrato foi necessário para iniciar-se a produção de celulasas

extracelulares. Do sexto dia até o décimo segundo, um rápido aumento na absorbância foi observado. Após este período o valor da absorbância manteve-se constante.

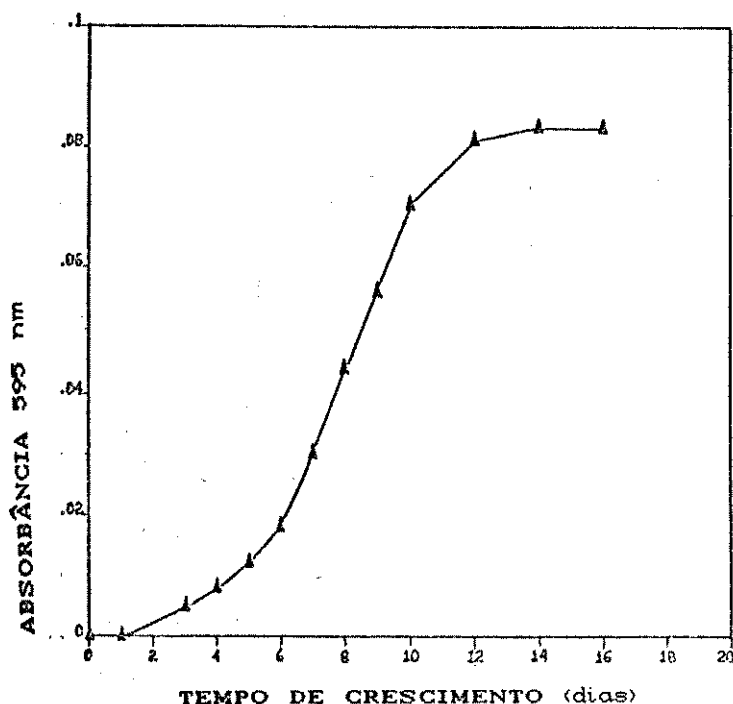


FIGURA 11: Atividade "celulase total" produzida por *T.aurantiacus*, em função do tempo. A atividade foi determinada pelo aumento da absorbância a 595 nm, em caldo Czapek contendo 0,1% de "celulose azure", como única fonte de carbono, a 50°C

Depois de comprovada a capacidade de *T.aurantiacus* secretar celulases para o meio de cultivo, procedeu-se à quantificação das enzimas do complexo celulase com o fungo crescendo em diferentes substratos. Foram avaliadas as atividades "celulase total", endo-glicanase e β -glicosidase, utilizando papel filtro, carboximetilcelulose (CMC) e pNPG como substratos enzimáticos. A Tabela 13 mostra um resumo das máximas atividades celulolíticas e β -glicosidase obtidas no transcurso da incubação. Cada substrato foi adicionado ao meio Czapek numa concentração de 1,5% (p/v), exceto no caso de xilana, 1,0%, e quando glicose, 1,5%, mais serragem de *E.grandis*, 0,5%, foram utilizados simultaneamente.

O fungo mostrou capacidade de produzir quantidades mensuráveis de enzimas celulolíticas em todos os substratos testados. As máximas atividades "celulase total" e endo-glicanase, foram obtidas quando glicose foi utilizada como substrato de crescimento. As atividades com glicose, conhecido repressor de atividade celulolítica em outros fungos, foram maiores que com α -celulose, substrato com o qual esperava-se induzir o sistema celulolítico.

TABELA 13 : PRODUÇÃO DE ENZIMAS CELULOLÍTICAS POR *T. aurantiacus* EM CULTURA ESTACIONÁRIA

SUBSTRATO DE CRESCIMENTO ⁶	ATIVIDADE CELULOLÍTICA (UI/ml) ¹		
	FPA ²	CMCase ³	β -glicosidase
α -celulose	0,079(9) ⁴	0,082(9)	0,004(12)
Glicose	0,250(6)	1,490(6)	0,002(12)
Cavacos <i>E. grandis</i>	0,017(9)	0,028(12)	0,000(12)
Serragem <i>E. grandis</i>	0,030(9)	0,100(9)	0,002(12)
Casca de arroz	n. d. ⁵	0,038(10)	n. d.
Xilana	n. d.	0,120(10)	n. d.
Glicose + serragem <i>E. grandis</i>	0,032(9)	0,290(12)	0,005(12)

1: Cada valor corresponde à média de 3 determinações. O desvio percentual em todos os casos esteve entre 3-10%

2: Atividade "celulase total"(Filter paper activity)

3: Atividade endo-glicanase ou carboximetilcelulase

4: Tempo de cultivo (dias), em que foi obtida a atividade máxima

5: Atividade não determinada.

6: Cada substrato foi adicionado em concentração de 1,5% (exceto xilana: 1,0%) ao caldo Czapek, que continha 2g/l de NaNO₃, pH 7,1. As culturas foram incubadas a 50°C

Quando glicose (1,5%) e serragem (0,5%) foram utilizadas simultaneamente, observou-se uma atividade de endo-glicanase de 0,29 UI/ml, maior que quando somente serragem (1,5%) foi utilizada. Porém, a atividade foi menor que com glicose (1,5%), o

que indicaria que, a presença de 0,5% de um resíduo lignocelulósico, no meio de cultivo, provocaria uma inibição da atividade. É sabido que resíduos lignocelulósicos parecem inibir as celulases, devido provavelmente à presença de lignina e alguns fenóis (produtos da degradação de lignina), inibidores também do crescimento de mutantes de *T.reesei* (Dekker, 1989a).

A β -glicosidase, uma enzima produzida em quantidades elevadas pela maioria dos fungos celulolíticos (Woodward e Wiseman, 1982), esteve presente, quando não ausente, em quantidades muito baixas nas culturas de *T.aurantiacus*, pelo menos, quando os níveis da enzima extracelular foram quantificados utilizando pNPG como substrato. Porém, alguma atividade mensurável foi obtida somente no fim do período de incubação, ou seja, após o décimo dia, quando a lise celular se fez evidente.

Como uma forma de avaliação, as atividades celulolíticas produzidas por *T.aurantiacus*, foram comparadas com as do conhecido fungo celulolítico, *T.reesei* QM6a (cepa selvagem) (Mandels, 1975) Tabela 14).

TABELA 14 : ATIVIDADE CELULOLÍTICA (UI/ml) DE *T.aurantiacus* (cepa brasileira) E *T.reesei* (QM6a), EM α -CELULOSE E GLICOSE COMO SUBSTRATOS DE CRESCIMENTO

	<i>T.aurantiacus</i> ¹	<i>T.reesei</i> ²
Substrato : α -celulose		
"Celulase total"	0,079	0,17
Endo-glicanase	0,082	14,0
Substrato : Glicose		
"Celulase total"	0,25	0,05
Endo-glicanase	1,49	0,90

1: Crescimento em 1,5% (p/v) de substrato, durante 6 dias

2: Crescimento em 1,0% (p/v) de substrato, durante 13 dias

Pode-se observar que *T. reesei* apresenta alta atividade celulolítica quando cresce em meio que contem α -celulose e sofre repressão catabólica por glicose. De modo diverso, quando *T. aurantiacus* foi cultivado em meio contendo glicose, produziu maiores quantidades de endo-glicanase que quando o meio continha α -celulose. Os valores de atividade celulolítica de *T. aurantiacus* mostraram-se comparáveis aos de *T. reesei* QM6a, e chegaram a ser até maiores, como no caso da cultura com glicose (Tabela 14).

Visto que *T. aurantiacus* produziu a maior atividade de endo-glicanase quando cresceu em meio que continha glicose, o efeito da concentração de glicose inicial sobre a produção enzimática foi estudada (Figura 12). Culturas com concentrações iniciais de 0,2, 0,5, 1,0 e 1,5% de glicose, foram preparadas. A produção de endo-glicanase por *T. aurantiacus*, aumentou quando a concentração de glicose inicial foi superior a 0,5%, e continuou aumentando após 1,0%.

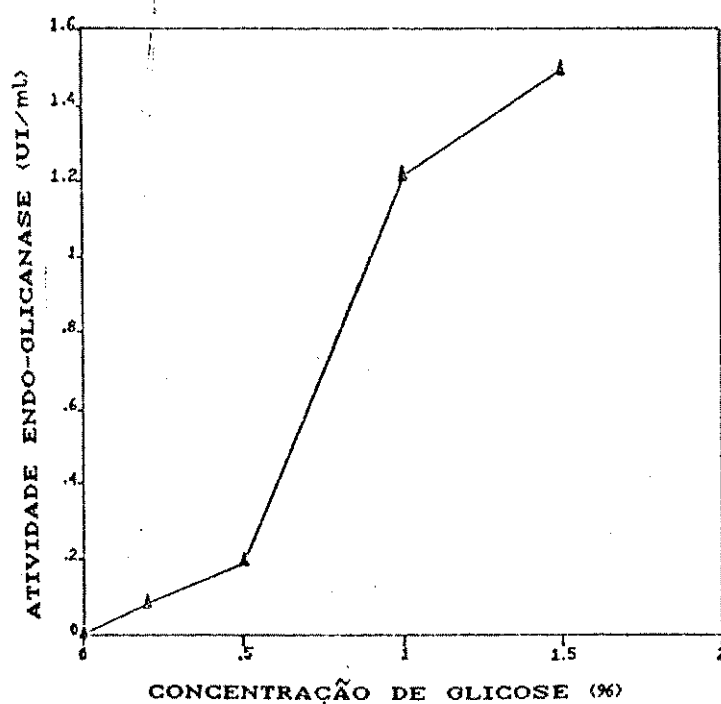


FIGURA 12: Produção de endo-glicanase por *T. aurantiacus*, cultivado em caldo Czapek (pH 7,1), com diferentes concentrações iniciais de glicose. As atividades foram determinadas ao sexto dia de crescimento, a 50°C, em cultura estacionária.

