



1150000784

T/UNICAMP
Ur3e
BCCL

FACULDADE DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

*ERRO NO
título
celulose*

ESTUDO COMPARATIVO DA PRODUÇÃO DE
CELULASE FÚNGICA POR FERMENTAÇÃO
SUBMERSA E POR CULTURA EM
SEMI-SÓLIDO

Alberto Burgos Urieta
Eng^o Químico

ORIENTADOR

Dr. Young K. Park

Professor Titular da Faculdade de Tecnologia de Alimentos

Tese apresentada à Faculdade de Tecnologia de Alimentos da
Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título
de Mestre em Ciências em Tecnologia de Alimentos

A minha mãe, Luisa Vda. de Burgos

A meus irmãos: Maria Luisa de Perez

Jaime Enrique Burgos

Nazario Burgos

*A minha esposa Yila, muito especialmente,
pelo apoio e compreensão.*

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

C O N T E Ú D O

página

RESUMO

SUMMARY

	CAPÍTULO I	INTRODUÇÃO.	1
	CAPÍTULO II	REVISÃO DA LITERATURA	2
		2.1. Conceito de componentes C_1 e C_x da celulase.....	3
		2.2. Produção de celulase fúngica.....	9
		2.2.1. Por fermentação submersa.....	9
		2.2.2. Por cultura em semi-sólido.....	14
		2.3. Aplicações.....	15
	CAPÍTULO III	MATERIAIS	18
		3.1. Microrganismos.....	18
		3.2. Equipamento para o desenvolvimento das fermentações.....	18
		3.3. Reagentes e equipamentos complementares.....	18
	CAPÍTULO IV	MÉTODOS	20
		4.1. Preparação das culturas estoque.....	20
		4.2. Preparação do inóculo.....	20
		4.3. Processo fermentativo.....	21
		4.3.1. Fermentação submersa.....	21
		4.3.2. Cultura em semi-sólido.....	22
		4.4. Técnicas de recuperação e análise do produto enzimático.....	23
		4.4.1. Recuperação do produto enzimático.....	23
		4.4.2. Determinação da atividade de celulase C_1	25
		4.4.3. Determinação da atividade de celulase C_x	25
		4.4.4. Determinação da atividade de xilanase.....	26
		4.4.5. Determinação da atividade de protopectinase.....	27
		4.4.6. Determinação da atividade proteolítica.....	27
		4.4.7. Determinação de pH.....	28
		4.4.8. Determinação de proteína.....	28

CAPÍTULO	V	RESULTADOS E DISCUSSÃO.	29
		5.1. Comparação das atividades enzimáticas (celulase C_1 e C_x , xil lanase e protopectinase) em submerso e semi-sólido para <u>T.</u> <u>viride</u>	29
		5.2. Comparação das atividades enzimáticas (celulase C_1 e C_x , xil lanase, protopectinase e protease) em submerso e semi-sól ido para <u>P. westerdijkii</u>	32
		5.3. Comparação das atividades enzimáticas (celulase C_1 e C_x , xil lanase, protopectinase e protease) em submerso e semi-sól ido para <u>A. niger</u>	35
		5.4. Comparação do potencial enzimático dos fungos <u>T. viride</u> , <u>P.</u> <u>westerdijkii</u> e <u>A. niger</u>	37
		5.5. Efeito da adição de Tween 80 na produção de celulase, xila nase e protopectinase por fermentação submersa.....	38
		5.6. Efeito de outras fontes de celulose na produção de celula se C_x e xilanase por cultura em semi-sólido.....	39
CAPÍTULO	VI	CONCLUSÕES.	41
CAPÍTULO	VII	ÍNDICE DE QUADROS, FIGURAS E APÊNDICE.	43
		Quadros.....	45
		Figuras.....	51
		Apêndice.....	78
CAPÍTULO	VIII	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.	81
		AGRADECIMENTOS.	90

R E S U M O

Foi pesquisada a produção de celulase fúngica (C_1 e C_x), expressando-se em termos de atividade enzimática, por fermentação submersa e por cultura em semi-sólido, utilizando-se farelo de trigo como fonte de carbono. Três linhagens de fungos imperfeitos foram testados: Aspergillus niger ATCC 1004, Trichoderma viride QM 9123 e Pestalotiopsis westerdijkii QM 381. Para a fermentação submersa, em frascos agitados, utilizou-se o meio básico de Reese e Mandels com adição de 0,1% de ascorbato de sódio e 0,1% de acetato de sódio. Para a cultura em semi-sólido, foi utilizado somente farelo de trigo com 40 - 45% de umidade. Durante o processo fermentativo estudaram-se também as produções de xilanase, protopectinase e protease.

Verificou-se que a cultura em semi-sólido é mais eficiente na produção de enzimas celulolíticas, como também de outras enzimas, que a fermentação submersa para os fungos de T. viride e A. niger. Em semi-sólido, T. viride mostrou atividades de celulasas C_x e C_1 , xilanase e protopectinase superiores, em aproximadamente 78%, 13% (21 minutos), 86% e 22% respectivamente, com relação as obtidas por fermentação submersa. Para A. niger, em semi-sólido, as atividades de celulase C_x , xilanase e protease, foram marcadamente superiores em aproximadamente 3,5; 2,2 e 11,0 vezes respectivamente àque las obtidas por fermentação submersa.

Dentre as linhagens testadas foi selecionada Trichoderma viride QM 9123 como responsável pela produção de um "sistema celulase" C_1 e C_x mais eficiente. Para esta linhagem as atividades máximas de celulase C_1 e C_x foram obtidas num período de fermentação de 48 horas, em submerso, enquanto que em semi-sólido foram necessários períodos de 48 e 96 horas, respectivamente.

A adição de 0,1% de um surfatante não iônico (Tween 80), ao meio para fermentação submersa, foi eficiente no aumento de produção de celulasas C_1 e C_x , xilanase e protopectinase para o fungo T. viride. Aumentos de produção da ordem de 48%, 30% (49 minutos),

26% e 60% foram obtidos respectivamente, para celulase C_x , celulase C_1 (FPA), xilanase e protopectinase, com relação ao controle sem surfatante. Nestas condições, as atividades enzimáticas em submerso e semi-sólido são muito comparáveis.

S U M M A R Y

Comparative production of fungal cellulase produced by submerged and semi-solid cultures were examined. Three strains of fungus (Aspergillus niger ATCC 1004, Trichoderma viride QM 9123, and Pestalotiopsis westerdijkii QM 381) were tested in this study. For submerged fermentation the culture was shaken and Reese and Mandel's basal medium with addition of 0.1% of sodium ascorbate and 0.1% sodium acetate was used. For semi-solid fermentation, wheat bran (40 - 45% humidity) was used. During fermentation, xylanase, protopectinase, and proteases activities were also studied.

The results showed that semi-solid culture produced more cellulolytic enzymes and other enzymes as compared to submerged culture with T. viride and Aspergillus niger. Semi-solid culture by T. viride demonstrated 78% C_x , 13% C_1 cellulase, 86% xylanase, and 22% protopectinase more than that of the submerged culture. For semi-solid culture by Aspergillus niger, activities of C_x cellulase, xylanase, and proteases were remarkably elevated to 3.5, 2.2, and 11 times, respectively as compared to its counterpart.

Comparing the three strains of fungus, Trichoderma viride QM 9123 showed a more efficient proportion of C_1 and C_x cellulase. However, this strain had maximum production of C_1 and C_x cellulase activities after 48 hours in submerged fermentation compared to 48 hours for C_1 cellulase and 96 hours for C_x cellulase in semi-solid fermentation.

Addition of 0.1% of non-ionic surfactant, such as Tween 80, to submerged fermentation efficiently elevated production of C_1 and C_x cellulase, xylanase, and protopectinase activities for T. viride. Under these conditions, enzyme activities for both submerged and semi-solid culture were similar.

C A P Í T U L O I

INTRODUÇÃO

No transcurso dos últimos anos, o estudo das enzimas fúngicas e suas aplicações tem tido um grande desenvolvimento, dando-se ênfase especial à produção e à aplicação dessas enzimas no campo da indústria alimentícia e farmacêutica. Entre essas enzimas encontram-se as celulasas, enzimas que rompem as ligações glucosídicas na celulose.

Na maioria dos organismos produtores de celulase, vários componentes celulolíticos pertencentes às classes C_1 e C_x constituem um "sistema de celulase" em que substratos celulósicos são convertidos em açúcares solúveis pela ação sinérgica destes componentes.

As celulasas fúngicas podem ser obtidas principalmente por dois processos: fermentação submersa e cultura em semi-sólido. Fungos celulolíticos crescem rapidamente em um grande número de fontes diferentes de carbono, mas a celulase é produzida somente em presença de celulose ou seus derivados incluindo celobiose. Assim, a celulase é uma enzima induzível ou adaptável.

Preparações comerciais de celulase altamente ativas, obtidas de T. viride e A. niger, encontram-se hoje disponíveis. Estas preparações tem numerosas aplicações para várias finalidades em todo o mundo. Na atualidade, as maiores aplicações destas enzimas estão no campo farmacêutico e na suplementação e preparação de rações animais. Porém, inúmeras aplicações estão em fase de experimentação, muitas com boas perspectivas. Assim a produção de enzimas celulolíticas tem um futuro promissor, levando-se ainda em consideração que as proteínas celulares destes fungos podem ser utilizadas diretamente como forragem.

C A P Í T U L O I I

REVISÃO DA LITERATURA

Celulase microbiana é uma enzima extracelular complexa, produzida por todos os fungos e bactérias celulolíticas. Ela degrada cadeias de celulose por hidrólise de ligações glucosídicas β -1,4 (34.).

As celulases, em sua maioria, têm sido apontadas como capazes de hidrolizar β -1,4 D- glicanos em uma forma causal e podem ser sistematicamente designadas como β -1,4 - glucano glucanohidrolases (EC nº 3,2,1,4) (40,43,44,62,63,64).

Entre os primeiros estudos sobre celulases a nível enzimático, estão os de KARRER et al., citados em (41), os quais utilizaram para seus trabalhos, enzimas procedentes do suco digestivo de caracol. Estes pesquisadores sugeriram que a celulase de caracol retirava unidades de celobiose a partir do final das cadeias de celulose, uma vez que celobiose foi o produto predominante da hidrólise.

PRINGSHEIM, citado em (41) verificou que a degradação enzimática de celulose nativa realiza-se através das seguintes fases: 1) desintegração da estrutura micelar da celulose; 2) degradação das moléculas de celulose em β -1,4 oligoglicosídeos 3) Conversão de β -1,4 oligoglicosídeos em glicose.

GRASSMANN et al (16), estudando um sistema de celulase fúngica, reconheceram pelo menos dois componentes; a celobiase, para a qual servia como substrato uma série de β -1,4 oligoglicosídeos de grau de polimerização até cerca de 6; e a celulase, que requeria, como substrato β -1,4 oligoglicosídeos de grau de polimerização muito mais elevado do que aqueles. Estes autores encontram apoio para suas suposições na hipótese anteriormente proposta por PRINGSHEIM.

Em uma formulação mais recente do processo, REESE, SIU e LEVINSON (57) sugeriram que o primeiro passo na degradação de celulose insolúvel era a função da celulase C_1 e o segundo da celulase C_x .

As enzimas C_x representam, como é geralmente aceito, a ação típica das enzimas que hidrolizam polisacarídeos. Este grupo de enzimas pode ser preferivelmente designado como β -1,4 glicanases com a finalidade de preservar o termo "celulase" para a ação combinada de C_1 e C_x . Assim β -1,4 glicanases (celulases C_x) hidrolizam celulose cristalina em presença de C_1 . Na ausência de C_1 , as β -1-4 glicanases podem degradar (a) derivados de celulose (carboximetilcelulose), (b) celulose que tem sido modificadas (celulose entumecida), por moido, ácido concentrado ou alcali, e (c) vários glicanos contendo mistura de ligações, incluindo ligações β -1,4, tais como β -glicanos de aveia e cevada. Os microrganismos celulolíticos, crescendo sobre celulose nativa produzem celulases C_1 e C_x . Porém C_1 não é encontrada em quantidade apreciável nos filtrados de cultura da maioria dos organismos celulolíticos ou na maioria das preparações comerciais de celulase (36).

Algumas celulases possuem uma capacidade relativamente elevada para degradar celulose insolúvel, assim como celulose nativa, com relação a derivados solúveis de celulose, enquanto que outras mostram uma afinidade inversa (45, 59, 60, 69).

2.1. - Conceito de componentes C_1 e C_x da celulase.