A produção de endo-glicanase foi estudada durante 15 dias, em culturas estacionária e agitada (150 rpm). O fungo foi cultivado em meio contendo 1,5% (15 g/l) de glicose (pH inicial 7,1). Os valores de crescimento micelial, glicose residual, variação do pH do meio e produção de endo-glicanase extracelular são mostrados na Tabela 15. Os valores de endo-glicanase correspondem aos maiores obtidos no decorrer do tempo de cultivo, e os valores para os outros parâmetros correspondem aos obtidos no dia da máxima atividade endo-glicanase.

TABELA 15 : COMPARAÇÃO DO CRESCIMENTO DE *T. aurantiacus* EM CULTURA ESTACIONÁRIA E AGITADA (150 rpm)

	CULTURA ESTACIONÁRIA ¹	CULTURA AGITADA ¹
Endo-glicanase (UI/ml)	1,49(6) ²	0,85(12) ²
Proteína solúvel (mg/ml)	0,40	0,21
Glicose residual (g/l)	3,00	5,87
pH	4,70	5,80
Peso seco micelial (mg)	73,30	104,4

Cada valor corresponde a média de 3 medidas, com um desvio percentual entre 3-10%

1: As culturas foram realizadas em condições estáticas e sob agitação (150 rpm), contendo 15 g/l de glicose inicial, pH 7,1, durante 15 dias a 50 C

2: Tempo de cultivo (dias), onde foi obtida a máxima atividade enzimática.

Pode-se observar que, embora a quantidade de massa micelial tenha sido maior em cultura agitada, a produção de proteína extracelular foi maior em cultura estacionária. O teor de proteína extracelular tem relação com a produção de enzimas extracelulares pelo fungo. Assim, a maior atividade endo-glicanase foi observada na cultura com maior teor proteico. O consumo de glicose foi 1,4 vezes maior em condições estacionárias do que em condições de agitação (Tabela 15).

Na figura 13, observa-se a produção de endo-glicanase e o consumo de glicose do meio de crescimento em cultura em agitação e estacionária. No caso da cultura agitada, a produção de endo-glicanase começou a aumentar após o primeiro dia de cultivo, e manteve-se num nível mais ou menos constante. A queda de glicose no meio, entre o início do cultivo e o terceiro dia, coincidiu com o aumento de atividade endo-glicanase.

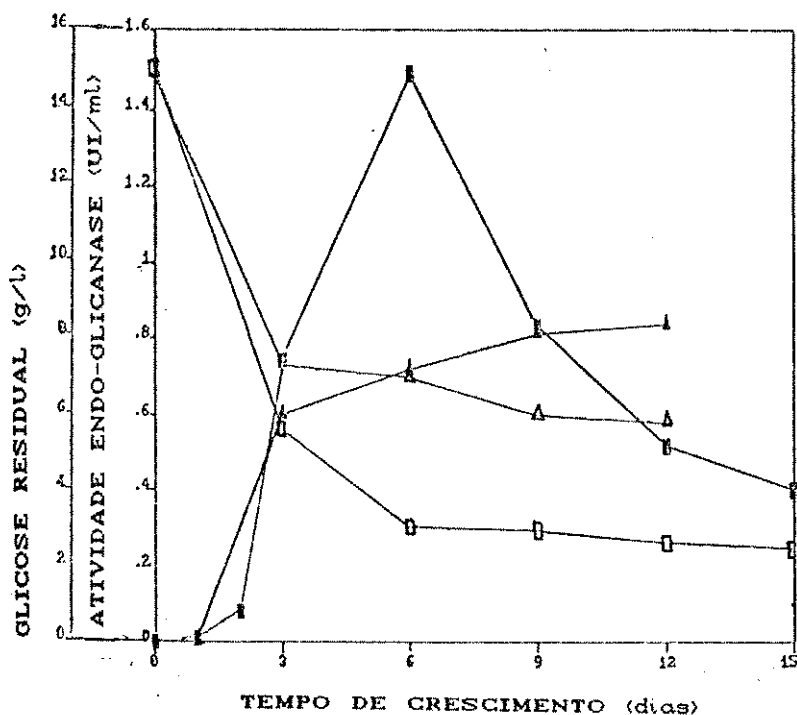


FIGURA 13: Produção de endo-glicanase por *T. aurantiacus*, em caldo Czapek (pH 7,1) contendo 1,5% de glicose inicial, sob condições estacionárias (—■—) e de agitação (—▲—), a 50° C. Glicose residual na cultura estacionária (—□—) e em agitação (—△—)

Sob condições estacionárias, grandes diferenças foram observadas. Nos primeiros dias de cultivo, a atividade endo-glicanase aumentou rapidamente, alcançando um máximo no sexto dia, após o qual observou-se uma queda brusca nos níveis enzimáticos. A velocidade de consumo de glicose foi maior em

cultura estacionária que em cultura agitada. A diminuição do teor de glicose no meio, entre o início da cultura e o sexto dia, da mesma forma que para cultura em agitação, coincidiu com o aumento na atividade endo-glicanase. A queda na atividade enzimática após o sexto dia, pode ter relação com a queda no pH do meio, com a diminuição de massa micelial ou com a possível produção de proteases, o qual provocaria a diminuição no teor de proteína extracelular (Figura 14).

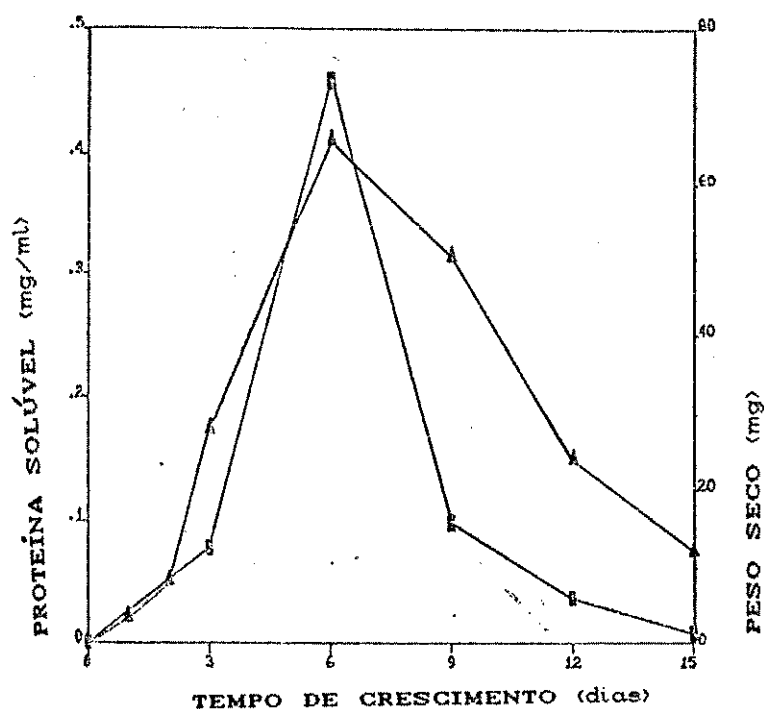


FIGURA 14: Produção de proteína extracelular (—▲—) e peso seco (—■—) do *T. aurantiacus*, quando cultivado em caldo Czapek (pH 7,1), com 1,5% de glicose, durante 15 dias a 50° C, em condições estacionárias

O fungo *T. aurantiacus*, foi capaz de produzir celulases, em menor ou maior quantidade, quando cultivado em todos os substratos testados, o que não acontece normalmente com a maioria dos microrganismos celulolíticos. *T. reesei* (e seus mutantes), conhecido fungo produtor de elevadas taxas de celulases, apresenta um sistema celulolítico induzido por celulose e fortemente

reprimido pela presença de glicose no meio de cultivo (Dekker, 1989a).

O sistema celulolítico de *T.aurantiacus* parece não ser regulado por repressão catabólica, ao menos nas concentrações de glicose utilizadas nos meios de cultivo. Numa cultura com 1,5% de glicose, a endo-glicanase começou a aumentar após o terceiro dia de cultivo, ou seja, quando glicose alcançou uma concentração de 0,6%. Feldman e colaboradores (1988), trabalhando com a cepa TA2 de *T.aurantiacus*, observaram um comportamento similar para uma endo-glicanase, a qual era produzida a níveis constitutivos quando a glicose do meio (inicialmente de 1,0%), alcançava um valor menor que 0,2%.

O fungo *T.aurantiacus* apresentou atividades celulolíticas comparáveis às do fungo *T.reesei* QM6a, apesar de seus sistemas enzimáticos apresentarem grandes diferenças quanto a indução e repressão. Porém, a regulação da produção celulolítica de *T.aurantiacus* deve ainda ser esclarecida através de estudos mais detalhados.

4.2.3.2. - PRODUÇÃO DE ENZIMAS HEMICELULOLÍTICAS

A produção de hemicelulases foi determinada pela atividade xilanase. A atividade β -xilosidase foi determinada em alguns casos. As atividades enzimáticas foram determinadas quando *T.aurantiacus* cresceu em diferentes substratos, nas mesmas condições de produção de celulases (Tabela 16).

A produção de xilanase por *T.aurantiacus*, foi similar à produção de celulases. A maior atividade xilanase foi obtida numa cultura estacionária com glicose como substrato, no sexto dia de crescimento, nas mesmas condições em que a máxima atividade endo-glicanase foi obtida. Quando xilana, 1,0%, foi utilizada como substrato, obteve-se uma alta atividade xilanase, quando comparada com a atividade em outros substratos.

Quando o fungo foi cultivado em meio contendo 1,5% de glicose e 0,5% de serragem de *E.grandis*, a atividade xilanase caiu, em relação à atividade em meio contendo apenas 1,5% de glicose, da mesma forma que foi observado para a atividade endo-glicanase. A

atividade β -xilosidase foi produzida, extracelularmente, em baixas quantidades e no fim do período de incubação (10-15 dias).