Em 1950, REESE et al. (57) sugeriram que celulose insolúvel, particularmente a celulose nativa, é sujeita a um ataque enzimático preliminar antes de sua solubilização. A hidrólise seguinte ocorre nas ligações glicosídicas β -1,4 das cadeias de celulose solubilizadas. As enzimas responsáveis por estes dois processos foram chamadas pelos autores C_1 e C_x , respectivamente. Assim C_1 é possivelmente uma enzima que quebra poucas ligações glicosídicas β -1,4 na fibra de celulose ou algumas outras ligações. Alternativamente C_1 pode ser uma enzima que quebra pontes de hidrogenio entre cadeias, de celulose, mas até o presente não tem sido publicado nenhum trabalho em que este tipo de C_1 tenha sido isolado. Por outro lado o composto C_x é responsável pela hidrólise de celulose amorfa, ocasionando a quebra de ligações glicosídicas β -1,4, como em carboximetilcelulose, β -1,4 oligoglicosídeos, algodão entumecido, etc.

Celulose nativa sofrendo ataque por celulasas, mostra ex-
tensas mudanças em suas propriedades físicas antes que haja produ-
ção de uma quantidade mensurável de açúcar redutor, tais como fra-
cionamento transversal, uma considerável perda em resistência à
tração, um decréscimo no grau de polimerização, um incremento na
capacidade de incorporar umidade e álcali, ocorrendo ainda fragmen-
tação em pequenas fibras separáveis. Estas mudanças ocorrem simul-
tanea ou sucessivamente. Para explicar a fragmentação destas fi-
bras muitas pesquisas notáveis têm sido realizadas por HALLIWELL
(19) e por MARSH (37) usando filtrados de cultura de Trichoderma.

HALLIWELL et al (19) verificaram que vários fragmentos
insolúveis, mas degradados, são produzidos do algodão nas primei-
ras etapas do ataque celulolítico. Isto parece ser causado por uma
mistura de componentes da celulase que agem por mecanismo inteiri-
mente ao acaso. Tais fragmentos foram, então, convertidos em açu-
cares redutores, possivelmente por celulasas diferentes das que ca-
talizaram o primeiro ataque das fibras de celulose.

Nos experimentos de MARSH (37) houve também uma pequena
produção de material solúvel durante a fragmentação de fibras de
algodão. Assim durante o tratamento de fibras de algodão nativo
com uma solução de celulase, a perda de fibra como material não se-
dimentável não excedeu a 6%, enquanto que 75% do material de parti-
da foi convertido em fibras menores. O maior dos produtos solúveis
foi glicose, mas pequenas quantidades de β -1,4 oligoglicosídeos
também foram detectadas. Este experimento não prova que o compo-
nente C_1 participe da degradação, mas parece indicar que a fragmen-
tação observada foi um resultado da maior fragilidade da fibra tra-
tada com enzima. Este investigador observou, no seus primeiros ex-
perimentos, que ocorreram fracionamentos na fibra de algodão depois
de um curto tempo de exposição a enzimas celulolíticas, de maneiri-
ra que um aumento na fragilidade da fibra de algodão pode ser de-
vido a estes fracionamentos transversais.

Um fenômeno similar foi recentemente verificado por RAU-
TELA et al. (49) e por LIU et al (30) para várias preparações de
celulose cristalina tratadas com preparações de celulase bruta de

T. viride. O microscópio eletrônico indica que o fracionamento que acompanha a degradação enzimática daquelas celuloses, parece ser iniciado com a formação de fendas longitudinais.

MANDELS et al, citados em (41) tem desenvolvido a hipótese dos componentes C_1 e C_x baseando-se na observação de que filtrados de cultura de T. viride, poderiam ser separados por cromatografia em coluna de DEAE-dextran em vários componentes que incluíam frações C_1 e C_x . O aumento de açúcar redutor em tiras de algodão e em CM-celulose foi usado como medida das atividades de C_1 e C_x , respectivamente. Estes pesquisadores sugeriram que as tiras de algodão eram primeiro solubilizadas por C_1 e transformadas em uma forma similar a celulose entumecida ou regenerada, que por sua vez era hidrolizada por C_x em fragmentos solúveis. A fração C_x não mostrou atividade para algodão mas hidrolizou celulose amorfa, assim como também CM-celulose. Purificação destas frações, C_1 e C_x , e a investigação de suas propriedades não foram registradas por estes pesquisadores.

LI et al (29) obtiveram 3 componentes celulíticos purificados de um filtrado bruto de T. viride: a) uma enzima capaz de remover sucessivamente unidades glicosil do final não-redutor do substrato-celulose amorfa (exoglucanase), b) uma enzima capaz de hidrolizar ligações internas na celulose amorfa (endoglucanase), c) um componente capaz de hidrolizar celulose cristalina. O componente C_1 (c) foi o único capaz de atacar celulose cristalina numa apreciável extensão. As enzimas exoglucanase e endoglucanase são representativas da classe de celulase descrita por REESE et al (57) como sendo C_x .

O isolamento do componente C_1 como uma entidade enzimática foi conseguido mais tarde por SELBY et al (59, 60) e por WOOD (75). Este componente foi encontrado primeiro no filtrado de cultura de T. viride e logo em outras fontes, tais como Penicillium e Fusarium (77). O componente C_1 era ativado quando a fração CM-celulase era adicionada, mas por si só mostrou uma pequena ou nenhuma capacidade celulolítica para celobiose, CM-celulose ou algodão. A presença adicional da fração celobiase mostrou maior efeito sinérgico sobre a solubilidade de algodão.

SELBY (59) sugeriu duas possíveis explicações para a ação sinérgica de C_1 e C_x : primeiro, que a enzima C_1 faz a fibra de algodão mais susceptível à ação da segunda enzima e segundo, que C_1 solubiliza o substrato, mas é inibido pelos produtos solúveis dializáveis de sua reação, até que eles sejam removidos pela ação de C_x . Sua opinião parece inclinar-se a favor da última possibilidade, já que a atividade de C_1 foi melhorada aproximadamente em 50% quando a incubação foi realizada dentro de uma bolsa de diálise, enquanto que a atividade de C_x não foi melhorada pelo mesmo processo. Esta observação foi a base para que ele preferisse a segunda possibilidade. Assim, de acordo com a teoria dos componentes C_1 e C_x , as fibras de algodão são atacadas sucessivamente por C_1 , C_x e β -glicosidade ou celobiase e são finalmente convertidas em glicose.

Estas observações, entretanto, estão em contraste com aquelas de OKADA, NISIZAWA et al (45), os quais obtiveram três frações altamente purificadas de celulase (F II, F III e F IV) de T. viride (Meicelase), cada uma das quais mostrou ambas atividades, C_1 e C_x , hidrolizando desordenadamente não só fibra de algodão e Avicel, como também CM-celulose e vários β -1,4 oligoglicosídeos exceto celobiose. Porém, as atividades dos três componentes, para cada um dos substratos, foram consideravelmente diferentes.

Em estudos mais recentes, NISIZAWA et al (42) chamaram tentativamente de Avicelase e CM-celulase, respectivamente, ao composto celulase F III, que mostrou uma atividade relativamente alta sobre Avicel e ao composto F II, que mostrou uma atividade relativamente alta sobre CM-celulose. Estes autores não tiveram sucesso ao tentar remover completamente a atividade de CM-celulase do composto celulase F III (Avicelase). Assim, eventualmente, uma atividade residual de CM-celulase permanece inseparável, parecendo ser inerente à própria Avicelase. O F II purificado (CM-celulase) sacarifica celulosas ricas em regiões amorfas, (C.M.C. e celooligosacarídeos), em um mecanismo altamente desordenado, produzindo glicose e celobiose em quantidades quase iguais; mas não ataca facilmente Avicel e algodão. Em contraste, a Avicelase purificada não hidrolizou somente celulose rica em regiões cristalinas, como Avicel e algodão, mas tam

bem celulose rica em regiões amorfas e celooligosacarídeos, produzindo quase exclusivamente celobiose destes substratos. Avicelase também hidrolizou CM-celulase, mas em uma forma consideravelmente, menos desordenada. Isto indica que a Avicelase pareceu retirar resíduos celobiosil, a partir dos finais da cadeia destes substratos. É particularmente notável que CM-celulase purificada diminui o grau de polimerização de algodão mais rapidamente que Avicelase.

Ademais, NISIZAWA et al (42), verificaram que uma mistura de CM-celulase e Avicelase mostraram um evidente efeito sinérgico para celulose altamente cristalina, tais como Avicel e algodão mas não para celuloses ricas em regiões amorfas como CM-celulose e celulose tratada com ácido fosfórico. A partir de filtrado, de cultura de Irpex lacteus, dois componentes Avicelase altamente purificados, de peso molecular marcadamente diferente, e um componente CM-celulase foram obtidos por estes pesquisadores. Estas celulases mostraram propriedades similares aquelas da Avicelase e carboximetilcelulase de Trichoderma viride, na especificidade substrato e ações sinérgicas para Avicel e algodão.

Assim a CM-celulase e Avicelase destes fungos parecem corresponder a C_x e C_1 , mas pode ser que CM-celulase promova o ataque inicial à celulose, resultando fragmentos de baixo grau de polimerização, que servem como substratos para Avicelase. Estas últimas celulases sacarificam estes fragmentos de celulose a partir dos novos terminais formados pela ação de CM-celulase. Neste sentido os nomes C_1 e C_x , que foram originalmente propostos por REESE et al. (57), podem ser usados (41).

Resultados que levaram a conclusões similares foram obtidos recentemente por PETERSON (48).

WOOD (76) e WOOD e McCRAE (78) têm obtido resultados completamente similares para Trichoderma koningi nos quais se tem exposto que um componente celulase, conceituado por eles como sendo um C_1 , exerce um papel importante na solubilização do algodão por sua ação sinérgica com um componente de atividade CM-celulase (C_x); e que C_1 ataca, em contraste ao C_1 originalmente proposto por

REESE et al. (57), alguns celooligosacarídeos, assim como também celulose tratada com ácido fosfórico (celulose entumecida), produzindo quase que unicamente celobiose deste último substrato. Para estes pesquisadores, o componente celololítico C_1 também ataca o algodão, mas lentamente, produzindo exclusivamente celobiose, de tal forma que este componente parece retirar unidades celobiosil a partir do final da cadeia dos substratos. Assim, o componente C_1 obtido por WOOD de Trichoderma koningi foi muito parecido em suas propriedades enzimáticas ao componente Avicelase obtido por NISIZAWA et al, (42), de Trichoderma Viride.

NISIZAWA (41) conclue, em sua revisão de vários autores, que o modo da ação das celulases depende aparentemente das fontes das mesmas, mas é um fato comum que a solubilização de celulose se verifica fora da célula e que somente produtos de baixo peso molecular podem entrar nela. Ainda que não esteja claro qual é o tamanho dos açúcares que são absorvidos, estes provavelmente não são maiores que trisacarídeos, já que os produtos finais de celulose pela ação da maioria das celulases, são misturadas de celobiose com pequenas quantidades de glicose e celotriose.

É particularmente notável ainda, segundo NISIZAWA (41) que vários componentes celololíticos estão frequentemente presentes no filtrado de cultura da maioria dos organismos produtores de celulase, ou como uma forma ligada a suas células, e que misturas destes componentes podem degradar, através de sua ação sinérgica, celulose nativa ou celulose cristalina em moléculas pequenas (absorvíveis), mais eficientemente que simples enzimas individuais. Verificou-se, que destas celulases, dois tipos diferentes em especificidade de substrato contribuem para o sinérgismo. Assim, o conceito de compoentes C_1 e C_x da celulase, proposto originalmente por REESE et al (57) é predominante até o presente. A caracterização desses componentes da celulase ao nível molecular tem sido feita com apenas alguns fungos.

Na atualidade, preparações enzimáticas celololíticas são fornecidas de acordo com suas atividades de celulase C_1 (atividade para degradar papel filtro) e celulase C_x ou carboximetilcelulase (atividade da enzima para carboximetil-celulose) (1,2).

Muitos estudos cinéticos de celulase têm sido efetuados , usando celulose insolúvel, assim como também seus derivados solúveis. Entretanto o modo de sua degradação não é simples, e a equação clássica de Michaelis e Menten é aplicada somente para alguns casos restritos, enquanto que tratamentos cinéticos modificados são necessários para outros. Em particular deve-se considerar que a ação da maioria das celulasas é marcadamente inibida pelos produtos de sua hidrólise. Assim, muitos problemas relativos ao modo de ação das celulasas, ainda não tem solução, Isto parece dever-se principalmente à considerável diferença na especificidade de substrato para os diferentes componentes celulíticos de um mesmo organismo. Uma hidrólise eficiente de celulose insolúvel só pode ser realizada por suas ações sinérgicas. Um importante auxílio aos estudos cinéticos das celulasas, seria, uma explicação mais completa da estrutura supra-molecular da fibra de celulose, NISIZAWA (41).

2.2. - Produção de celulasas fúngicas

Quatro métodos de cultura podem ser usados para a produção de celulasas: 1) cultura estacionária em meio líquido; 2) cultura agitada em meio líquido; 3) processo Koji (cultura em semi-sólido), em que o microrganismo cresce em um meio sólido umedecido, (ex farelo de trigo) de onde as enzimas são posteriormente extraídas, e 4) cultura submersa em meio líquido. Tem-se verificado que alguns organismos somente produzem rendimento satisfatório de enzimas em culturas estacionárias. Atualmente, fermentação em cultura submersa e cultura em meio semi-sólido são praticamente os únicos métodos usados em escala industrial para a produção de celulase fúngica(47).

2.2.1. Produção de celulase fúngica por fermentação submersa.

Entre os primeiros meios empregados para a obtenção de enzimas celulolíticas por fermentação submersa, estão os de SAUNDERS (58) e REESE et al (57). O primeiro utilizou um meio simples, constituído apenas de sais minerais e o segundo, um meio constituído de sais minerais e extrato de levedura, além das fontes de carbono.

Para as fermentações submersas, uma temperatura entre 28°C e 30°C, e um pH inicial entre 5,0 e 6,0, tem sido considerados ótimos para a maioria dos fungos celulolíticos, segundo os autores consultados (18, 33, 34, 35, 56, 57).

REESE et al. (50) verificaram que celulase é uma enzima induzível na maioria dos fungos. Os mesmos autores observaram que glicose e celobiose não induziam produção de celulase para a maioria dos fungos celulolíticos por eles testados. Filtrados de Trichoderma viride além de ter uma elevada atividade de C_x , mostraram ser os mais efetivos na degradação de celulose nativa, segundo REESE (51).

Celobiose é usualmente o primeiro produto solúvel detectável da ação de celulase. Os oligoglicosídeos, celotriose e celohexaose, são hidrolizados rapidamente, tendo uma existência fugaz (52, 74).

MANDELS e REESE (35) pesquisaram a influência de diferentes fontes de carbono e de metais na produção de celulase por Trichoderma viride. De 62 substratos testados, somente glicose, celobiose, lactose e celulose induziram produção de celulase. Segundo os mesmos pesquisadores, a composição mineral do meio tem um efeito marcado na produção de celulase. Cálcio e elementos traços, mostraram um ligeiro efeito no crescimento microbiano, mas um efeito marcante na produção de celulase. Estas exigências minerais foram as mesmas para as diferentes fontes de carbono. Por outro lado, o nível da atividade celulolítica mostrou estar estreitamente correlacionado com a quantidade de proteína no filtrado da cultura. Resultado análogo foi obtido mais tarde por MANDELS, WEBER, e PARIZEK (33).

MANDELS e REESE (34) verificaram que a concentração do indutor tem um efeito marcante na produção de C_x . Assim, para os vários substratos testados por estes pesquisadores os máximos rendimentos foram obtidos para concentração de 1%. Máximos rendimentos de C_x foram encontrados para substratos celulósicos insolúveis finamente divididos (ex. algodão), enquanto que, derivados solúveis de celulose deram rendimentos baixos. Derivados solúveis de elevado grau de

substituição, não ocasionaram indução de celulase. A enzima foi induzida quando celobiose octaacetato serviu como fonte de carbono para aqueles fungos que também produzem a esterase necessária. Segundo os mesmos pesquisadores, celobiose pode ser um indutor de celulase sempre que sua concentração no meio seja mantida baixa. Porém, mais tarde os mesmos pesquisadores verificaram inibição competitiva de celulases por celobiose e methocel (metil celulose), assim como inativação por reativos halogenados, metais pesados e detergente (36).

REESE e MANGUIRE (54, 55, 56) verificaram que a adição de Tween 80 (sorbitan polyoxyethylene monoleate) e sucrose monopalmitato, surfatantes não iônicos, a culturas fungicas resulta em um marcante aumento nas atividades de celulase, amilase, sacarose, B-1,3 glicanase, xilanase, purina nucleosidase e benzoilesterase. A ação parece ser um efeito do surfatante na permeabilidade celular, entre tanto até o presente só existem conjecturas a este respeito. Os resultados indicam que a proporção de aumentos nos rendimentos de enzimas variam de organismo para organismo e para as diferentes enzimas de um mesmo organismo. O efeito destes surfatantes não se limita somente a enzimas, uma vez que aumentos similares em rendimentos tem sido obtidos para pigmentos fúngicos (56), caroteno (28) e enterotoxinas (11). A ação destes surfatantes estimula tanto a entrada como a saída de compostos através das paredes celulares.

Celulases são notavelmente estáveis a mudanças de pH e temperatura e também a inibidores quimicos. Em geral são estáveis a 30°C dentro de uma faixa de pH de 3,0 - 8,0; ativas de 3,5 - 7,0; e usualmente mostram atividade ótima a pH de 4,0 - 5,5 em tampões de acetato, fósforo ou citrato. Celulases fúngicas sendo marcadamente estáveis ao calor, pelo menos na forma bruta, necessitam ser aquecidas a 100°C por 10 - 20 minutos para completa inativação. O compo nente C₁, que permite o ataque de celulase à celulose insolúvel, é mais termolabil que o componente hidrolítico C_x. A suscetibilidade de celulases a inibidores quimicos aumenta com o grau de purificação (36).

TOYAMA, citado em (47) verificou um pH ótimo de 4,5 para uma máxima atividade de celulase de T. koningi na degradação de

C.M.C. e um pH de 5,0 para a máxima atividade da enzima sobre celulose insolúvel. O mesmo pesquisador, verificou uma temperatura de 40°C como a ótima para uma máxima atividade e uma temperatura de 25°C para crescimento no caso de T. viride. Resultados análogos foram obtidos por SAUNDERS et al (58), para o fungo M. Verrucaria.

CHANG et al (6) propuseram um meio com extrato fúngico de Kiji (filtrado de cultura em semi-sólido de Aspergillus oryzae) e sais minerais (KH_2PO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NaNO_2 e $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$). O pH inicial era ajustado a 5,5. Geralmente em fermentações aeróbicas uma maior quantidade de oxigênio no meio é um fator importante para o rendimento. Por esta razão os mesmos pesquisadores estudaram a relação entre atividade celulolítica e oxigênio dissolvido, para culturas em frascos agitados. Ensaíram utilizando frascos erlenmeyers de 500 ml contendo 40, 60, 80, 100, 130, 170 e 200 ml de meio, agitados a 250 rpm, medindo-se a quantidade de oxigênio dissolvido pelo método de sulfito de sódio. Para estes pesquisadores, volumes de 60 - 100 ml do meio por frasco permitem obter os máximos rendimentos, não se observando diferenças significativas dentro desta faixa.

MANDELS et al (33) obtiveram uma linhagem mutante, por irradiação de conidia de T. viride QM 6a com um acelerador linear, que produz o dobro da celulase que sua linhagem de origem. Este mutanante, denominado QM 9123, tem sido usado para hidrolizar rapidamente polpa de celulose a glicose com aproximadamente 100% de conversão, produzindo um xarope de glicose de aproximadamente 15% (13). Melhoramentos adicionais neste mutante poderão originar celulases para a eliminação de poluidores celulósicos e outros problemas. Um tratamento posterior da linhagem QM 9123 produziu um mutante designadado por QM 9414, que produz altos níveis de proteína e o mesmo nível de celulase que o mutante QM 9123, segundo MANDELS et al., citados em (47).

GUPTA et al (18) estudaram o efeito das condições de cultura na produção de celulase por T. viride. Com a finalidade de obter um aumento na produção de celulase o microrganismo foi cultivado sob vários fatores de crescimentos. Celulose em pó-123 (Carl Schleicher & Schul, Dassel, W-Germany), resultou a melhor fonte de

carbono, enquanto que entre as matérias primas, palha de arroz com tratamento alcalino apresentou o melhor rendimento. Estes pesquisadores observaram que uma combinação de peptona, uréia e sulfato de amônio permite obter atividades de C_x mais elevadas que quando uma única fonte de nitrogênio é utilizada. Resultados análogos têm sido obtidos por outros pesquisadores, citados em (18). Acetato e ascorbato em concentração de 0,1% foram notáveis no aumento de produção de celulase C_x , tendo um efeito acumulativo quando adicionados juntos.

O tratamento de materiais celulósicos tem um efeito estimulante na produção de celulase como foi observado por GUPTA et al (18), para folha de jornal lavada e palha de arroz tratada com álcali, também verificado por RODZEIVICH et al., citado em (18) MANDELS et al (34, 35), obtiveram resultados análogos para celuloses finamente moída.

A adição de açúcares (sacarose, maltose, lactose, fructose, glicose, celobiose) ao meio contendo celulose, geralmente reprime o rendimento. Uma maior repressão foi observada para maltose e lactose, enquanto que a mínima para glicose (18). Inibição na produção de celulase pelos vários açúcares antes citados também têm sido verificado por HORTON e KEEN (23) e LUMSDEN (32) para diferentes organismos celulolíticos.

O fracasso na produção de celulase, quando sacarose, fructose, glicose, e celobiose servem como fontes exclusivas de carbono, têm sido verificado por JOHANSSON (24) BUCH e ERIKSSON (5), BRATHWAITE e DICKEY (4), BAILEY et al (3), FENIKSOVA (9), GUPTA et al (18) e LUMSDEN (32).

Vários agentes precipitantes podem ser utilizados na separação das enzimas celulolíticas dos filtrados de cultura: acetona, ácido tricloroacético a 5%, sulfato de amônio entre os limites de 20% e 80% de saturação, álcool isopropílico, álcool etílico e acetato de chumbo (29, 35, 47, 53, 75). Industrialmente, é utilizado quase exclusivamente o álcool etílico por ser mais barato.

Os filtrados celulolíticos também podem ser armazenados refrigerados (5°C) baixo tolueno ou congelados, sem perda apreciável de atividade (18) ou, então, concentrados a 40°C em evaporador de filme e liofilizado, sem perda de atividade (34).

MANDELS et al, citados em (47) obtiveram atividades elevadas de celulasas, com T. viride QM 9123 e T. viride QM-9414, num fermentador de 10 litros, usando 0,5% de celulose com baixa agitação (100 rpm) e aeração (0,2 vol/vol.min) a temperatura de 28°C.

2.2.2. - Produção de celulase fúngica por cultura em semi-sólido.

São poucos os trabalhos publicados sobre produção de celulase fúngica em semi-sólido, apesar de este método ser bastante utilizado em escala industrial, principalmente no Japão. TOYAMA (71) verificou que um meio celulósico sólido (ex. farelo de trigo, serragem de madeira, etc.) com aproximadamente 40 - 45% de umidade, é adequado para muitos fungos celulolíticos. Os extratos das culturas destes fungos em semi-sólido têm elevadas atividades de celulase, celobiase e amilase.

TAKAMINE, citado em (10) sugeriu um processo associado por fermentação submersa e cultura em semi-sólido para a produção de uma ampla variedade de enzimas, parecendo ter boas perspectivas, para a produção de celulase.

A cultura em semi-sólido é amplamente utilizada na produção industrial de amilase fúngica, sendo neste sentido um processo bastante antigo, PARK et al (46).

HESSELTINE (22) classifica a cultura em semi-sólido em 3 tipos: a) não agitada, b) com agitação periódica e c) com agitação contínua. Este autor e seus colaboradores têm desenvolvido vários métodos para a produção de aflatoxina, de várias linhagens de Aspergillus flavus, sobre diversos substratos sólidos agitados (trigo,, arroz e aveia), obtendo rendimentos marcadamente superiores aos obtidos por fermentação submersa (22, 61, 70).

PATHAK et al (47) mostraram um processo para a produção industrial, de celulase fúngica em meio semi-sólido de farelo de trigo (ver apêndice A). O processo inclui, desde a preparação do inóculo, por fermentação submersa, até a obtenção do preparado de celulase em pó. A solução enzimática precipitada pode tratar-se, al

ternativamente, por concentração (concentrador de membrana) e secagem em spray ou filtração (filtro prensa) e secagem em secador rotativo.

2.3. - Aplicações

Preparações comerciais de celulase altamente ativa, obtidas de Trichoderma viride e Aspergillus niger, se encontram hoje em dia disponíveis. Estas preparações tem numerosas aplicações em vários campos em todo o mundo. O Japão e os Estados Unidos são atualmente os maiores produtores de celulases (14). Em 1968 foram produzidas no Japão cerca de 5 toneladas de celulase por mes, das quais 500 kg eram exportadas para a Europa, principalmente a Alemanha Ocidental. Celulase de Trichoderma é também exportada pelo Japão para a Austrália, como suplemento para rações animais (72). Uma grande parte da celulase produzida no Japão é destinada à indústria farmacêutica, para a preparação de tabletes digestivos (14). No Japão, têm sido realizados estudos para sacarificação de resíduos celulósicos (bagaço, palha, serragem de madeira, etc), usando preparações de celulase fúngica associadas com métodos de delignificação, com a finalidade de diminuir materiais poluentes e obter açúcares fermentáveis, (produção de proteína unicelular) TOYAMA, et al (73).