TABELA 16: PRODUÇÃO DE XILANASE POR *T. aurantiacus* EM CULTURA ESTACIONÁRIA

SUBSTRATO DE CRESCIMENTO ¹	ATIVIDADE (UI/ml)	
	XILANASE	β -xilosidase
Xilana ("larchwood")	0,530(10) ²	0,0025(10)
Glicose	1,200(6)	n. d. ³
Serragem <i>E. grandis</i>	0,021(6)	n. d.
Casca de arroz	0,230(12)	0,0039(15)
Glicose + Serragem de <i>E. grandis</i>	0,320(10)	0,006(12)

Cada valor corresponde à média de 3 medidas, com um desvio percentual entre 9-10%

1: Cada substrato foi adicionado ao meio Czapek, nas mesmas condições mostradas na Tabela 6

2: Tempo de cultivo (dias), em que foi obtida a atividade

3: Atividade não determinada

Quando a produção de xilanase foi comparada à de endo-glicanase, observou-se que ambas enzimas foram produzidas nos mesmos substratos. Só não foi determinada a atividade xilanase em cultura com α -celulose. A glicose foi o melhor substrato para produção de xilanase e endo-glicanase, no mesmo dia de cultivo (6^o dia). Xilana foi um substrato onde tanto xilanase quanto endo-glicanase foram produzidas, porém a atividade xilanase foi maior do que endo-glicanase (Tabelas 13 e 16).

Quando o fungo foi cultivado sob agitação (150 rpm), produziu 0,55 UI/ml de atividade xilanase, utilizando 1,5% de glicose como substrato de crescimento. A atividade foi reduzida em aproximadamente 50%, quando comparada com a cultura estacionária, nas mesmas condições.

Existe muita discordância na literatura quanto à regulação da produção de xilanases extracelulares em fungos e bactérias. Alguns autores afirmam que a produção é constitutiva, e outros, indutiva, em resposta ao substrato de crescimento utilizado (Dekker e Richards, 1976; Dekker, 1989a). A capacidade de fungos que decompõem madeira, produzir xilanases quando crescem em meios que contêm glicose ou celulose como substrato, foi descrita (Clermont e col., 1970; Bailey e col., 1971). O *T. aurantiacus* foi capaz de produzir xilanase com todos os substratos em que ele foi cultivado, incluindo glicose, com a qual obteve-se a maior atividade.

A atividade xilanase da cepa brasileira de *T. aurantiacus* (0,53 UI/ml), resultou ser menor que a de uma cepa indiana do mesmo fungo (37,4 UI/ml) (Khandke e col., 1989a), quando ambas foram cultivadas em meio que continha xilana, a 50°C durante 10 dias para a cepa brasileira e 12 dias para a cepa indiana. Quando o meio continha glicose em concentração de 1,0% (p/v), a cepa indiana não produziu xilanase (Khandke e col., 1989a). A cepa brasileira, pelo contrário, produziu 1,2 (UI/ml) de xilanase, quando cultivado em meio contendo 1,5% de glicose (Tabela 16). Porém, a máxima atividade xilanase da cepa brasileira de *T. aurantiacus* (1,2 UI/ml) resultou muito menor quando comparada com a de *Aspergillus fumigatus* (produtor de xilanases comerciais), 221 (UI/ml), cultivado em meio contendo 1,0% de xilana, sob agitação e a 37°C (Stewart e col., 1983).

Numerosos trabalhos informam da relação entre atividade xilanase e endo-glicanase (Dekker e Richards, 1976; Wong e col., 1988; Roger e Nakas, 1990). Sendo que alguns mostram que mutações que afetam a atividade celulase, frequentemente também afetam a atividade xilanase (Montenecourt e col., 1981). Para *T. aurantiacus*, a produção de atividade xilanase foi sempre acompanhada de atividade endo-glicanase. Deve-se, portanto, considerar a possibilidade da existência de uma relação entre o mecanismo de regulação da atividade xilanase e o da endo-glicanase. Toda e colaboradores (1971), trabalhando com uma celulase comercial de *T. viridae*, observaram o que chamaram de "especificidade cruzada", onde tanto carboximetilcelulose quanto xilana competiram pelo mesmo sítio ativo na enzima.

4.2.3.3. - PRODUÇÃO DE ENZIMAS LIGNINOLÍTICAS

A capacidade ligninolítica do fungo foi testada através de um método espectrofotométrico quantitativo, simples e rápido, equivalente ao método utilizado para determinar produção de celulase extracelular com "celulose azure". O método utilizado para determinar a capacidade ligninolítica foi a descoloração do corante aromático Remazol brilliant blue (RBB-R) (Ulmer e col., 1984).

A descoloração foi determinada quando o crescimento do *T. aurantiacus* foi estudado em meio que continha 1,5% de glicose, 1,5% de serragem de *E. grandis* e 1,5% de glicose mais 0,5% de serragem, simultaneamente. Estes substratos foram adicionados ao meio Czapek (pH 7,1), e as culturas foram mantidas durante 10 dias, em condições estacionárias, e a 50°C.

T. aurantiacus mostrou capacidade de descolorir RBB-R, quando foi cultivado em meios que continham os substratos testados (Figura 15), embora o comportamento com cada um deles tenha sido diferente.

Quando glicose foi utilizada como fonte de carbono, obteve-se uma descoloração muito fraca de RBB-R. Com serragem de *E. grandis* obteve-se uma descoloração maior que com glicose, no fim do cultivo. O crescimento em serragem foi retardado nos primeiros dias do cultivo, porque o fungo não dispunha de uma fonte de carbono adicional. Provavelmente, seja essa a razão da descoloração aumentar tardiamente. Quando glicose e serragem foram utilizadas simultaneamente, a descoloração de RBB-R foi marcadamente superior que com glicose e serragem utilizadas separadamente. Portanto pode-se concluir que a presença de 0,5% de um material lignocelulósico teve um efeito de indução do sistema que descolore RBB-R, uma vez que a razão de absorbância de 0,48 em 1,5% de glicose aumentou para 1,65 em 1,5% de glicose mais 0,5% de serragem. Um resumo das máximas descolorações nas diferentes condições aparece na Tabela 17.

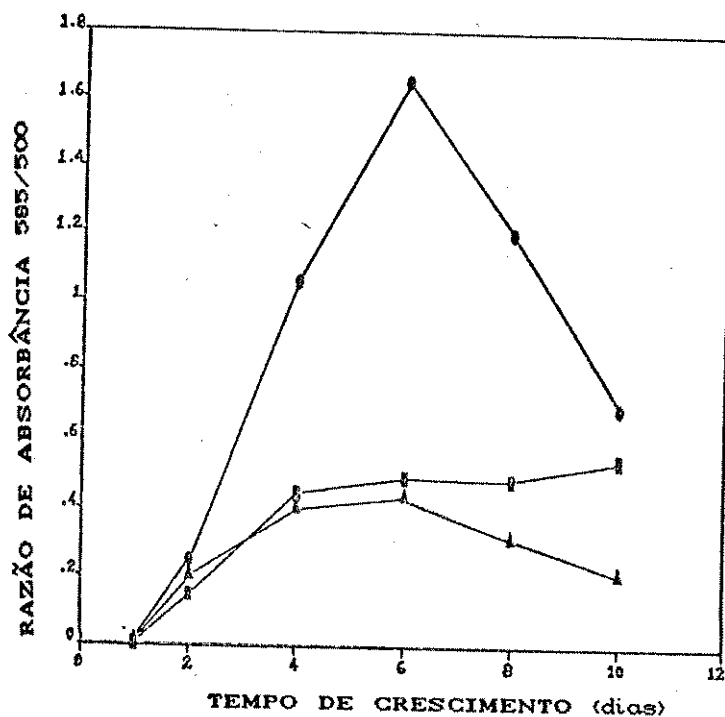


FIGURA 15: Descoloração de RBB-R por *T. aurantiacus*, cultivado durante 10 dias (50° C, condições estacionárias), em caldo Czapek (pH 7,1), com 1,5% de glicose (—▲—), 1,5% de serragem de *E. grandis* (—■—) e 1,5% de glicose + 0,5% de serragem de *E. grandis* (—●—)

TABELA 17: ATIVIDADE LIGNINASE DETERMINADA PELA DESCOLORAÇÃO DE RBB-R

SUBSTRATO	RAZÃO ABS ₅₈₅ /ABS ₅₀₀
Glicose (1,5%)	0,44
Serragem <i>E. grandis</i> (1,5%)	0,56
Glicose (1,5%) + Serragem <i>E. grandis</i> (0,5%)	1,65

Desvio percentual das medidas: 3-10%

A descoloração de RBB-R e outros corantes poliméricos, foi correlacionada com a atividade ligninolítica no fungo *P.chryso sporium* (Glenn e Gold, 1983; Ulmer e col., 1984). Glenn e Gold (1983), afirmaram que a descoloração de corantes parece ser um processo metabólico secundário, como a atividade ligninolítica.

Nenhuma evidência existe na literatura da capacidade ligninolítica de *T.aurantiacus*. Porém, com estes resultados iniciais pode-se afirmar que a cepa brasileira de *T.aurantiacus*, semelhantemente ao *P.chryso sporium*, tem capacidade de descolorir RBB-R, e que a descoloração na presença de um resíduo lignocelulósico no meio de cultivo foi 3,8 vezes superior que na ausência deste tipo de material.

Comprovada a existência de capacidade ligninolítica em *T.aurantiacus*, procedeu-se a quantificação das atividades ligninase (oxidação de álcool veratrílico) e fenol oxidase, determinadas como lacases (oxidação de siringaldazine, o-dianisidina e outros). Os substratos de crescimento utilizados neste estudo foram glicose e madeira de *E.grandis* (serragem e cavacos), testados como prováveis indutores de atividade ligninolítica (Tabela 18).

Quando glicose, em diferentes concentrações (0-15%), foi utilizada como substrato de crescimento, nenhuma atividade ligninase ou fenol oxidase foi observada. De modo similar à descoloração de RBB-R, as maiores atividades fenol oxidase foram obtidas quando um resíduo lignocelulósico, como serragem de *E.grandis*, esteve presente na cultura (Tabela 18).

Nos caldos de cultivo com madeira não foi possível determinar atividade ligninase, por oxidação de álcool veratrílico, devido as interferências resultantes, provavelmente, de produtos de decomposição da madeira liberados ao meio, que provocam uma coloração dos caldos.