Nos Estados Unidos, também a principal aplicação de celulase tem sido como ajudante digestivo, aliviando a flatulência e transtornos gástricos. Atualmente celulase é usada na extração de óleos essenciais e substâncias flavorizantes. Processadores de cítricos nos Estados Unidos têm verificado que celulase ajuda à extração e clarificação de sucos e permite obter sucos concentrados mais homogêneos e estáveis (14). Alguns estudos sobre fermentação microbiana de celulose indicam a possibilidade de usar bagaço de cana e outros resíduos celulósicos como substrato para produção de proteína unicelular (7, 20, 21, 68).

Várias aplicações de protopectinase (cell separating enzyme) de Rhizopus e celulases de Trichoderma viride e Aspergillus niger têm sido desenvolvidos por TOYAMA et al. (72) no Japão, onde

estas enzimas são produzidas industrialmente em grande escala. A existência de substâncias intercelulares (protopectina nos vegetais e paredes celulares, influem marcadamente na digestibilidade, qualidade de cozimento, retenção da forma de alimentos vegetais e no rendimento de nutrientes, tais como: amido e proteína.

Em tecidos vegetais, as células se aderem uma as outras com protopectina, elas podem ser separadas em células individuais com protopectinase, pela decomposição da protopectina insolúvel em ácido pectico; e as paredes celulares, agora expostas, são então facilmente degradadas com celulase, especificamente pelo componente capaz de degradar papel filtro, ou seja celulase C₁ (72).

Portanto, estas preparações enzimáticas podem ser utilizadas para os seguintes propósitos:

a) Extração dos componentes do chá verde: vários componentes, tais como aminoácidos, carboidratos, taninos, cafeína, saponin e componentes aromáticos, estão incluídos dentro das células das folhas do chá verde. O uso de uma solução enzimática composta de protopectinase (cell separating enzyme) e celulase permite obter, depois de hidrólise e centrifugação, um sobrenadante que contém os componentes do chá com um rendimento de 2 a 3 vezes maior que aquele obtido pelo processo tradicional de infusão.

b) Extração de proteína de tortas desengorduradas de soja e coco: o rendimento em proteína foi aumentado em 3,3 com celulase e em 3,5 vezes com a mistura (cell separating enzyme e celulase 1:1), comparados com o controle para tortas de soja desengordurada. Mostrou ser adequado o uso da mistura de enzimas a concentrações de 0,2 a 1,0%.

c) Extração de amido de batata e milho: o bagaço resultante da extração de amido de batata, depois de lavado duas vezes para maior extração foi tratado com cell separating enzyme e celulase, obtendo-se um aumento no rendimento de 23% com relação ao obtido pelo processo usual.

d) Digestão da parede celular de leveduras (Saccharomyces cerevisiae, Candida utilis). É bem conhecido o fato de que as pare

des celulares de algumas leveduras não são digeríveis no trato intestinal dos animais. Estas paredes celulares são atacadas por celulase de Trichoderma viride koji, melhorando assim a digestibilidade das células de levedura, TOYAMA citado em (14).

e) Remoção da camada externa de soja e produção de células individuais com cell separating enzyme .

f) Recuperação de agar-agar de algas marinhas: agar-agar tende a decompor-se por tratamento com ácido e por aquecimento prolongado, assim nenhum destes dois métodos é satisfatório para sua extração. O uso de celulase de T. viride evita este problema e melhora o rendimento, isto é atribuível à degradação das paredes celulares por ação da celulase.

g) Produção de vinagre de fruta e pectina de polpa cítrica (8, 17, 67).

h) Obtenção de células simples de plantas e protoplasma em estado ativo.

i) Modificação de tecidos de alimentos vegetais: arroz, cenoura, etc.

j) Digestão enzimática em tanques sépticos.

Toyama e seus colaboradores não apresentaram critérios sobre custos economicos, em seus trabalhos.

Entre as aplicações mais recentes podem ser mencionadas: Processamento de materiais fibrosos, como alimento para ruminantes, a partir de resíduos delignificados de árvores; sacarificação de resíduos delignificados de madeira, em associação com xilanase; suplemento de enzimas em rações de aves e porcos (14) e sacarificação - contínua de polpa de celulose através de sistemas de filtração (13, 15) e outros sistemas afins (12, 25).

Contudo, na atualidade, as maiores aplicações das enzimas celuloíticas estão no campo farmacêutico e na suplementação de rações animais.

C A P Í T U L O I I I

MATERIAIS

3.1. Microrganismos

As seguintes 3 linhagens de fungos imperfeitos foram experimentadas para verificação de sua capacidade celulolítica (celulas C_1 e C_x) em fermentação submersa e por cultura em semi-sólido:

- (a) Trichoderma viride QM 9123
- (b) Aspergillus niger ATCC 1004
- (c) Pestalotiopsis westerdijkii QM 381

Os fungos T. viride QM 9123 e P. westerdijkii QM 381 foram adquiridos do U.S. Army Natick Laboratories, Natick, Massachusetts 01760 U.S.A.; enquanto que o A. niger ATCC 1004 foi adquirido da "American Type Culture Collection, Md, USA".

3.2. Equipamento para o desenvolvimento das fermentações

Utilizou-se um incubador-agitador rotativo com as seguintes características:

Procedência: New Brunswick Scientific Co., Inc.
Denominação: Psycrotherm
Modelo : G-27
Velocidade : 40 a 400 rpm (\pm 5)
Passo : 2,54 cm
Temperatura: 0 a 60°C (\pm 0,5)

3.3. Reagentes e equipamentos complementares

Todos os reagentes químicos (xilana, sodio-carboximetilcelulose, proteose peptona, caseína, acetona, gel de sílica, ácido sulfúrico, sulfato de cobre, hidróxido de sódio, acetato e ascorbato de sódio, etc.) utilizados eram de grau analítico, sendo princi

palmente das marcas Merck, Difco, Baker, Aldrich. Chem. Co. Além dos materiais comumente usados em laboratórios, tais como pipetas, beckers, provetas, funis, erlenmeyers, tubos de ensaio, termômetros, etc., foram utilizados os seguintes equipamentos:

- (a) Balança analítica Sauter (máx. 200 g. div. 0,01 mg).
- (b) Balança Sauter (máx. 200 g, div. 0,1 g).
- (c) Potenciômetro, pH-meter H-5, Horiba, com ajuste automático de temperatura e precisão de $\pm 0,05$ unidades de pH.
- (d) Autoclaves:
 - Autoclave Luferco, nº 15,219 (máx. $3\text{kg}/\text{cm}^2$).
 - Autoclave Steroclave, nº 25X (máx. 30 psig).
- (e) Refrigerador Frigidaire e congelador Metalfrío.
- (f) Centrífuga IEC UV da Damon/IEC Division (0-- 60,00 5pm).
- (g) Dessecador com gel de sílica e ácido sulfúrico conc.
- (h) Banho-maria da Fabbe, modelo 110E;
- (i) Espectrofotômetro Coleman, modelo 295E.
- (j) Espectrofotometro Spectronic 20 Busch & Lomb,
- (k) Agitador de movimento rotativo modelo OS31, da Fermentation Design Inc. USA (0 - 500 rpm).
- (l) Microscópio Busch & Lomb (aumento $10 \times 43 = 430$ vezes).

C A P Í T U L O I V

MÉTODOS

4.1. Preparação das culturas estoque

As 3 linhagens de fungos imperfeitos, citados em 3.1, foram recebidas liofilizadas, sendo então re-hidratadas em água destilada esteril e inoculadas em tubos inclinados contendo meio agar-batata-dextrose. Tais tubos foram incubados a temperatura ambiente durante 1 semana. As culturas, depois de mostrarem um crescimento satisfatório, foram conservadas em refrigerador (3-5°C) por um período não superior a 1 mes. Mensalmente foram realizados repiques das culturas estoque (padrão) para tubos inclinados com o mesmo meio, incubação a temperatura ambiente por uma semana e posterior conservação em refrigerador.

Composição do meio agar-batata-dextrose para manutenção das linhagens (culturas estoque):

<u>Componentes</u>	<u>g/l</u>
Batata	100
Agar	32
Glicose (bacto-dextrose)	40

A batata picada foi fervida por 10 minutos, em 200 ml de água destilada, filtrada em pano, espremendo-se para maior extração. Os tubos de ensaio, contendo 10 ml de meio cada um, foram esterilizados em autoclave por 20 minutos a 121°C, deixando-se esfriar em posição inclinada até a solidificação do meio.

4.2. Preparação do inóculo

O material de semeadura para as experiências foi retirado das próprias culturas estoque (padrão), eliminando-se sempre os tubos utilizados.

Para a preparação do material de inóculo, realizou-se uma suspensão de esporos em 20 ml de água destilada esteril a partir das culturas de estoque (padrão) em agar-batata-dextrose, usando-se 1 ml desta suspensão para inocular cada frasco erlenmeyer da fermentação.

tação submersa e 1,5 ml para cada frasco erlenmeyer da cultura em semi-sólido. Para todas as fermentações, foi realizada uma contagem aproximada de esporos do material inóculo, pelo método de contagem de leucócitos (Blood cell counting chamber-Arthur H. Thomas Co. USA).

4.3. Processo fermentativo

4.3.1. Fermentação submersa

Para a fermentação submersa, em frascos agitados, utilizam-se os seguintes meios:

(a) Meio de Reese e Mandels (18,53), com adição de 0.1% de acetato de sódio e 0.1% de ascorbato de sódio, cuja composição é dada a seguir:

<u>Componentes</u>	
Fonte de celulose	10,0 g/l
KH_2PO_4	2,0 "
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1,4 "
$(\text{NH}_2)_2\text{CO}$	0,3 "
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,3 "
CaCl_2	0,3 "
Proteose peptona	1,0 "
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	5,0 mg/l
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	1,6 "
ZnCl_2	1,7 "
CoCl_2	2,0 "

O pH foi ajustado a 5,0 com NaOH.

(b) Meio de cultura à base de extrato fúngico de Koji - (6), tendo a seguinte composição:

<u>Componentes</u>	<u>g/l</u>
Fonte de celulose	10,0
KH_2PO_4	10,0
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	3,0
NaNO_2	3,0
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,5
Extrato fúngico de Koji.....	1 litro
(filtrado de cultura em semi-sólido de <u>Aspergillus oryzae</u> - fonte de proteínas e vitaminas).	

O pH foi ajustado a 5,5 com NaOH.

Para ambos os meios, utilizou-se farelo de trigo moído (almofaris), como fonte de celulose (fonte de carbono), que foi adicionado a cada frasco em separado. Os frascos erlenmeyers de 500 ml, contendo cada um 100 ml de meio e 1,0 g de farelo de trigo, foram esterilizados em autoclave por 30 minutos a 121°C. Depois da esterilização, havia um pequeno aumento de pH em 0,5-0,8 unidades. Deixou-se resfriar à temperatura ambiente antes da inoculação, citada em 4.2.

Nas experiências realizadas, a temperatura foi fixada em 29°C ± 1°C e o nível de agitação a 200 rpm, retirando-se amostras em triplicata, a intervalos de 24 horas, durante um período de 6 a 7 dias. (Incubador-agitador rotativo citado em 3.2).

4.3.2. Cultura em semi-sólido

Para a cultura em semi-sólido utilizou-se um meio constituido somente de farelo de trigo com 40-45% de umidade (100 g de farelo de trigo + 60 ml de água destilada).

Os frascos erlenmeyers de 500 ml, contendo cada um 15 g de farelo de trigo "uniformemente umidificado", foram esterilizados em autoclave por 30 minutos a 121°C, deixando-se resfriar a tempera

tura ambiente antes de sua inoculação. Nos ensaios realizados, o pH inicial (não ajustado) se situou entre 6,0 e 6,3 (filtrado do meio após a esterilização).

Nas experiências realizadas, a temperatura foi fixada em $29^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, sem agitação, utilizando-se o equipamento citado em 3.2. As amostras, em triplicata, foram retiradas a intervalos de 24 horas, durante um período de 6 a 7 dias.

Tanto na fermentação submersa, como na cultura em semi-sólido, foram utilizados tampas de algodão para manutenção das condições assépticas. As observações microscópicas das culturas foram empregadas principalmente para verificar mudanças na morfologia do micélio, durante o transcurso da fermentação, assim como para o controle de possíveis contaminações.

4.4. Técnicas de recuperação e análise do produto enzimático

4.4.1. Recuperação do produto (celulase bruta).

Após retiradas as amostras, procede-se à obtenção do filtrado da cultura do mosto fermentado (fermentação submersa) ou do farelo fúngico (cultura em semi-sólido), conforme o caso.

Na fermentação submersa, o filtrado da cultura é obtido por filtração simples (Whatman N° 1) do mosto fermentado, uma vez que as celulasas são enzimas extracelulares e solúveis em meio aquoso.

Na cultura em semi-sólido, o farelo fúngico é submetido inicialmente a uma extração aquosa para posterior obtenção do filtrado de cultura. A extração é realizada com água destilada na proporção de 1:10 (farelo fúngico: água destilada), com agitação manual periódica a temperatura ambiente, durante 2 horas. Em seguida, o farelo fúngico extraído é filtrado (Whatman N° 1).

A partir deste ponto, o fluxograma do processo, na página seguinte é igual para ambas as fermentações.

Filtrado de enzimas celulolíticas



Ajustar a pH 6,0 com HCl ou NaOH conforme o caso.



Precipitação: Adicionar 2 volumes de acetona por volume de filtrado de enzimas celulolíticas e agitar por alguns minutos.



Deixar repousar por uma noite, a 4°C para precipitação.



Centrifugar a 1.000 g, por 5 minutos.

Sobrenadante ←



Lavar o precipitado com acetona.



Centrifugar a 1.000 g, por 5 minutos.

Sobrenadante ←



Colocar o precipitado em vidro relógio, deixando evaporar a acetona residual em temperatura ambiente.



Colocar os resíduos em dessecador (H₂SO₄ conc.) por uma noite.



Moer (celulase bruta em pó).

O produto assim obtido denomina-se "celulase bruta", posto que, além das celulases, outras enzimas estão presentes, tais como:

xilanase, protopectinase (cell separating enzyme), protease, etc. e alguns carboidratos.

4.4.2. Determinação da atividade de celulase C_1

A atividade de celulase C_1 foi determinada pela capacidade da enzima (celulase bruta) em degradar papel filtro. Utilizou-se o método de incubação-agitada de Toyama citado em (72). O ensaio foi realizado da seguinte forma: em tubos de ensaio grandes (200 mm x 23 mm), foram colocados 4 ml da solução celulase de 10 mg/ml (preparada a partir do precipitado enzimático: celulase bruta), 1 ml de tampão acetato 0,1M, pH 5,0 e um pedaço de papel filtro (Whatman N° 40) de 10 mm x 10 mm. O conjunto foi incubado em banho-maria a 40°C e 120 rpm (agitação mecânica recíproca). Esta determinação foi realizada simultaneamente para todas as amostras de uma mesma fermentação, sendo a atividade relativa expressa em porcentagem de degradação, dando-se o valor de 100% àquela que mostrou degradação total do papel filtro. A atividade absoluta, expressa em minutos, foi determinada para as amostras que chegaram a degradar totalmente o papel filtro sob as condições anteriormente especificadas (atividade absoluta = minutos necessários para degradação completa). Para o controle utilizou-se 4 ml de água destilada em lugar da solução celulase de 10 mg/ml.

Para a transmissão do movimento de agitação, foi utilizado um agitador de movimento rotativo, descrito em 3.3.

4.4.3. Determinação da atividade da celulase C_x

A atividade da celulase C_x foi determinada pela quantidade de açúcar redutor, expresso como glicose, resultante da ação enzimática sobre o substrato carboximetilcelulose (C.M.C. - Na), sob condições específicas. Foi utilizado o método originalmente proposto por Reese et. al. (57).

Os tubos de ensaio, contendo cada um 4 ml de solução de carboximetilcelulose (sal sódico) a 0,625%, pH 4,5 e 1 ml da solução de celulase (filtrado de enzimas celulolíticas ou solução de celulase contendo 1 mg/ml), foram incubados por 30 minutos a 40°C. Ao

final da incubação, foram retiradas alíquotas (usualmente 0,2 a 0,5 ml da mistura incubada) para determinação de açúcares redutores. Utilizou-se o método colorimétrico de Somogyi e Nelson (39, 65, 66). O volume final da solução é elevado a 25 ml com água destilada e a absorvância lida a 540 nm. Para os controles (poder redutor da solução enzimática) os tubos foram preparados da mesma forma descrita anteriormente, mas sem incubação.

Para o cálculo da quantidade de açúcar redutor em miligramas de glicose, utilizou-se uma curva padrão (absorvância a 540 nm contra mg de glicose). Uma unidade de atividade de celulase C_x foi tomada como a quantidade de enzima que produz 1 mg de açúcar redutor, expresso como glicose, a partir do substrato carboximetilcelulose (sal sódica) durante um tempo de incubação de 30 minutos a 40°C.

4.4.4. Determinação da atividade de xilanase

A atividade de xilanase foi determinada pela quantidade de açúcar redutor, expresso como xilose, resultante da ação enzimática sobre o substrato xilana (27).

Os tubos de ensaio, contendo cada um 2,5 ml de solução de xilana a 0,5%, 2,5 ml de tampão acetato 0,05M, pH 4,0 e 1 ml da solução de celulase (filtrado de enzimas celolotíticas ou da solução enzimática de 1 mg/ml), foram incubados por 30 minutos a 50°C. Ao final da incubação, foram retiradas alíquotas (usualmente 0,2 a 0,5 ml da solução incubada) para determinações de açúcares redutores, utilizando-se o método colorimétrico de Somogyi e Nelson. Para os controles (poder redutor da solução enzimática), os tubos foram preparados da mesma forma descrita anteriormente, mas sem incubação.

Para o cálculo das miligramas de xilose utilizou-se uma curva padrão (absorvância a 540 nm contra mg de xilose). Uma unidade de atividade de xilanase foi tomada como a quantidade de enzima que produz 1 mg de açúcar redutor, expresso como xilose, a partir do substrato xilana, durante um tempo de incubação de 30 minutos a 50°C.

4.4.5. Determinação da atividade de protopectinase (cell separating enzyme).

A capacidade dos preparados enzimáticos para degradar batata foi utilizada como medida da atividade protopectinolítica (26, 72).

A atividade foi determinada de acordo com o método proposto por Kawai et al. (26). Os tubos de ensaio, contendo 2 ml do preparado enzimático de 10 mg/ml (mesmo usado para determinação de celulase C_1), 2 ml de tampão acetato 0,2M, pH 5,0 e um pedaço de tecido de batata de 10 mm x 10 mm x 2 mm, de peso conhecido, foram incubados em banho-maria durante 5 horas a 45°C e 120 rpm (agitação mecânica recíproca, mesmo usado em celulase C_1). Ao final da incubação, foi determinado o peso (úmido) para os pedaços de batata residuais. Então, a atividade de protopectinase foi calculada pela seguinte fórmula:

$$Ma: (\%) = \frac{(W_o - W_t) - \frac{C_o - C_t}{C_o}}{W_o} \times 100$$

onde W_o = peso da amostra de batata ao início da incubação.

W_t = peso da amostra de batata depois de um tempo t de incubação (5 horas).

C_o = peso da amostra de batata ao início da incubação, para o controle.

C_t = peso da amostra de batata ao final da incubação (5 horas) para o controle (água destilada em lugar de solução enzimática).

Esta determinação era realizada simultaneamente para todas as amostras da fermentação submersa e da cultura em semi-sólido.

4.4.6. Determinação de protease

O ensaio para protease foi realizado pela técnica de digestão de caseína (38). Baseia-se na digestão de uma solução tampoadada de caseína, pH 7,4, por 35 minutos a 40°C, seguida da precipi

tação da caseína não digerida e posterior filtração. A quantidade de caseína digerida é medida colorimetricamente usando-se o reagente de Folin e Ciocalteu. As determinações realizaram-se nos preparados enzimáticos de 1 mg/ml (mesmos usados para celulase C_x e xilana-se), sendo as leituras de absorvância realizadas a 600 nm em espectrofotômetro Spectronic 20 Busch & Lomb.

4.4.7. Determinação de pH

O pH foi determinado com um potenciômetro Horiba. As determinações foram efetuadas nos filtrados das culturas (filtrados celulolíticos).

4.4.8. Determinação de proteína

A proteína foi determinada pelo método de Lowry (31). As determinações foram efetuadas nos preparados enzimáticos de 1 mg/ml (os mesmos usados para determinar as atividades de xilana-se, C_x e protease). Empregou-se albumina bovina para preparar a curva padrão, de onde foram obtidos os valores para proteína. Tanto para as determinações, como para a preparação da curva padrão, a absorvância foi lida a 700 nm em espectrofotômetro Coleman.

C A P I T U L O V

Resultados e Discussão

Basicamente, todos os experimentos realizados com os fungos T. viride QM 9123, A. niger ATCC 1004 e P. westerdijkii QM 381, visaram comparar a produção de celulases C_1 e C_x (enzimas celulólicas) por fermentação submersa e por cultura em semi-sólido, expressando-se os resultados de produção em termos de atividade enzimática. Como os produtos enzimáticos obtidos por precipitação (celulase bruta) não continham somente celulase, mas também outras enzimas, aproveitaram-se as experiências realizadas para comparar (em submerso e semi-sólido) as atividades de outras enzimas, isto é, xilanase, protopectinase (cell separating enzyme) e protease.

Os melhores resultados para fermentação submersa foram obtidos utilizando-se o meio Reese e Mandels (descrito em 4.3.1.), por esta razão foi utilizado para todos os estudos comparativos entre submerso e semi-sólido.

5.1. - Comparação das atividades enzimáticas (celulases C_1 e C_x , xilanase e protopectinase) obtidas para T. viride QM 9123 por fermentação submersa e por cultura em semi-sólido.

Observou-se que o fungo T. viride apresentava colônias amarelo-esverdeadas depois de incubação em meio agar-batata-dextrose, tomando todo o meio uma coloração amarela. O mesmo fungo, quando foi incubado no meio semi-sólido de farelo de trigo (umidade de 40 - 45%), mostrou um crescimento branco em forma de algodão. Observou-se um ligeiro crescimento após as primeiras 24 horas (possivelmente fase "latência"), tornando-se intenso entre o 3º e 4º dia da fermentação, coincidindo com o aparecimento das primeiras zonas de coloração verdes (zonas de esporulação), zonas estas, predominantes nas regiões mais aeradas. Na fermentação submersa (meio de Reese e Mandels, descrito em 4.3.1.), T. viride mostrou um crescimento

moderado após 24 horas, chegando a um crescimento máximo (meio com aparência mais espessa ou viscosa) ao redor de 48 horas de fermentação. A seguir o meio tornou-se cada vez mais líquido até chegar a um ponto quase igual ao meio de partida.

5.1.1. - Comparação das atividades de celulasas C_1 e C_x

Verificamos pela figura 1 e o quadro 1 que as máximas atividades relativas de celulase C_1 foram obtidas para um tempo de fermentação de 48 horas (2 dias), tanto para a fermentação submersa, como para a cultura em semi-sólido, sendo a máxima atividade, relativa de celulase C_1 em semi-sólido, superior em 65% a correspondente obtida em submerso.

Em termos de atividade absoluta, expressada em minutos, a atividade máxima de celulase C_1 em semi-sólido foi superior em aproximadamente 13% (21 minutos) à atividade máxima obtida em submerso; quadro 4.

A figura 2 e o quadro 1 mostram a cinética de produção de celulase C_x , expressa em unidades por grama de celulase bruta, em submerso e em semi-sólido. As atividades máximas foram obtidas para tempos de fermentação de 48 horas (2 dias) em submerso e 96 horas (4 dias) em semi-sólido, observando-se que a atividade máxima de celulase C_x em semi-sólido é superior em 78% (560 unidades/g), aproximadamente, à correspondente obtida por fermentação submersa.

5.1.2. - Comparação da atividade de xilanase

Pela figura 3 e o quadro 1, verificamos que as máximas atividades de xilanase (expressa em unidades por grama de precipitado enzimático-celulase bruta) para fermentação submersa e para cultura em semi-sólido, foram obtidas para tempos de fermentação de 48 horas (2 dias) e 96 horas (4 dias), respectivamente. A máxima atividade em semi-sólido resultou superior em aproximadamente 86% (732 u/g) à correspondente obtida por fermentação submersa.

As atividades de xilanase e celulase C_x foram também de terminadas nos filtrados celulolíticos de cultura, durante o transcurso das fermentações (submersa e semi-sólida), expressando se os resultados em unidades por mililitro de filtrado de cultura. Os resultados estão indicados nas figuras 4 e 5. Entretanto, uma análise comparativa submerso e semi-sólido, não pode ser realizada nesta base. Os tempos de fermentação correspondente às atividades máximas de xilanase e celulase C_x nos filtrados de cultura parecem coincidir com aqueles correspondentes às atividades máximas de xilanase e celulase C_x , no produto enzimático precipitado (celulase bruta), figuras 2, 3, 4 e 5.

Pode-se notar também, nas mesmas figuras, que na fermentação submersa as enzimas celulase C_x e xilanase aparecem geralmente a um mesmo tempo de fermentação (24 horas); o mesmo não parece se verificar para a cultura em semi-sólido. Nesta última, a enzima xilanase normalmente aparece antes que a celulase C_x .

5.1.3. - Comparação da atividade protopectinolítica (cell separating enzyme).

As atividades relativas de protopectinase foram determinadas pela capacidade dos preparados enzimáticos para degradar batata, como descrito em 4.4.5. Os resultados obtidos estão indicados na figura 6 e no quadro 1. A máxima atividade em submerso foi obtida para um tempo de fermentação de 48 horas (2 dias) e de 96 horas (4 dias) para a cultura de semi-sólido. Pode-se observar que a atividade relativa máxima em semi-sólido é superior em aproximadamente 22% àquela correspondente obtida por fermentação submersa.