A atividade fenol oxidase, foi determinada por oxidação de o-dianisidina e siringaldazine a pH 3,0, sem adição de peróxido de hidrogênio. A produção de fenol oxidase extracelular foi determinada quando a cultura continha glicose (1,5%), serragem (1,5%), cavacos (1,5%) e glicose (1,5%) com diferentes concentrações de serragem (0,1-1,0). Ao mesmo tempo, utilizou-se

uma concentração de serragem de 1,5%, com uma quantidade reduzida de glicose (0,5%) (Tabela 18).

TABELA 18 : PRODUÇÃO DE FENOL OXIDASES POR *T.aurantiacus* EM CULTURA ESTACIONÁRIA

SUBSTRATO ¹	ATIVIDADE FENOL OXIDASE (U/l)	
	o-dianisidina	siringaldazine
Serragem (1,5%) ²	10,5 (9) ³	0,00
Cavacos (1,5%) ²	5,50 (10)	0,00
Glicose (1,5%)	0,00	0,00
Glicose (1,5%) +		
0,1% serragem ²	0,61 (9)	0,00
0,2% serragem	15,9 (6)	8,20 (6)
0,5% serragem	21,4 (6)	11,3 (6)
1,0% serragem	38,6 (6)	20,0 (6)
1,5% serragem	42,5 (6)	23,8 (6)
Serragem (1,5%) ² + glicose (0,5%)	92,7 (12)	43,2 (12)

Desvio porcentual das medidas: 9-10%

1: Os substratos foram adicionados ao caldo Czapek (pH 7,1), nas concentrações assinaladas entre parêntese. As culturas foram incubadas a 50°C

2: Serragem e Cavacos de *Eucaliptus grandis*

3: Tempo de cultivo (dias) em que foi obtida a máxima atividade fenol oxidase

Pode-se observar que o *T.aurantiacus* foi capaz de produzir atividade fenol oxidase extracelular, sempre que no meio esteve presente algum resíduo lignocelulósico, neste caso serragem ou cavacos de *E.grandis* (Tabela 18). Baixas atividades que oxidavam o-dianisidina, e nenhuma que oxidasse siringaldazine, foram observadas quando serragem e cavacos foram utilizados sem uma fonte de carbono adicional, como glicose. Nestas culturas o crescimento de *T.aurantiacus* foi reduzido, o que confirma o fato

de que fungos não podem utilizar a lignina de resíduos lignocelulósicos como único substrato de crescimento, sendo, portanto, necessária a presença de um co-substrato, facilmente metabolizável. A presença de glicose no meio é também importante para a produção de peróxido de hidrogênio, necessário para a ação de peroxidases (Eriksson, 1987).

Uma variação na produção de fenol oxidase foi observada quando uma concentração fixa de glicose de 1,5%, foi acompanhada de quantidades variadas de serragem de *E. grandis* no meio de cultivo (Figura 16). A atividade fenol oxidase aumentou com o aumento da quantidade de serragem no meio, alcançando uma atividade de oxidação de o-dianisidina de 42,5 U/l, no sexto dia de crescimento em 1,5% de serragem. Porém, a atividade não teve um aumento muito grande entre 1,0 e 1,5% de serragem. Neste ensaio observou-se também, que a oxidação de siringaldazine, aconteceu somente quando a atividade que oxidava o-dianisidina foi superior a 10 U/l, sendo que o comportamento quanto ao dia de produção de atividade que oxidava siringaldazine foi similar ao que oxidava o-dianisidina (Figura 17).

Quando a concentração de glicose foi reduzida para 0,5% e a serragem foi mantida em 1,5%, uma atividade de 92,7 U/l foi obtida para o-dianisidina e de 43,2 U/l para siringaldazine, no décimo segundo dia de crescimento (Figura 17). No sexto dia de crescimento, a glicose do meio foi reduzida a níveis mínimos, enquanto que a atividade fenol oxidase começava a aumentar.

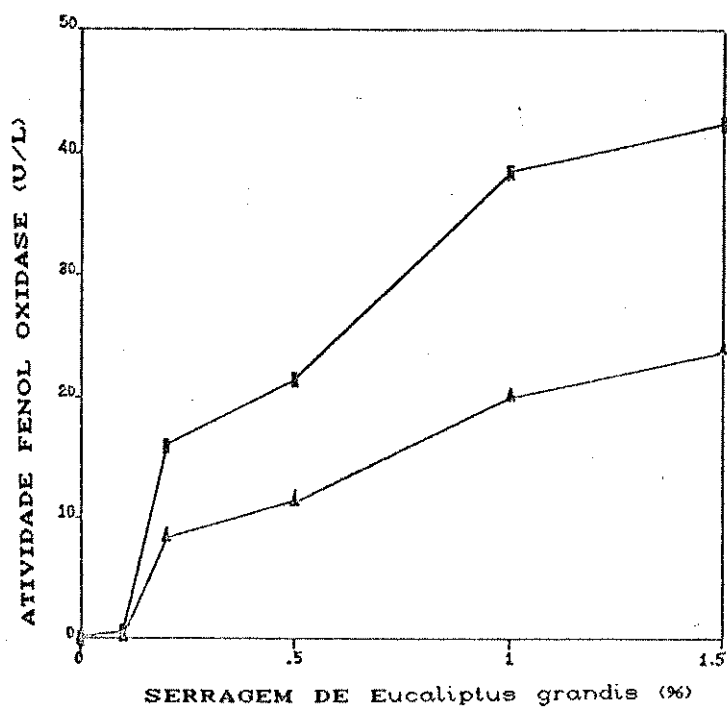


FIGURA 16: Produção de fenol oxidases por *T. aurantiacus*, cultivado em caldo Czapek (pH 7,1), contendo 1,5% de glicose e diferentes concentrações de serragem de *E. grandis*. A atividade fenol oxidase foi determinada por oxidação de o-dianisidina (—■—) e siringaldazine (—▲—), no sexto dia de crescimento a 50° C, em condições estacionárias

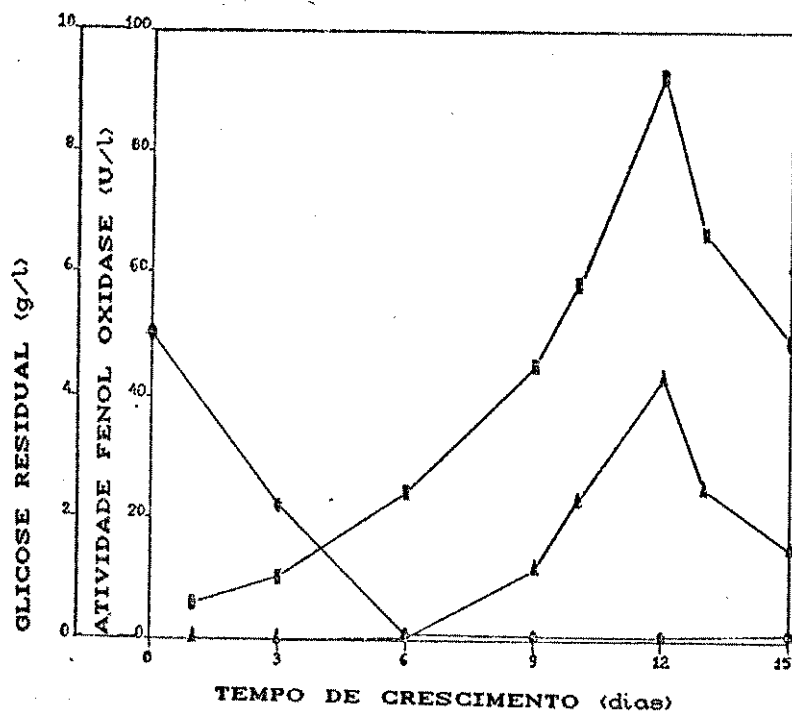


FIGURA 17: Produção de fenol oxidase por *T. aurantiacus* durante 15 dias de cultivo a 50° C, em condições estacionárias. O caldo Czapek (pH 7,4), continha 1,5% de serragem de *E. grandis* + 0,5% de glicose inicial. Atividade fenol oxidase determinada por oxidação de o-dianisidina (—■—) e siringaldazine (—▲—). Glicose residual na cultura (—●—)

Não foi possível determinar o teor de proteína solúvel, nos caldos onde foram determinadas as atividades fenol oxidase, porque a coloração destes interferia com os métodos utilizados (Bradford e Biureto).

Outros substratos, como guaiacol e orcinol, foram testados com o caldo com 92,7 U/l de atividade (o-dianisidina), e uma reação positiva de oxidação observou-se, qualitativamente, pela mudança de cor (reação positiva correspondia a uma intensa cor vermelha).

Pode-se concluir, então, que a produção de atividade ligninolítica por *T.aurantiacus*, foi influenciada pela presença de um material lignocelulósico no meio de cultivo. A descoloração de RBB-R, provavelmente seja realizada pela ação de um sistema enzimático similar ao responsável pela oxidação de o-dianisidina e siringaldazine. Porém, a descoloração de RBB-R aconteceu quando apenas glicose estava presente no meio, enquanto nenhuma oxidação de o-dianisidina e siringaldazine foi obtida nestas condições. É importante destacar o fato de que a atividade que oxidava o-dianisidina, siringaldazine, orcinol e guaiacol, foi testada sem adição de peróxido de hidrogênio (ou seja, como lacase). Porém, não foi feita a determinação de peróxido de hidrogênio nos caldos de cultivo, por tanto, não é possível afirmar que a enzima que oxidou os compostos anteriores atue na ausência de peróxido de hidrogênio, como uma lacase.

O *T.aurantiacus* produziu atividades de fenol oxidase maiores que as de fungos de decomposição branca (*C.versicolor* (CLU e ATCC), *Phellinus igniarius* (CLU), *Lycoperdon* sp.(CLU)); quando a atividade foi testada pela oxidação de o-dianisidina e siringaldazine (Szklarz e col., 1989). As máximas atividades obtidas no caso de *T.aurantiacus* foram de 92,7 (U/ml), para oxidação de o-dianisidina e 43,2 (U/ml), para oxidação de siringaldazine (Tabela 18), em meio que continha 1,5% de serragem de *E.grandis* e 0,5% de glicose. Quando *C.versicolor* foi cultivado em meio contendo 0,5% de glicose, as máximas atividades lacase foram de 60,71 (U/ml), para oxidação de o-dianisidina e 7,81 (U/ml) para oxidação de siringaldazine (Szklarz e col., 1989).

O fungo *T.aurantiacus* produziu enzimas extracelulares celulolíticas e hemicelulolíticas quando cultivado em todos os substratos testados. Enquanto que, para a produção de enzimas ligninolíticas, foi necessária a presença de um substrato lignocelulósico no meio de cultivo. Endo-glicanse e xilanase foram, provavelmente, produzidas constitutivamente quando o fungo cresceu em glicose.

As atividades enzimáticas produzidas por *T.aurantiacus*, tem relação com os resultados obtidos durante o estudo do crescimento do fungo em diferentes substratos (Tabela 2, página 46). Devido à capacidade demonstrada pelo fungo para crescer em fontes de carbono simples, polímeros mais complexos e resíduos lignocelulósicos, esperava-se encontrar as enzimas necessárias para a utilização de tais substratos. Isto foi confirmado ao detectar-se atividade "celulase total", endo-glicanase, xilanase, β -glicosidase, β -xilosidase (embora, em baixas quantidades) e fenol oxidases. A baixa velocidade de crescimento em celobiose coincidiu com as baixas atividades de β -glicosidase obtidas. Deste modo, a baixa velocidade de crescimento em α -celulose pode indicar uma baixa atividade da enzima C_1 , enzima necessária na primeira etapa da degradação de celulose, permitindo o posterior ataque por C_x (endo e exo-glicanases). A enzima C_x atuaria numa ação combinada e sinérgica com C_1 (C_1 - C_x) (Lee e col., 1980). Isto explicaria a baixa atividade de "celulose total" e endo-glicanase quando o substrato utilizado foi α -celulose.

Contudo, o sistema celulolítico de *T.aurantiacus* apresentou características interessantes, do ponto de vista da utilização em fermentações, onde os principais problemas são o aumento e o acúmulo de glicose, com uma conseqüente repressão dos sistemas celulolíticos. *T.aurantiacus* apresentou uma atividade endo-glicanase em concentrações elevadas de glicose.

A produção de enzimas ligninolíticas, determinadas como fenol oxidases, parece ser dependente do substrato de crescimento. Assim, as maiores atividades foram obtidas quando *T.aurantiacus* crescia em meios que continham serragem de *E.grandis* em altas concentrações (1,5%), em presença de um co-substrato, como glicose. Porém, uma baixa concentração de glicose (0,5%), pareceu ser muito melhor do que uma alta concentração (1,5%).

Finalmente, um aumento na produção de enzimas por *T.aurantiacus*, pode ser possível através do desenvolvimento de processos tais como otimização da composição do meio e das condições de crescimento e modificações genéticas.

4.3. - BIODEGRADAÇÃO DE MADEIRA DE *Eucalyptus grandis* POR *T. aurantiacus*

Depois de confirmar a produção de atividade ligninolítica (fenol oxidase) por *T.aurantiacus*, e sabendo que o fungo tinha sido isolado de cavacos de *Eucalyptus* sp., decidiu-se estudar as alterações produzidas na madeira de *Eucalyptus grandis* após tratamento fúngico.

As madeiras, serragem e cavacos, foram tratadas com *T.aurantiacus*, durante 21 dias, a 50°C em condições estacionárias. Após este período, o micélio do fungo foi separado da madeira, e seus principais componentes foram analisados quimicamente. Quando serragem de *E.grandis* foi tratada com o fungo, tres concentrações diferentes de glicose foram utilizadas (0,3, 0,5 e 1,0%), com o objetivo de determinar o efeito da variação de glicose do meio na biodegradação dos diferentes componentes da madeira.

As características da madeira após tratamento com *T.aurantiacus*, quanto a porcentagem de extrativos, lignina e hemicelulose, nas diferentes concentrações de glicose, são mostradas na figura 18. Na tabela 19, aparece um resumo das porcentagens de perda de cada componente em relação à madeira inicial.

TABELA 19: PORCENTAGEM DE PERDA DOS COMPONENTES DE SERRAGEM DE *E.grandis* TRATADO COM *T.aurantiacus*, EM CULTURAS COM 0,3, 0,5 E 1,0% DE GLICOSE

% DE PERDA	CONCENTRAÇÃO DE GLICOSE (%)		
	0,3	0,5	1,0
PESO	5,40 [±] 0,6	6,70 [±] 0,7	5,70 [±] 0,9
EXTRATIVOS	53,7 [±] 1,1	64,4 [±] 1,0	46,1 [±] 1,0
CELULOSE	0,00	0,00	0,00
HEMI CELULOSE	10,7 [±] 0,9	11,0 [±] 1,0	9,50 [±] 0,9
LIGNINA	11,3 [±] 1,0	15,0 [±] 1,1	10,4 [±] 0,9

Os valores da tabela correspondem à média de 3 medições [±] desvio

A perda de peso da madeira após 21 dias de tratamento, foi maior quando 0,5% de glicose foi adicionada ao meio. O teor de extrativos foi o mais alterado pelo fungo (figura 18), diminuindo à metade, quando comparado com o valor do controle, quando 0,3 e 0,5% de glicose foram utilizados. Numa concentração de glicose de 1,0%, a queda do teor de extrativos teve uma diminuição. As quedas nos teores de hemicelulose e lignina, para as madeiras tratadas, foram maiores em baixas concentrações de glicose (0,3 e 0,5%). A celulose foi o único componente da madeira que não sofreu alteração após tratamento fúngico.

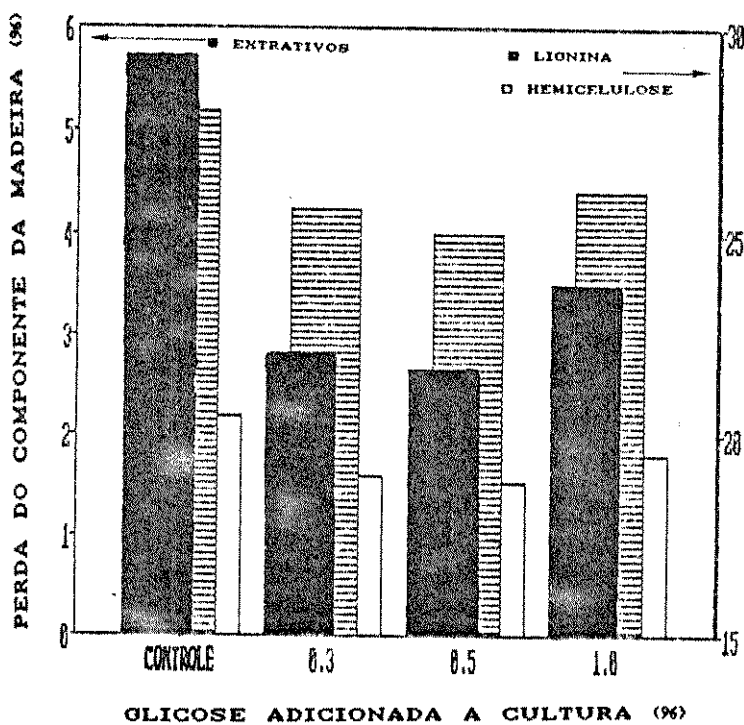


FIGURA 18: Perda dos componentes da serragem de *E. grandis* após 21 dias de tratamento com *T. aurantiacus*. O cultivo foi realizado em caldo Czapek (pH 6,5), contendo diferentes concentrações de glicose, em condições estacionárias, a 50° C. Perda em peso de extrativos (■), lignina (▨) e hemicelulose (□)

A solubilidade em NaOH 1,0%, ou índice de degradação, foi de $10,1^{+0,4}$ % no controle. Para as madeiras tratadas com fungo, na presença de 0,3 e 0,5% de glicose, a solubilidade em NaOH 1,0% foi de $8,7^{+0,6}$ e $8,5^{+1,0}$ %, respectivamente. Estes valores são difíceis de explicar, já que, por definição, quando um processo de biodegradação acontece, a solubilidade em NaOH 1,0% aumenta, devido ao aumento das substâncias solúveis resultantes da ação do fungo (ASTM Methods, 1966c). Porém, quando a concentração de glicose aumentou para 1,0%, a solubilidade em NaOH 1,0% foi de $11,0^{+0,9}$ %. É provável que no transcurso da incubação, o *T.aurantiacus*, que provocou alguma perda de lignina, tenha utilizado as substâncias solúveis, produtos da decomposição da lignina, provocando com isto a diminuição do valor do índice de degradação, nos dois primeiros casos (0,3 e 0,5% de glicose).

A rápida queda dos extrativos após 21 dias, indica que *T.aurantiacus* utiliza estas substâncias da madeira para seu crescimento; estes resultados concordam com os de Auer e colaboradores (1986), que afirmam que os principais componentes a serem atacados pela cepa brasileira de *T.aurantiacus* são as substâncias solúveis, que compõem os extrativos.

Uma vez que *T.aurantiacus* provocou a maior perda de peso e componentes da madeira quando 0,5% de glicose foram adicionados na cultura, o estudo da degradação de cavacos de *E.grandis* foi realizada nestas condições. Um resumo das características dos componentes dos cavacos após 21 dias de tratamento, e após serem moídos, aparece na Tabela 20.

Embora tenha-se observado um bom crescimento fúngico sobre a superfície dos cavacos, as alterações neles provocadas, quanto a perda de componentes, foram mínimas, exceto para os extrativos. As perdas de lignina e hemicelulose foram menores que com serragem. Porém, a perda de extrativos foi comparável a perda de extrativos em serragem. É provável que o ataque de *T.aurantiacus* tenha se limitado à superfície dos cavacos, sendo necessário um tempo de cultivo maior, para provocar modificações internas, e conseqüentemente maiores alterações totais nos componentes.