5.1.4. - Proteína Solúvel

O conteúdo de proteína solúvel no produto enzimático precipitado (celulase bruta) foi determinado pelo método de Lowry et al, citado em 4.4.8; os resultados mostram-se na figura 7 e no quadro 1. Pelos resultados obtidos, verificamos que existe uma estreita correlação entre o conteúdo de proteína solúvel e as atividades celulolíticas (celulases C_1 e C_x) no precipitado enzimático

(celulase bruta) tanto na fermentação submersa como na cultura em semi-sólido. Resultados análogos foram conseguidos por Mandels , et al (33,35). O mesmo parece verificar-se para xilanase e protopectinase.

5.1.5. Variação de pH, durante a fermentação

Observando a figura 8, vemos que para a fermentação submersa, o pH aumentou rapidamente entre as 24 e 48 horas de fermentação; a partir deste ponto, a proporção de aumento decresce marcadamente até o pH permanecer constante após as 144 horas de fermentação.

Para a fermentação em semi-sólido, como mostrado na figura 8, o pH decresce bruscamente após as primeiras 24 horas, atingindo um mínimo em torno das 72 horas. A seguir, passa a aumentar, ultrapassando o valor de pH inicial, ao redor de 96 horas de fermentação.

Para todas as fermentações realizadas, o pH dos filtrados de cultura (filtrado de enzimas celulolíticas) foi ajustado a 6,0 antes da precipitação, porém considera-se que uma faixa de pH entre 5,0 e 6,0 é adequada.

5.2. - Comparação das atividades enzimáticas (celulases C_1 e C_x , xilanase, protopectinase e protease), obtidas para *P. westerdijkii* QM 381, por fermentação submersa e por cultura em semi-sólido.

O fungo *P. westerdijkii* apresentava colônias mucoides-pretas brilhantes, depois da incubação em meio agar-batata-dextrose. O mesmo fungo, quando incubado em meio semi-sólido (farelo de trigo-umidade de 40 - 45%) mostrou um crescimento branco compacto (não em forma de algodão), completamente aderido ao material celulósico. Observou-se um pequeno crescimento após as 24 horas de fermentação, tornando-se intenso a partir das 72 horas (3 dias).

Na fermentação submersa, meio de Reese e Mandels, descrito em 4.3.1, *P. westerdijkii* mostrou um ligeiro crescimento após

as primeiras 24 horas, chegando a um máximo (meio com aparência mais viscosa ou espessa) entre as 65 e 89 horas da fermentação. A seguir o meio foi se tornando gradativamente mais líquido.

5.2.1. - Comparação das atividades de celulase C_1 e C_x

Os resultados obtidos para as atividades de celulase C_1 em submerso e semi-sólido são mostrados na figura 9 e no quadro 2, obtidos para um período de incubação-agitada de 4 horas (descrito em 4.4.2). Em submerso, a máxima atividade relativa de C_1 , em torno de 15%, foi obtida para um tempo de fermentação de 65 horas, enquanto que, em semi-sólido, a atividade foi nula durante todo o transcurso da fermentação.

Pelos resultados obtidos, a linhagem *P. westerdijkii*, utilizada nesta experiência, mostra-se como um pobre produtor de celulase C_1 , tanto na fermentação submersa (meio de Reese e Mandels) como na cultura em semi-sólido (farelo de trigo).

Verifica-se na figura 10 e no quadro 2 que as atividades máximas de celulase C_x , expressas em unidades por grama de celulase bruta, foram obtidas para um tempo de fermentação ao redor de 96 horas (4 dias) para ambos os casos. Sendo a atividade máxima de C_x , em submerso, superior em 79% à correspondente obtida em semi-sólido.

5.2.2. - Comparação da atividade de xilanase

Os resultados para a atividade de xilanase, em submerso e semi-sólido para *P. westerdijkii*, estão mostrados na figura 11 e no quadro 2. A atividade máxima foi obtida para um tempo de fermentação de 65 horas em submerso e de 120 horas (5 dias) em semi-sólido, sendo a mesma, praticamente igual para ambos os casos.

As atividades de xilanase e celulase C_x foram também determinadas nos filtrados de culturas, durante o transcurso das fermentações (submersa e semi-sólido), sendo expressas em unidades por mililitro de filtrado de cultura. Os resultados são mostrados nas figuras 12 e 13.

5.2.3. - Comparação da atividade protopectinolítica (cell separating enzyme).

As atividades relativas de protopectinase, obtidas para P. westerdijkii por fermentação submersa e cultura em semi-sólido, são mostrados na figura 14 e no quadro 2. Estas atividades foram determinadas conforme citado em 4.4.5.

A atividade máxima de protopectinase foi obtida para um tempo de fermentação de 24 horas em semi-sólidos e de 48 horas em submerso, resultando a atividade em semi-sólido quase o dobro da aquela obtida por fermentação submersa. No entanto, P.westerdijkii revelou-se um pobre produtor de protopectinase, tanto na fermentação submersa, como na cultura em semi-sólido.

5.2.4. - Atividade de protease

Na figura 15 e no quadro 2, observamos que as atividades proteolíticas máximas em submerso e semi-sólido para P. westerdijkii foram obtidas para um tempo de fermentação ao redor de 72 horas (3 dias), sendo a atividade máxima em semi-sólido 17 vezes maior que a correspondente obtida em submerso.

5.2.5. - Proteína solúvel

O conteúdo de proteína solúvel no produto enzimático precipitado (celulase bruta) foi determinado pelo método de Lowry et al, citado em 4.4.8. Os resultados mostram-se na figura 16 e no quadro 2. Em ambas as fermentações, não parece existir uma correlação estreita entre proteína solúvel e atividade celulolítica, como se observa nas figuras 9, 10 e 16.

5.2.6. - Variação de pH, durante a fermentação

Na fermentação submersa, o pH aumentou gradativamente de seu valor inicial de 5,65 até um valor final de 7,71 após as 113 horas de fermentação, figura 12. Para a cultura em semi-sólido, fig. 13, o pH decresce nas primeiras horas de fermentação, atingindo um mínimo ao redor de 72 horas; a seguir, passa a aumen

tar gradativamente, ultrapassando o valor de pH inicial.

5.3. - Comparação das atividades enzimáticas (celulases C_1 e C_x , xilanase, protopectinase e protease) obtidas para *A. niger* ATCC 1004 por fermentação submersa e por cultura em semi-sólido.

O fungo *A. niger* apresenta colônias pretas-opacas depois de incubado no meio de agar-batata-dextrose. O mesmo fungo, quando incubado no meio semi-sólido (farelo de trigo com 40 - 45% de umidade), mostrou um crescimento em forma de veludo de coloração preta. Houve um ligeiro crescimento após as primeiras 24 horas, tornando-se intenso entre 48 e 72 horas de fermentação. Em submerso (meio de Reese e Mandels), *A. niger* mostrou um crescimento razoável após as primeiras 24 horas, atingindo o máximo em torno das 48 horas (meio com aparência mais espessa ou viscosa). A seguir, o meio se tornou cada vez mais líquido, chegando quase à consistência do meio de partida.

5.3.1. Comparação das atividades de celulases C_1 e C_x

Para esta linhagem de fungo, não se observou atividade de celulase C_1 em submerso e em semi-sólido, após um período de incubação com agitação de 4 horas (como descrito em 4.4.2.), quadro 3.

A cinética de produção de celulase C_x em submerso e em semi-sólido é mostrada na figura 17 e quadro 3, expressando-se a produção em termos de atividade enzimática, isto é, unidades por grama de celulase bruta. As atividades máximas foram obtidas para um período de fermentação de 72 horas (3 dias) em submerso e de 120 horas (5 dias) em semi-sólido, sendo a atividade em semi-sólido, aproximadamente 3,5 vezes maior que a correspondente obtida em submerso.

5.3.2. Comparação da atividade de xilanase

Um estudo comparativo entre as atividades de xilanase ob

tidas para A. niger, por fermentação submersa e por cultura em semi-sólido, é mostrado na figura 18 e no quadro 3. As atividades máximas foram obtidas para um período de fermentação de 72 horas (3 dias) em submerso e ao redor de 144 horas (6 dias) em semi-sólido, resultando a atividade em semi-sólido aproximadamente 2,2 vezes maior que a correspondente obtida em submerso.

As atividades de celulase C_x e xilanase também foram determinadas nos filtrados de cultura (filtrado de enzimas celulolíticas), expressando-se as mesmas em unidades por ml de filtrado de cultura. Os resultados são mostrados nas figuras 19 e 20.

5.3.3. - Comparação da atividade protopectinolítica (cell separating enzyme).

As atividades relativas de protopectinase, determinadas como descrito em 4.4.5., obtidas para A. niger por fermentação submersa e por cultura em semi-sólido, são mostradas na figura 21 e no quadro 3. Para ambas as fermentações, as atividades máximas foram obtidas para períodos de fermentação de 48 a 72 horas, não existindo diferenças significativas entre seus valores. A. niger, revelou-se um pobre produtor de protopectinase em ambas as fermentações.

5.3.4. - Comparação da atividade proteolítica

A produção de protease por A. niger, em fermentação submersa e por cultura em semi-sólido, está mostrada na figura 22 e no quadro 3. As atividades máximas foram obtidas para períodos de fermentação de 120 horas (5 dias) em semi-sólido e ao redor de 144 horas (6 dias) para submerso, resultando a atividade máxima em semi-sólido, aproximadamente 11 vezes maior que a correspondente obtida por fermentação submersa.

5.3.5. - Proteína solúvel

O conteúdo de proteína solúvel no produto enzimático precipitado (celulase bruta) foi determinado pelo método de Lowry et

al, citado em 4.4.8. Os resultados são mostrados na figura 23 e no quadro 3. Para a cultura em semi-sólido parece haver alguma correlação entre a proteína solúvel e atividades de celulase C_x e xilanase, mas o mesmo não parece se verificar na fermentação submersa, figuras 17, 18 e 23.

5.3.6. - Variação do pH durante a fermentação

Para ambas as fermentações, o pH decresce nas primeiras horas de fermentação, atingindo um mínimo ao redor de 24 horas. A seguir, passa a aumentar, ultrapassando o valor inicial, até um valor que permanece praticamente constante após as 120 horas de fermentação. Estes resultados são mostrados nas figuras 19 e 20.

5.4. - Comparação do potencial enzimático (celulases C_1 e C_x , xilanase, protopectinase e protease) dos fungos T. viride, P. westerdijkii e A. niger.

Verificamos pelo quadro 4 que a maior produção de celulase C_1 foi obtida com a linhagem T. viride, por cultura em semi-sólido. Os resultados indicam que A. niger e P. westerdijkii são pobres produtoras de celulase C_1 nas condições ensaiadas. A maior produção de celulase C_x foi obtida por A. niger por cultura em semi-sólido. No entanto, T. viride produz um "sistema celulase" com melhores proporções de C_1 e C_x , o que é importante para a degradação de celulose nativa.

+ O fungo A. niger mostrou-se como um excelente produtor de xilanase por cultura em semi-sólido, superando marcadamente as outras linhagens. Por outro lado, T. viride mostrou ser um bom produtor de protopectinase (cell separating enzyme), também em semi-sólido.

Para as linhagens testadas, a cultura em semi-sólido parece favorecer uma maior produção de protease.

No quadro 4, estão incluídas, para efeito de comparação as atividades de celulase C_1 e C_x , xilanase, protopectinase e pro

tease, calculadas no laboratório para algumas enzimas comerciais.

5.5. - Efeito da adição de um surfatante (Tween 80) na produção de celulases, xilanase, e protopectinase por fermentação submersa.

Das linhagens de fungos experimentadas, T. viride mostrou uma maior capacidade na produção de enzimas celulolíticas, sendo portanto utilizada nas experiências seguintes:

Foi adicionado Tween 80 (sorbitan polyoxyethylene monoleate) ao meio de cultura para fermentação submersa, com a finalidade de verificar o efeito da adição de surfatante não iônicos na produção de certas enzimas. Preferiu-se utilizar este surfatante por ser mais solúvel em meio aquoso e de fácil manejo. O Tween 80 foi adicionado nas proporções de 0,1% e 0,3% (v/v) durante a preparação dos meios de cultura (56). Para todos os ensaios foi utilizada a linhagem T. viride.

A adição de 0,1% (v/v) de Tween 80 mostrou ser eficiente na produção das enzimas celulases C_1 e C_x , xilanase e protopectinase, por fermentação submersa. Por outro lado, uma adição de 0,3% ocasionou uma repressão na produção para a maioria das enzimas estudadas.

Os resultados obtidos para a celulase C_1 são mostrados na figura 24 e no quadro 5. Com a adição de 0,1% de Tween 80, obteve-se um aumento de 75% na atividade relativa de celulase C_1 , em relação ao controle sem surfatante. Em termos de atividade absoluta, expressa em minutos, o aumento foi da ordem de 30% (49 minutos).