TABELA 20 : PORCENTAGEM DE PERDA DOS COMPONENTES DE CAVACOS DE *E. grandis* TRATADOS COM *T. aurantiacus*, NA PRESENÇA DE 0,5% DE GLICOSE

PORCENTAGEM DE PERDA	
PESO	6,20 ⁺ 1,5
EXTRATIVOS	59,0 ⁺ 1,2
CELULOSE	0,00
HEMICELULOSE	9,80 ⁺ 1,0
LIGNINA	5,20 ⁺ 1,1

Os valores da tabela correspondem a média de 3 medições ⁺ desvio

T. aurantiacus atacou preferencialmente os extrativos (substâncias fenólicas, carboidratos, ceras, graxas, etc.) da madeira, cavacos e serragem, de *E. grandis*, provocando uma perda de 50-60% em 21 dias. A queda de lignina foi pequena, comparada com as perdas provocadas por conhecidos fungos ligninolíticos, como *P. chrysosporium* (cepa ME-PC-8) (23% de perda de lignina, após 60 dias de cultivo) (Blanchette e col., 1988). A queda de extrativos pode ser benéfica na fabricação de pastas celulósicas, já que a retirada destas substâncias promove o aumento no rendimento de celulose e um menor consumo de produtos químicos para este fim (D'Almeida, 1988). Assim, uma otimização da biodegradação de madeira por *T. aurantiacus* se faz necessária, pensando na utilidade do fungo no pré-tratamento de madeiras a serem utilizadas na obtenção de pastas celulósicas e papel.

5. - CONCLUSÃO GERAL

- A otimização das condições de crescimento e a definição de um meio para o melhor crescimento da cepa brasileira de *T.aurantiacus*, foram obtidas através da utilização de métodos estatísticos. O meio agar Czapek modificado, no qual a máxima velocidade de crescimento foi obtida ($4,74 \pm 0,02$ mm/h), continha 0,8% (p/v) (8,0 g/l) de glicose como fonte de carbono e 37,8 mEq/l (3,2 g/l) de NaNO_3 como fonte de nitrogênio. O pH do meio e a temperatura de cultivo foram 6,0 e 48°C , respectivamente.

- A produção de proteína unicelular (SCP) pelo *T.aurantiacus*, também foi abordada. Quando o fungo foi cultivado em caldo Czapek contendo 1,5% de glicose, obteve-se uma proteína com alto teor em aminoácidos essenciais. A qualidade da proteína de *T.aurantiacus* mostrou-se comparável à qualidade da proteína de soja e da proteína sugerida pela FAO.

- No caldo de cultivo de *T.aurantiacus*, que continha 1,5% de glicose como fonte de carbono, foi detectada a presença de metanol e etanol (determinação qualitativa), provavelmente, produzidos por fermentação da glicose. Etanol e metanol, estiveram presentes tanto nos caldos obtidos sob condições estacionárias, quanto agitadas (150 rpm).

- O *T.aurantiacus* foi cultivado em caldo Czapek, com diferentes substratos de crescimento, lignocelulósicos e não lignocelulósicos. O fungo produziu uma variedade de enzimas extracelulares, em maior ou menor quantidade, em todos os substratos testados. As atividades enzimáticas presentes nos filtrados dos caldos de cultivo (extrato cru), foram: endo-glicanase, β -glicosidase, xilanase, β -xilosidase e fenol oxidases extracelulares.

A atividade de endo-glicanase foi obtida em cultura, estacionária e agitada, que continha glicose numa concentração inicial de 1,5%, sendo que uma máxima atividade (1,49 UI/ml, em

cultura estacionária), foi alcançada quando a glicose do meio caiu para 0,3%, no sexto dia de cultivo.

A máxima atividade xilanase (1,2 UI/ml), foi obtida quando o fungo foi cultivado em meio contendo glicose 1,5%, no sexto dia de cultivo, sob condições estacionárias. Quando o meio continha xilana 1,5%, a atividade xilanase foi de 0,53 (UI/ml), no décimo dia de cultivo, sob condições estacionárias.

As atividades β -glicosidase e β -xilosidase, estiveram presentes em quantidades mínimas e, as vezes, até ausentes, ao menos extracelularmente.

O fungo apresentou atividade fenol oxidase (possivelmente do tipo lacase), quando foi cultivado em meio contendo glicose mais serragem de *E. grandis*, sob condições estacionárias. Nestas condições foram obtidas altas atividades enzimáticas com capacidade de oxidar o-dianisidina (92,7 U/l) e siringaldazine (42,7 U/l). Contrariamente, nenhuma atividade fenol oxidase foi observada quando a cultura continha apenas glicose, sendo provável que a produção destas enzimas seja induzida pela serragem de *E. grandis*.

- O *T. aurantiacus* provocou uma perda de peso de 6,7%, quando serragem de *E. grandis* foi tratada com o fungo durante 21 dias a 50°C, na presença de 0,5% de glicose como co-substrato. A perda de lignina foi de 15,0% nestas mesmas condições. Sendo que os componentes mais alterados após os 21 dias foram os extractivos, com 64,4% de perda.

A cepa brasileira de *Thermoascus aurantiacus* mostrou-se um eficiente produtor de enzimas lignocelulolíticas. O potencial do fungo, portanto, poderia ser aproveitado no tratamento de resíduos lignocelulósicos, como casca de arroz, bagaço de cana, etc. (enriquecimento, biodegradação, etc.) ou no pré-tratamento de madeiras a ser utilizadas na indústria de polpa e papel.

6. - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ander, P. e Eriksson, K.-E. (1978) Lignin Degradation and Utilization by Microorganisms. Em: Progress in Industrial Microbiology, M.J. Bull (ed.), Elsevier, Amsterdam, 14: 1-58
- Ander, P. e Eriksson, K.-E. (1985) Methanol formation During Lignin Degradation by *Phanerochaete chrysosporium*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 21: 96-102
- Ander, P., Eriksson, M.E.R. e Eriksson, K.-E. (1985) Methanol Production from Lignin-related Substances by *Phanerochaete chrysosporium*. Physiol.Plant. 65: 317-321
- ASTM Methods (1966a) Standard Method for Preparation of Extractive-Free Wood, p. 398-400
- ASTM Methods (1966b) Standard Method of Test for Lignin in Wood, p. 396-398
- ASTM Methods (1966c) Standard Methods of Test for One Per Cent Caustic Soda Solubility of Wood, p. 414-415
- Auer, C.G., Barrichelo, L.E.G. e Ferrari, M.P. (1986) Utilização do Fungo Termófilo *Thermoascus aurantiacus* na Degradação Dirigida de Cavacos de Eucalipto. Silvicultura, São Paulo, 11: 194
- Bailey, P.J., Liese, W., Roesch, R., Keilich, G. e Afting, E.G. (1971) Cellulase (β -1,4-Glucan 4 Glucanohydrolase) from the Wood-degrading Fungus *Polyporus schweinitzu* Fr. Biochim. Biophys.Acta 185: 381-391
- Beldman, G., Van Leeuwen M.F., Rombouts, F.M. e Voragen, F.G.J. (1985) The Cellulase of *Trichoderma viridae*: Purification, Characterization, and Comparison of all Detectable Endoglucanase, Exoglucanase and β -Glicosidases. Eur. J. Biochem. 146: 301-308
- Bisaria, V.S. e Ghose, T.K. (1981) Biodegradation of Cellulosic Materials: Substrates, Microorganisms, Enzymes and Products. Enzyme Microbiol.Technol. 3: 90-103
- Blanchette, R.A., Burnes, T.A., Gary, F.L. e Effland, M.J. (1988) Selection of White-rot Fungi for Biopulping. Biomass 15: 93-101
- Block, R.J. e Bolling, D. (1951) Amino Acid Composition of

- Proteins and Foods: Analytical Methods and Results. C. C. Thomas (ed.), Springfield
- Boyer, R.F. (1986) Modern Experimental Biochemistry. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc., p. 241-254
- Box, G.E., Hunter, W.G. e Hunter, J.S. (1978) Statics for Experimenters. J. Wiley e Sons, Inc., N.Y., 10: 306-351
- Bradford, M.M. (1976) A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. Anal.Biochem. 72: 248-254
- Chaudhary, K. e Tauro, P. (1982) Selective Induction of β -glucosidase in *Trichoderma reesei* by Xylan. Eur.J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 15: 185-187
- Clermont, S., Charpentier, M. e Percheron, F. (1970) Polysaccharidases from *Sporocytophaga myxococcoides*: β -mannanase, cellulase and xylanase. Bull. Soc. Chim.Biol. 52: 1481-1495
- Cooney, D.G. e Emerson, R. (1964) Thermophilic Fungi. An Account of their Biology, Activities, and Classification. W.H. Freeman and Company, San Francisco, p. 1-188
- Cooney, C.L. (1981) Growth of Microorganisms. Em: Biotechnology, 1. Microbial Fundamentals, H.J. Rehm e G. Reed (eds.), Florida. 2: 73-112
- Crawford, R.L. (1981) Lignin Biodegradation and Transformation. J. Wiley e Sons, Inc., N.Y., 4: 1-38
- D'Almeida, M.L.O. (1988) Composição Química dos Materiais Lignocelulósicos. Em: Celulose e Papel, I (Tecnologia de Fabricação de Pasta Celulósica), IPT, São Paulo, 3: 15-44
- Dekker, R.F.H. (1985) Biodegradation of the Hemicelluloses. Em: Biosynthesis and Biodegradation of Wood Components, T.Higuchi (ed.), Academic Press, N.Y., p. 505-533
- Dekker, R.F.H. (1989a) Hidrolisis Enzimática de Lignocelulósicos. Apostila do IX Curso Internacional de Engenharia Bioquímica. Escuela de Ingeniería Bioquímica, Universidad Católica de Valparaíso (Chile), p. 1-132
- Dekker, R.F.H. (1989b) Enzymatic Hydrolysis of Plant Polysaccharides Substrates for Fermentation. Brazilian J.Med. Biol.Res. 22: 1441-1456

- Dekker, R.F.H. e Richards, G.N. (1976) Hemicellulases: Ocorrence, Purification, Physicochemical Properties and Mode of action. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 32: 277-352
- DIFCO Manual (1978) Czapek Solution Agar, DIFCO Lab. Inc., Michigan, USA, p. 245
- Doelle, H.W. (1981) Basic Metabolic Processes. Em: *Biotechnology*, 1. Microbial Fundamentals, H.J. Rehm e G. Reed (eds.), Florida. 3: 113-210
- Dowding, P. (1981) What is a Extreme Environment to a Fungus ?. Em: *Fungi in Extreme Environments*, Bull. British Mycol. Soc., Cambridge University Press, 15: 1-28
- Durán, N., Reyes, J.L., Baeza, J. e Campos, V. (1988) Biomass Photochemistry: XII. Chemical and Photochemical Pretreatment of Rice Hull and Its Fungal Degradation. *Biotechnol. Bioeng.* 32: 564-568
- Durán, N. (1990) Bioconversion to Single Cell Protein: Recovery of Lignocellulosic Materials to Produce Human Food as an Integrated Process. *Alimentos*, Santiago, 15: 51-61
- Durán, N., Ferraz, A. e Mansilla, H. (1990) Biopulping: A New View on Wood Delignification. *Arq. Biol. Technol.* 33: 295-315
- Eriksson, K.E. (1987) Production of H₂O₂ in *Phanerochaete chrysosporium* During Lignin Degradation. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. A* 321: 455-459
- Eriksson, K.E. (1990) Biotechnology in the Pulp and Paper Industry. *Wood Sci. Technol.* 24: 79-101
- Eriksson, K.E. e Wood, T.M. (1985) Biodegradation of Cellulose. Em: *Biosynthesis and Biodegradation of Wood Components*. T. Higuchi (ed.), Academic Press, N.Y., p. 469-503
- Eveleigh, D.E. (1983) Em: *Biomass Utilization*, W.A. Coté (ed.), NATO Advanced Study Institute, Plenum Press, N.Y., 365-391
- Eveleigh, D.E. (1987) Cellulase: a Perspective. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. A* 321: 435-447
- Fan, L.T., Lee, Y.H. e Gharapuray, M.M. (1982) The Nature of Lignocellulosic and their Pretreatments for Enzymatic Hydrolysis. *Adv. Biochem. Eng.* 23: 157-183
- Feldman, K., Lovett, J.S. e Tsao, G.T. (1988) Isolation of the Cellulase Enzymes from the Thermophilic Fungus *Thermoascus*

- aurantiacus* and Regulation of Enzyme Production. *Enzyme Microbiol. Technol.* 10: 262-272
- Fengel, D. e Wegener, G. (1984) *Wood: Chemistry, Ultrastructure Reactions*. W. de Gruyter (ed.), Berlin- N.Y., 613 p.
- Ferraz, A. e Durán, N. (1989) Effect of Various Conditions on the *Chrysonilia sitophila* TFB 27441 Growth. *Rev. Microbiol.*, São Paulo. 20: 240-245
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) (1957) Protein Requirements. FAO Nutritional Studies, Italia, 16
- Glenn, J.K. e Gold, M.H. (1983) Decolorization of Several Polymeric Dyes by the Lignin-Degrading Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 45: 1741-1747
- Glenn, J.K., Morgan, M.A., Mayfield, M.B., Kuwahara, M. e Gold, M.H. (1983) An Extracellular H₂O₂-requiring Enzyme Preparation Involved in Lignin Biodegradation by the White-rot Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 114: 1077-1083
- Goldstein, I.S. (1981) Chemicals from biomass: Present Status. *Forest. Products J.* 31: 63-68
- Grajek, W. (1986) Temperature and pH Optimum of Enzyme Activities Produced by Cellulolytic Thermophilic Fungi in Batch and Solid-State Cultures. *Biotechnol. Lett.* 8: 587-590
- Grajek, W. (1987a) Comparative Studies on the Production of Cellulases by Thermophilic Fungi in Submerged and Solid-State Fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 26: 126-129
- Grajek, W. (1987b) Production of D-xylanases by Thermophilic Fungi Using Different Methods of Culture. *Biotechnol. Lett.* 9: 353-356
- Greasham, R. e Inamine, E. (1986) Nutritional Improvement of Processes. Em: *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology*, A.L. Demain e N.A. Solomon (eds.), Washington D.C. 4: 41-48
- Haemmerli, S.D., Fiechter, A. e Leisola, M.S.A. (1988) Lignin Biodegradation: New Developments. *Int. Biotechnol. Symp.* 8th, 2: 1030-1041

- Higuchi, T. (1990) Lignin Biochemistry : Biosynthesis and Biodegradation. Wood Sci. Technol. 24: 23-63
- Ho, C., Jurasek, L. e Paice, M.G. (1990) The Effect of Inoculum on Bleaching of Hardwood Kraft Pulp with *Coriolus versicolor*. J. Pulp Pap. Sci. 16: 78-83
- Imrie, F.K.E. e Tilbury, R.H. (1972) Polyssacharides in Sugar Cane and Its Products. Sugar Technol. Rev. 1: 291-361
- Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal. O setor florestal brasileiro 79/85. Brasilia, 1985, 65 p.
- Jain, M.K., Kapoor, K.K. e Mishra, M.M. (1979) Cellulase Activity, Degradation of Cellulose and Lignin, and Humus Formation by Thermophilic Fungi. Trans. Br. Mycol. Soc. 73: 85-89
- Johnsrud, S.C. e Eriksson, K.E. (1985) Cross-breeding of Selected and Mutated Homokaryotic Strains of *Phanerochaete chrysosporium* K-3: New Cellulase-deficient Strains with Increased Ability to Degrade Lignin. Appl. Microbiol. Technol. 21: 230-327
- Jurasek, L. e Paice, M.G. (1988) Biological Treatments of Pulps. Biomass 15: 103-108
- Käärik, A. (1974) Decomposition of Wood. Em: Biology of Plant Litter Decomposition, C.H. Dickinson e G.J.F. Pugh (eds.), Academic Press, Londres, 1: 129-174
- Katayama, Y., Nishida, T, Morohoshi, N. e Kuroda, K. (1989) The Metabolism of Biphenyl Structures in Lignin by the Wood-rotting Fungus *Coriolus versicolor*. FEMS Microbiol. Lett. 61: 307-314
- Kawamori M., Morikawa, Y., Shinsha, Y., Takayama, K. e Takasawa, S. (1985) Preparation of Mutants Resistant to Catabolite Repression of *Trichoderma reesei*. Agric. Biol. Chem. 49: 2875-2879
- Kawamori, M., Takayama, K. e Takasawa, S. (1987) Production of Cellulase by a Thermophilic Fungus, *Thermoascus aurantiacus* A-131. Agric. Biol. Chem. 51: 647-654
- Khandke, K.M., Vithayathil, P.J. e Murthy, S.K. (1989) (a) Purification of Xylanase, B-glucosidase, Endocellulase, and Exocellulase from a Thermophilic Fungus, *Thermoascus aurantiacus*,

- (b) Degradation of Larchwood Xylan by Enzymes of a Thermophilic Fungus, *Thermoascus aurantiacus*,
- (c) Purification and Characterization of an α -D-glucuronidase from a Thermophilic Fungus *Thermoascus aurantiacus*. Arch. Biochem. Biophys. 274: 491-517
- Kihlberg, R. (1972) The Microbe as a Source of Food. Ann. Rev. Microbiol. 26: 427-426
- Kirk, T.K. (1987) Lignin-degrading Enzymes. Phil. Trans. R. Soc. Lond. A 321: 461-474
- Kirk, T.K. e Moore, W.E. (1972) Polysaccharide Integrity as Related to the Degradation of Lignin in Wood by White-rot Fungi. Phytopatol. 63: 1504-1507
- Kirk, T.K. e Shimada, M. (1985) Lignin Biodegradation: The microorganisms Involved and the Physiology and Biochemistry of Degradation by White-rot Fungi. Em: Biosynthesis and Biodegradation of Wood Components, T. Higuchi (ed.), Academic Press, N.Y., p. 579-605
- Kirk, T.K., Tien, M., Johnsrud, S.C. e Eriksson, K.E. (1986) Lignin Degrading Activity of *Phanerochaete chrysosporium* Burds: Comparison of Cellulase-negative and Other Strains. Enzyme Microbiol. Technol. 8: 75-80
- Kirk, T.K. e Farrell, R.L. (1987) Enzymatic "Combustion": The Microbial Degradation of Lignin. Ann. Rev. Microbiol. 41: 465-505
- Koga, M.E.T. (1988) Matérias-Primas Fibrosas. Em: Celulose e Papel I (Tecnologia de Fabricação de Pasta Celulósica). IPT (ed.), 2: 15-44
- Kuwahara, M., Glenn, J.K., Morgan, M.A. e Gold, M.H. (1984) Separation and Characterization of Two Extracellular H₂O₂-dependent Oxidases from Ligninolytic Cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. FEBS Lett. 169: 247-250
- Lee, Y.H., Fan, L.T. e Fan, L.S. (1980) Properties and Mode of Action of Cellulase. Em: Adv. Biochem. Eng., A. Fiechter (ed.), Berlin, N.Y., 17: 101-128
- Lee, H., Atkin, A.L., Barbosa, M.F.S., Dorscheid, D.R. e Schneider, H. (1988) Effect of Biotin Limitation on the Conversion of Xylose to Ethanol and Xylitol by *Pachysolen*