O efeito da adição de Tween 80 na produção de celulase C_x é mostrado na figura 25 e quadro 5. Com a adição de 0,1%, conseguiu-se um aumento de atividade (expressa em unidades por grama de celulase bruta) de aproximadamente 48%, em relação ao controle em surfatante. Resultado análogo foi obtido por Reese et al (56), para o fungo T. viride QM 6 a.

Verifica-se na figura 26 e quadro 5 que quando se adicionou o surfatante ao meio de cultura, na proporção de 0,1%, obteve-se um aumento de 26% para a atividade de xilanase em relação ao controle sem surfatante. A adição de 0,3% do surfatante não provocou uma repressão na produção desta enzima, mas a proporção do aumento foi inferior à obtida com uma adição de 0,1%.

Os resultados da influencia de Tween 80 na produção de protopectinase por fermentação submersa são mostrados na figura 27 e quadro 5. Para todos os casos, a máxima atividade protopectinolítica foi obtida para um tempo de fermentação de 41 horas. A adição de 0,1% do surfatante provocou um aumento de produção, expresso em termos de atividade relativa, de aproximadamente 60% em relação ao controle sem surfatante.

A figura 28 (proteína solúvel contra tempo de fermentação) mostra que existe uma estreita correlação entre os aumentos de atividades enzimáticas observados e o conteúdo de proteína solúvel no precipitado enzimático (celulase bruta).

Um estudo comparativo das atividades enzimáticas (celulases C_1 e C_x , xilanase e protopectinase), obtidas para T. viride por cultura e semi-sólido e por fermentação submersa com adição de Tween 80, é mostrado no quadro 5. Verificou-se que, com adição de 0,1% de surfatante ao meio de cultura para fermentação submersa, se obteve um aumento de 20% na atividade de celulase C_1 com relação à obtida por cultura em semi-sólido. Porém, as atividades de celulase C_x e xilanase, ainda são superiores em aproximadamente 33% e 24%, respectivamente, na cultura em semi-sólido. Não se observou diferença significativa na produção de protopectinase. No mesmo quadro se incluem as atividades calculadas no laboratório para algumas enzimas comerciais.

5.6. - Efeito de outras fontes de celulose na produção de celulase C_x e xilanase por cultura em semi-sólido.

Para verificar a influência de diferentes fontes de celulose na produção de celulase C_x e xilanase por cultura em semi-sólido

lido, realizaram-se experiências com meios de cultura mixtos, constituídos de 80 partes de farelo de trigo e 20 partes de outras fontes de celulose. Preferiu-se o uso de meios mixtos para se obter melhores condições de aeração. Os resultados estão indicados no quadro 6. Verificou-se que um meio simples de farelo de trigo é mais adequado para a produção destas enzimas por cultura em semi-sólido.

C A P Í T U L O VI

CONCLUSÕES

1. Das três linhagens de fungos celulolíticos ensaiadas, Trichoderma viride QM 9123 foi responsável pela produção de um "sistema de celulase" mais eficiente; isto é, com melhores proporções de celulases C_1 e C_x , o que é importante para a degradação de celulose nativa.

2. Entre as fontes de celulose experimentadas, para a cultura em semi-sólido, os melhores resultados foram obtidos com um meio simples de farelo de trigo.

3. Para os fungos Trichoderma viride QM 9123 e Aspergillus niger ATCC 1004, a cultura em semi-sólido mostrou ser mais eficiente na produção de xilanase, protopectinase e enzimas celulolíticas, que a fermentação submersa. T. viride em semi-sólido, mostrou atividades de celulases C_x e C_1 , xilanase e protopectinase, superiores em aproximadamente 78%, 13% (21 minutos), 86% e 22% respectivamente àquelas obtidas por fermentação submersa. Para A. niger em semi-sólido, as atividades de celulase C_x , xilanase e protease, foram marcadamente superiores em aproximadamente 3,5; 2,2 e 11,0 vezes respectivamente, àquelas obtidas por fermentação submersa. Para esta linhagem a produção de celulase C_1 , nos dois processos, foi nula. P. westerdijkii mostrou-se como um pobre produtor de enzimas celulolíticas (em termos de celulase bruta) tanto em fermentação submersa, como em semi-sólido.

4. Os resultados mostram a existência de uma estreita correlação entre o conteúdo de proteína solúvel e as atividades celulolíticas, para a "celulase bruta" de T. viride. Resultados análogos foram obtidos por MANDELS et al. (33, 35).

5. A adição de 0,1% (v/v) de Tween 80 ao meio, para fermentação submersa, foi eficiente na produção de celulases C_1 e C_x , xilanase e protopectinase por T. viride. Aumentos de produção (atividade) da ordem de 48%, 30% (49 minutos) 26% e 60% foram obtidos res

pectivamente, para celulase C_x , celulase C_1 , xilanase e protopectinase, com relação ao controle sem surfatante. Uma adição de 0,3% (v/v) do surfatante ocasionou uma repressão na produção para a maioria das enzimas estudadas.

6. Com adição de Tween 80 ao meio para fermentação submersa foi possível obter-se produções (atividades) de celulasas C_1 e C_x , xilanase e protopectinase bastante similares às obtidas por cultura em semi-sólido, para a linhagem T. viride. Nestas condições o uso de um ou outro processo, na produção em grande escala destas enzimas, de verá depender principalmente dos fatores econômicos envolvidos.

7. As "celulasas" obtidas de T. viride, por fermentação submersa com adição de 0,1% de Tween 80 ou por cultura em semi-sólido, são marcadamente mais ativas que as celulasas comerciais experimentadas.

C A P Í T U L O VII

QUADROS - FIGURAS - APENDICE

<u>QUADROS</u>	<u>PÁGINA</u>
Nº 1	45
" 2	46
" 3	47
" 4	48
" 5	49
" 6	50

<u>FIGURAS</u>	<u>PÁGINA</u>
Nº 1	51
" 2	52
" 3	53
" 4	54
" 5	55
" 6	56
" 7	57
" 8	58
" 9	59
" 10	60
" 11	61
" 12	62
" 13	63
" 14	64
" 15	65
" 16	66
" 17	67
" 18	68
" 19	69
" 20	70

<u>FIGURAS</u>	<u>PÁGINA</u>
Nº 21	71
" 22	72
" 23	73
" 24	74
" 25	75
" 26	76
" 27	77
" 28	78

<u>APENDICE</u>	<u>PÁGINA</u>
A	79

QUADRO 1: Atividades enzimáticas obtidas para Trichoderma viride QM 9123 em submerso e semi-sólido.

Tempo de Fermentação	pH		Proteína solúvel		Celulase C ₁		Celulase C _x		Xilanase		Protopectinase	
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
24	5,95	6,80	0,104	0,036	0	0	70	0	120	96	2,39	0,26
48	7,47	6,06	0,124	0,208	35 ^(b)	100 ^(a)	720	700	852	564	33,74	24,60
70	7,85	5,80	0,098	0,229	2	30	290	1030	348	960	7,42	42,00
97	8,00	6,49	0,099	0,308	0	30	200	1280	312	1584	5,66	56,10
120	8,22	6,61	0,114	0,270	0	20	180	790	288	972	9,32	42,42
144	8,09	7,30	-----	0,264	0	5	150	690	336	1008	-----	21,13
168	8,08	7,41	-----	0,260	---	0	---	400	---	1128	-----	4,72

- 45 -

A = Fermentação submersa

B = cultura em semi-sólido

(a) Degradação total após 143 minutos de incubação com agitação, descrita em 4.4.2.

(b) Degradação total após 164 minutos de incubação com agitação, descrita em 4.4.2.

QUADRO 2: Atividades enzimáticas obtidas para Pestalotiopsis westerdijkii QM 381 em submerso e semi-sólido

Tempo de ferment.	pH		Proteína solúvel mg proteína/mg enzima bruta		Celulase C ₁ Ativ.Relativa (%)		Celulase C _x u/g		Xilanas u/g		Protopectinase Ativ. Relativa (%)		Protease Absorvância x 100	
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
24	6,30	6,30	0,056	0,036	N	N	60	60	120	0	0,00	15,03	0,0	1,1
48	6,95	6,25	0,126	0,260	5	N	530	110	624	432	7,83	4,55	0,9	14,5
65	7,28	-----	0,117	-----	15	--	590	---	792	---	7,03	-----	1,0	-----
72	-----	6,05	-----	0,244	--	N	---	130	---	552	-----	0,00	---	17,0
89	7,51	-----	0,108	-----	2	--	760	---	756	---	7,03	-----	0,8	-----
96	-----	6,12	-----	0,239	--	N	---	430	---	684	-----	0,00	---	16,0
113	7,71	-----	0,092	-----	2	--	770	---	636	---	3,39	-----	0,3	-----
120	-----	6,27	-----	0,257	--	N	---	400	---	804	-----	0,00	---	14,0
144	-----	6,49	-----	0,284	--	N	---	420	---	672	-----	-----	---	10,5
168	-----	6,78	-----	0,270	--	N	---	250	---	396	-----	-----	---	6,0

A - Fermentação submersa

B - Cultura em semi-sólido

N - Atividade nula após 4 horas de incubação com agitação, como descrito em 4.4.2.

QUADRO 3: Atividades enzimáticas obtidas para Aspergillus niger ATCC 1004 em submerso e semi-sólido

Tempo de Ferment.	pH		Proteína solúvel mg proteína/mg enzima bruta		Celulase C ₁ Ativ. Relativa (%)		Celulase C _x u/g		Xilanase u/g		Protopectinase Ativ. Relativa (%)		Protease absorvância x100	
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
24	3,70	5,17	0,160	0,092	N	N	170	200	576	432	14,27	15,57	0,2	0,3
48	6,70	6,08	0,143	0,226	N	N	360	760	1008	1824	16,64	15,67	0,6	1,7
72	7,10	6,60	0,141	0,279	N	N	470	1270	1368	2160	0,00	10,97	0,8	8,8
96	7,39	6,85	0,132	0,277	N	N	370	1360	1272	2508	0,00	5,87	0,7	13,0
120	7,51	7,29	0,085	0,305	N	N	375	1660	984	2724	0,00	6,90	1,0	17,2
144	7,55	7,35	-----	0,367	N	N	----	1590	----	3000	0,00	5,51	1,5	13,9

A - Fermentação submersa

B - Cultura em semi-sólido

N - Atividade nula após 4 horas de incubação com agitação, como descrito em 4.4.2.

QUADRO 4: Comparação do potencial enzimático dos Fungos *T. viride* QM 9123, *P.westerdijkii* QM 381 e *A. niger* ATCC 1004

Microorganismo	Celulase C ₁ Degrad. de Papel filtro minutos	Celulase C _x (C.M.C.-ase) u/g	Xilanase u/g	Protopectinase Degrad.de Batata ativ.Relativa %	Protease Absorvância	Proteína solúvel mg proteína/ mg enzima bruta
<i>T. viride</i>						
" Submerso	164	720	852	33,74	NT	0.124
" Semi-sólido	143	1280	1584	56,10	NT	0.308
<i>P. westerdijkii</i>						
" Submerso	> 240	770	792	7,83	0.010	0.126
" Semi-sólido	N	430	804	15,03	0.170	0.284
<i>A. niger</i>						
" Submerso	N	470	1368	16,64	0,015	0.160
" Semi-sólido	N	1660	3000	15,67	0.172	0.367
Enzimas comerciais						
Y.B. (Indust)	217	800	1164	60,76	0.010	0.076
H.K.B.(Farmac.)	300	2680	1776	68,77	0.011	0.244

N - Atividade nula após 4 horas de incubação agitada descrita em 4.4.2.

NT - Não testada

Y.B. - Cellulase "ONOZUKA" Ss, YAKUIT BIOCHEMICAL Co. Ltd. JAPAN

H.K.B.- Cellulase in AC, HANKYU, KYOI BUSSAM Co. Ltd.