- tannophilus* and *Candida guilliermondii*. Enzyme Microbiol. Technol. 10: 81-83
- Leisola, M.S.A., Kozulic, B., Meussdoerffer, F. e Flechter, A. (1987) Homology Among Multiple Extracellular Peroxidases from *Phanerochaete chrysosporium*. J. Biol. Chem. 262: 419-424
- Linko, S. (1988) Production and Characterization of Extracellular Lignin-Peroxidase from Immobilized *Phanerochaete chrysosporium* in a 10-l Bioreactor. Enzyme Microbiol. Technol. 10: 410-417
- Litchfield, J.N. (1983) Single-Cell Proteins. Science 219: 740-746
- Lodh, S.B. (1986) Bio-conversion of Ligno-cellulosic Biomass with Special Reference to Pulp and Paper Manufacture. Ind. Pulp Pap. 5: 5-14
- Mandels, M. (1975) Microbial Sources of Cellulase. Biotechnol. Bioeng. Symp. 5: 81-105
- Mandels, M., Andreotti, R. e Roche, C. (1976) Measurement of Saccharifying Cellulose. Biotechnol. Bioeng. Symp. 6: 2-34
- Miehe, H. (1907) Die Selbsterhizzung des Hues. Em: Biologische Studie, G. Fisher (ed.), p. 1-127
- Miller, G.L. (1959) Use of Dinitrosalicylic Reagent for the Determination of Reducing Sugar. Anal. Chem. 31: 426-428
- Mishra, Ch., Forrester, I.T., Kelley, B.D., Burgess, R.R., e Leatham, G.F. (1990) Characterization of a Major Xylanase Purified from *Lentinula edodes* Cultures Grown on a Commercial Solid Lignocellulosic Substrate. Appl. Microbiol. Biotechnol. 33: 226-232
- Montenecourt, B.S., Nhlapo, S.K., Trimino-Vasquez, H., Cuskey, S., Schambert, D.H. e Eveleigh, D.E. (1981) Regulatory Controls in Relation to Overproduction of Fungal Cellulases. Em: Trends in the Biology of Fermentations for Fuels and Chemicals, A. Hollaender, R. Rabson, P. Rogers, A. San Pietro, R. Valantine e R. Wolfe (eds.), N.Y., p. 33-53
- Moore-Landecker, E. (1972) Physiology and Reproduction. Em: Fundamentals Fungi. Prentice-Hall, N.Y., p. 145
- Morohoshi, N., Shibuya, Y., Murayama, A., Katayama, Y. e Haraguchi, T. (1989) Properties of the Phenol-oxidases Secreted by *Coriolus versicolor* in Wood-meal Medium I.

- Mokuzai Gakkaishi 35: 342-347
- Mullings, R. (1985) Measurement of Saccharification by Cellulases. *Enzyme Microbiol. Technol.* 7: 586-591
- Nimz, H. (1974) Beech Lignin, Proposal of a Constitutional Scheme. *Angew Chem.* 86: 336-344
- Ogundero, V.W. (1979) Amylase and Cellulase Activities of Thermophilic Fungi Causing Deterioration of Tobacco Products in Nigeria. *Mycopathol.* 69: 131-135
- Oriaran, T.P., Labosky, P.Jr. e Blankenhorn, P.R. (1990) Kraft Pulp and Papermaking Properties of *Phanerochaete chrysosporium* -degraded Aspen. *TAPPI* 73: 147-152
- Paice, M.G., Jurasek, L., Ho, C., Bourbonnais, R. e Archibald, F. (1989) Direct Biological Bleaching of Hardwood Kraft Pulp with the Fungus *Coriolus versicolor*. *TAPPI* 72: 217-221
- Pereira, H. e Sardinha, R. (1984) Chemical Composition of *Eucalyptus globulus* Lab. *Appita* 37: 661-664
- Phillips, J.A. (1985) It Need not be "Feedstock or Food". *Chemtech.* June: 377-384
- Plummer, D.T. (1978) An Introduction to Practical Biochemistry, McGraw Hill, Londres, UK, p. 156-159
- Poincelot, R.P. e Day, P.R. (1972) Simple Dye Release Assay for Determining Cellulolytic Activity of Fungi. *Appl. Microbiol.* 23: 875-879
- Press, W.H., Flannery, B.P., Tenkolsky, S.A. e Vetterling, N.T. (1987) Numerical Recipes (The art of Scientific Computing), Cambridge University, N.Y. - Sydney. 10: 274-334
- Reid, I. (1989) Solid-State Fermentations for Biological Delignification. *Enzyme Microbiol. Technol.* 11: 786-802
- Reinhammar, B. (1984) Laccase. Em: Copper Proteins and Copper Enzymes, R. Lontie (ed.), CRC Press, Boca Raton 3: 2-35
- Rosenberg, S.L. (1975) Temperature and pH Optima for 21 species of Thermophilic and Thermotolerant Fungi. *Can. J. Microbiol.* 21: 1535-1540
- Rosenberg, S.L. (1978) Cellulose and Lignocellulose Degradation by Thermophilic and Thermotolerant Fungi. *Mycologia* 70: 1-13
- Roger, J.C. e Nakas, J.P. (1990) Interrelation of Xylanase Induction and Cellulase Induction of *Trichoderma*

- longibrachiatum*. Appl. Environ. Microbiol. 56: 2535-2539
- Ryan, F.J., Beadle, G.W. e Tatum, E.L. (1943) The Tube Method of Measuring Growth Rate of *Neurospora*. Amer.J.Bot. 30: 784-799
- Schoemaker, H.E. e Leisola, M.S.A. (1990) Degradation of Lignin by *Phanerochaete chrysosporium*. J. Biotechnol. 13: 101-109
- Sharma, H.S.S. (1989) Economic Importance of Thermophilous Fungi. Appl. Microbiol. Biotechnol. 31: 1-10
- Shavers, C.L., Marsons, M.L. e Deming, S.N. (1979) Simplex Optimization of Chemical Systems. J.Chem. Education 56: 307-309
- Shepherd, M.G., Tong, Ch. e Cole, A. (1981) Substrate Specificity and Mode of Action of the Cellulases from the Thermophilous Fungus *Thermoascus aurantiacus*. Biochem.J. 193: 67-74
- Sidaway, S. (1988) The Availability and Use of Eucalyptus Pulps. TAPPI, 71: 47-51
- Smith, R.E. (1977) Rapid Tube Test for Detecting Fungal Cellulase Production. Appl. Environ. Microbiol. 33: 980-981
- Smith, J.E. (1988) Em: Biotechnology, E. Arnold (ed.), Londres, 6: 60-71
- Stewart, J.C., Lester, A., Milburn, B. e Parry, J.B. (1983) Xylanase and Cellulase production by *Aspergillus fumigatus* Fresenius. Biotechnol. Lett. 5: 543-548
- Strange, R.S. (1990) Introduction Experiment Design for Chemists. J. Chem. Education 67: 113-115
- Szklarz, G.D., Antibus, R.K., Sinsabaugh, R.L. e Linkins, A. (1989) Production of Phenol Oxidases and Peroxidases by Wood-rotting Fungi. Mycol. 81: 234-240
- Tan, L.U.L., Mayers, P. e Saddler, J.N. (1987) Purification and Characterization of a Thermostable Xylanase from a Thermophilic Fungus *Thermoascus aurantiacus*. Can.J.Microbiol. 33: 689-692
- Tanaka, M. e Matsuno, R. (1985) Conversion of Lignocellulosic Materials to Single-Cell Protein. Enzyme Microbiol.Technol. 7: 197-206
- Tansey, M.R. (1971) Isolation of Thermophilic Fungi from Self-Heated Industrial Wood Chip Piles. Mycologia 63: 537-547
- Tashpulatov, Zh. e Yusupova, I.Kh. (1976) Study of the

- Cellulolytic Activity of Thermophilic Fungi. *Uzb. Biol.Zh.* 1: 14-16
- Testore, B.S. e Obert, F. (1986) Kinetics Properties and Mechanism of Action of an Intracellular β -glucosidase from *Thermoascus aurantiacus* Miehe. *Ital.J. Biochem.* 35: 207-220
- Tien, M. e Kirk, T.K. (1983) Lignin-Degrading Enzyme from the Hymenomycete *Phanerochaete chrysosporium* Burds. *Science* 221: 661-663
- Tien, M. e Kirk, T.K. (1984) Lignin-degrading Enzyme from *Phanerochaete chrysosporium*: Purification, Characterization, and Catalytic Properties of a Unique H₂O₂-requering Oxygenase. *Proc. Nat.Acad. Sci. USA* 81: 2280-2284
- Toda, S., Suzuki, H. e Nisizawa, K. (1971) Some Enzymatic Properties and the Substrate Specificities of *Trichoderma* Cellulases with Special Reference to their Activity Towards Xylan. *J.Ferment. Technol.* 49: 499-521
- Tong, Ch., Cole, A. e Shepherd, M.G. (1980) Purification and Properties of the Cellulases from the Thermophilic Fungus *Thermoascus aurantiacus*. *Biochem J.* 191: 83-94
- Tran, A.V. e Chambers, P. (1987) Delignification of an Unbleached Hardwood Kraft Pulp by *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 25: 484-490
- Ulmer, D.C., Leisola, M. e Fiechter, A. (1984) Possible Induction of the Ligninolytic System of *Phanerochaete chrysosporium*. *J. Biotechnol.* 1: 13-24
- Wagemann (1984) Bioconversión de Lignocelulósicos. *Anales de la 2^a Semana de la Energia.* Universidad de la Frontera, Temuco (Chile), p. 60
- Waslien, C.I. (1975) Unusual Sources of Protein for Man. *Crit. Rev.Fd. Sci.Nutr.* 6:77-151
- Wiegel, J. (1990) Temperature Spans for Growth: Hypothesis and Discussion. *FEMS Microbiol.Rev.* 75: 155-170
- Wojtczak, G., Breuil, C., Yamada, J. e Saddler, J.N. (1987) A Comparison of the Thermostability of Cellulases from Various Thermophilic Fungi. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 27: 82-87
- Wong, K.K.Y., Tan, L.U.L. e Saddler, J.N. (1988) Multiplicity of β -1,4-xylanase in Microorganisms: Functions and Applications.

Microbial Rev. 52: 305-317

- Wood, T.M. (1985) Properties of Cellulolytic Systems. Biochem. Soc. Trans. 13: 407-410
- Wood, T.M. e McCrae, S.I. (1979) Synergism Between Enzymes Involved in the Solubilization of Native Cellulose. Adv.Chem. Ser. 181: 181-209
- Woodward, J. e Wiseman, A. (1982) Fungal and Other β -glucosidases: their Properties and Applications. Enzyme Microbiol.Technol. 4: 73-79
- Yu, E.K.C., Tan, L.U.L., Chan, M.K-H., Deschatelets, L. e Saddler, J.N. (1987) Production of Thermostable Xylanase by a Thermophilic Fungus, *Thermoascus aurantiacus*. Enzyme Microbiol.Technol. 9: 16-24