QUADRO 5: Efeito de Tween 80 na produção de celulasas, xilanase e protopectinase por fermentação submersa

Microorganismo	Atividade de celulase C ₁ (Degrad. papel filtro) Min.	Atividade de celulase u/g	C _x	Xilanase u/ml	Protopectinase (Degrad. batata) At. relativa (%)	Proteína solú-vel. mg de prot./mg de Ez. bruta
<u>T. viride:</u>						
" Semi-sólido	143	1280		3.75	56.10	0.308
" Submerso sem Tw. 80	164	660		2.40	37.47	0.173
" Submerso com 0.1% Tw.	115	960		3.03	59.77	0.205
" Submerso com 0.3% Tw.	265	400		2.52	14.50	—
<u>Enzimas Comerciais:</u>						
Y.B. (indust.)	217	800		—	60.76	0.076
H.K.B. (Farmac.)	300	2680		—	68.77	0.244

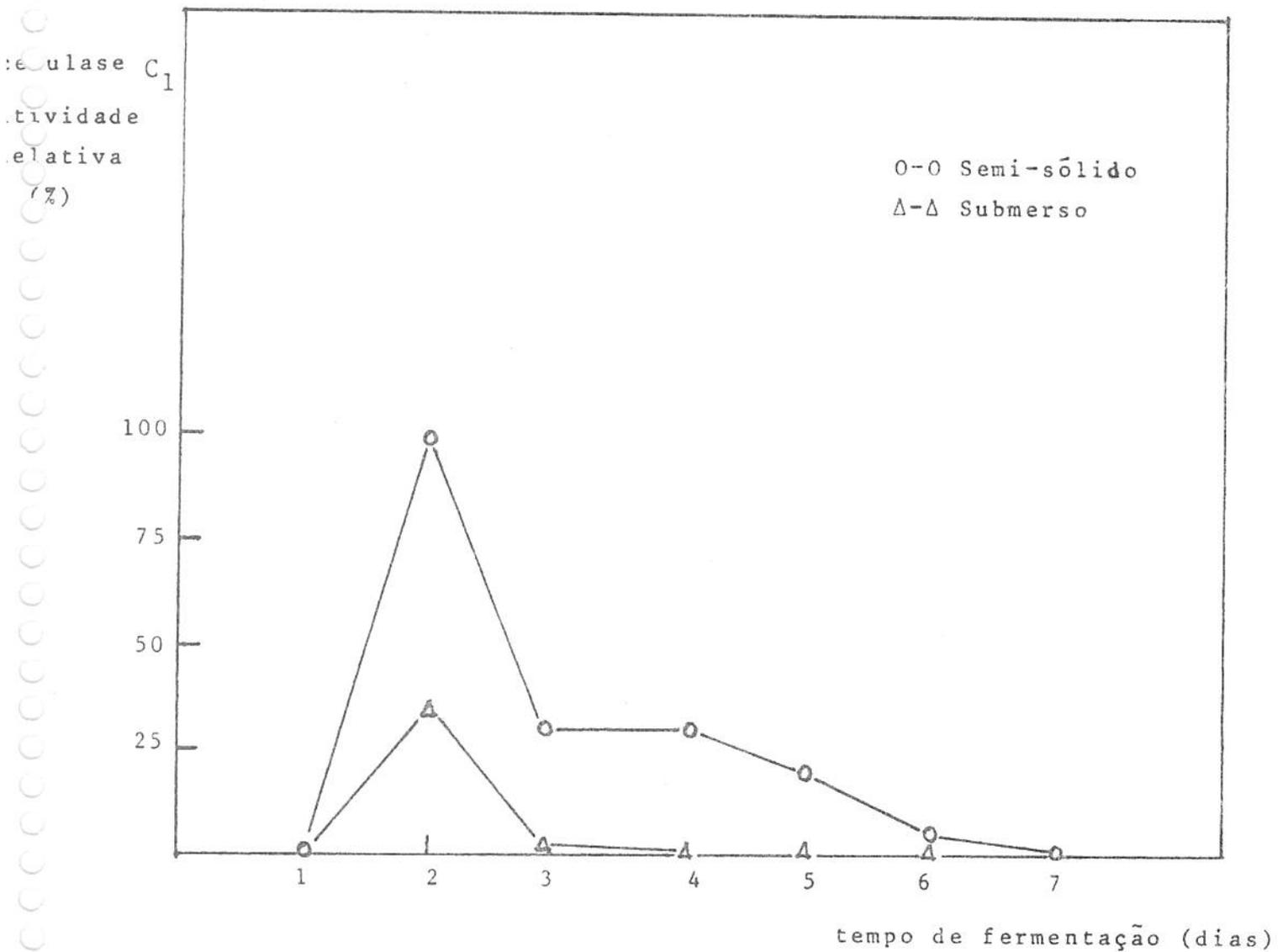
Y.B. - Cellulase "ONOZUKA" SS, YAKUIT BIOCHEMICAL Co. Ltd. JAPAN

H.K.B.-Cellulase in AC, HANKYU, KYOI BUSSAM Co. Ltd.

QUADRO 6 : Efeito da fonte de celulose na produção de celulase C_x e xilanase por cultura em semi-sólido.

Meio	Atividade de celulase C_x u/ml	Atividade de xilanase u/ml
Farelo de trigo	3,10	3,21
Farelo de trigo + (polpa tratada) bagaço de cana	2,58	3,66
Farelo de trigo + sabugo de milho	2,03	2,91
Farelo de trigo + cascas de arroz	2,18	0,36

FIGURA 1

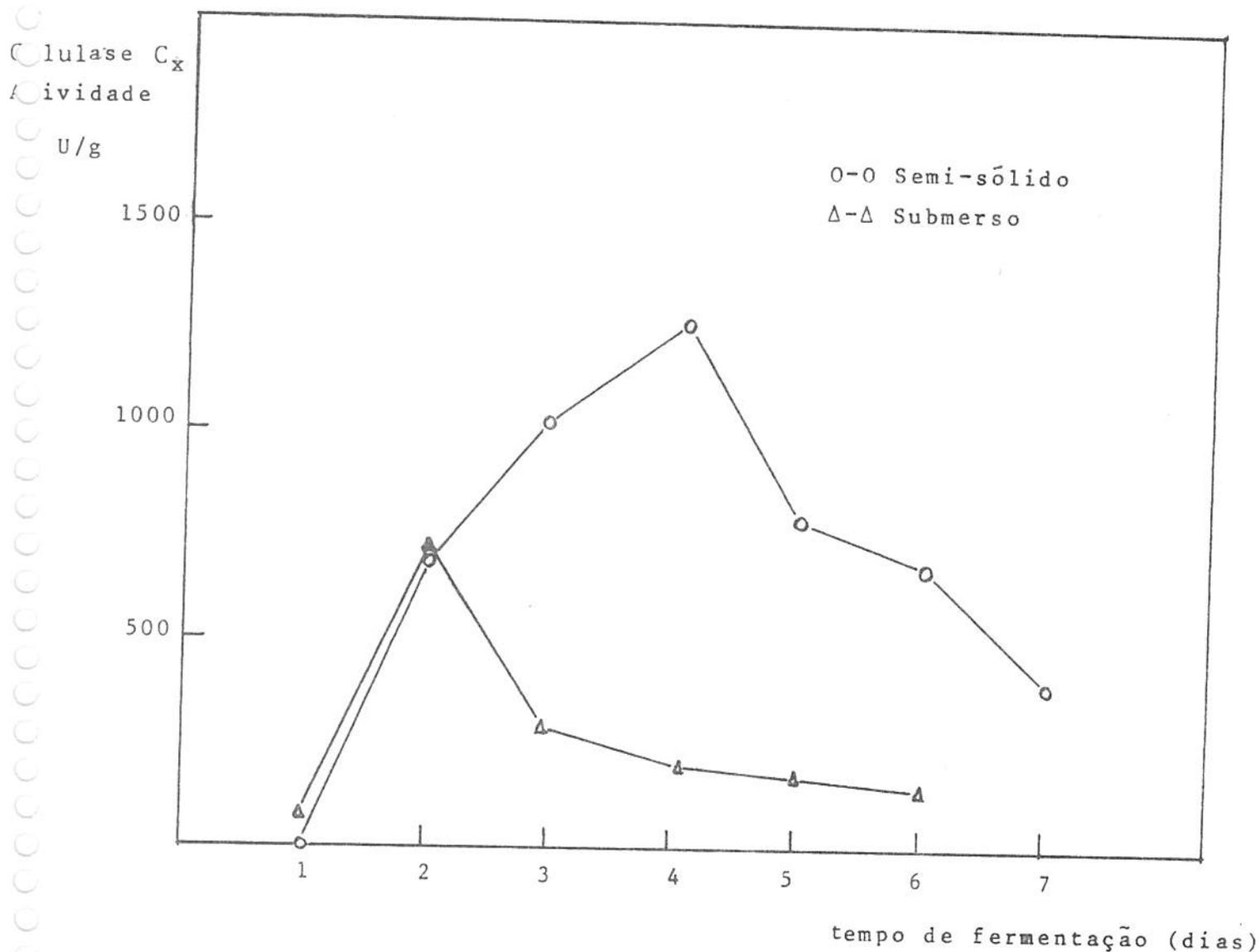


Atividades de celulase C_1 obtidas por fermentação submersa e por cultura em semi-sólido para Trichoderma viride QM 9123

Meio : (a) Submerso; Reese e Mandels
(b) Semi-sólido; Farelo de trigo com 40-45% de umidade

Inóculo : (a) Submerso: 1 ml de uma suspensão de esporos de $8,5 \times 10^6$ esporos/ml.
(b) Semi-sólido: 2 ml de uma suspensão de esporos de $8,5 \times 10^6$ esporos/ml.

FIGURA 2



Atividades de celulase C_x obtidas por fermentação submersa e por cultura em semi-sólido para Trichoderma viride QM 9123

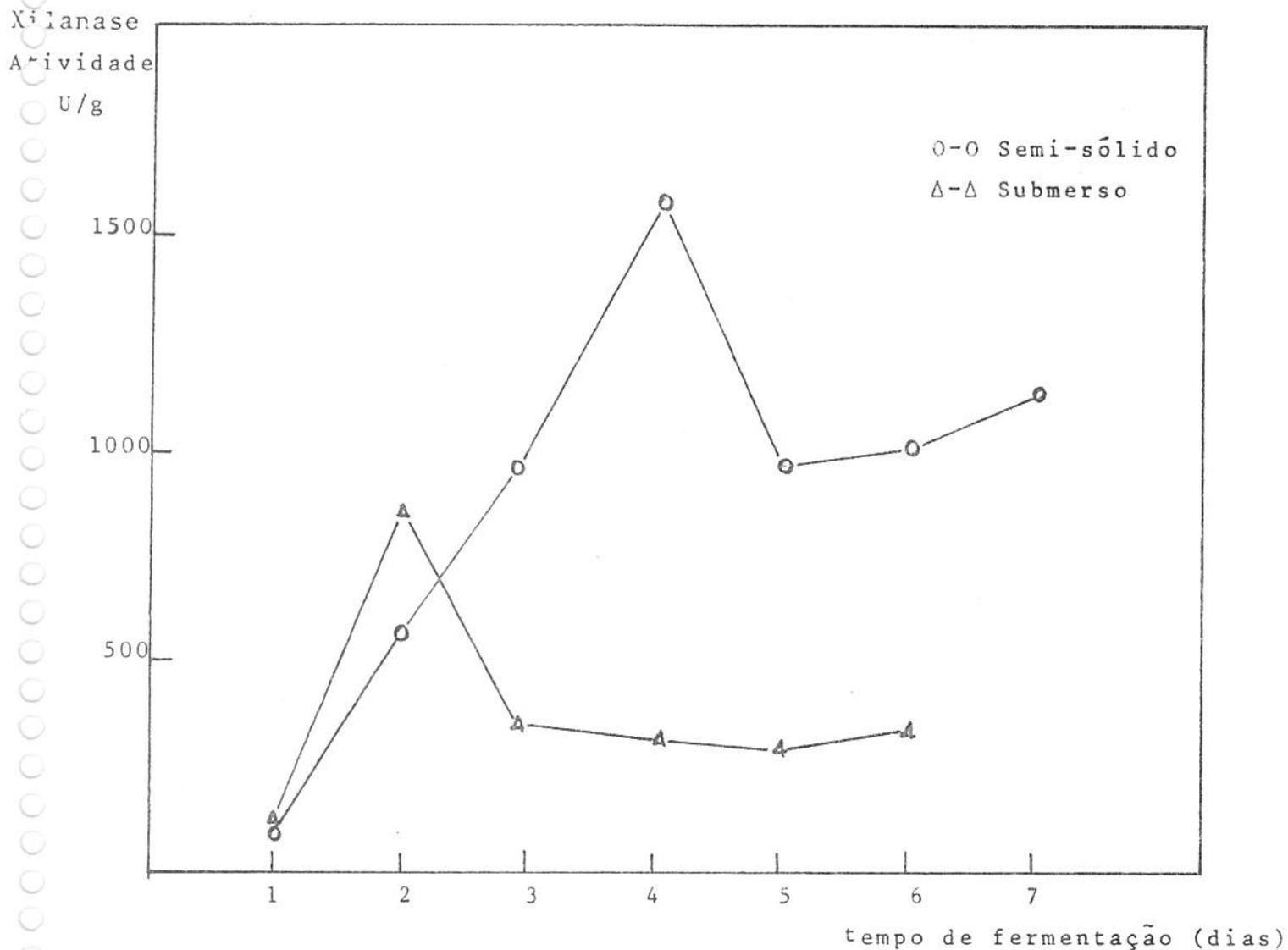
Meio: (a) Submerso: Reese e Mandels

(b) Semi-sólido: Farelo de trigo com 40-45% umidade

Inóculo(a) Submerso: 1 ml de uma suspensão de esporo de $8,5 \times 10^6$ esporos/ml.

(b) Semi-sólido: 2 ml de uma suspensão de esporo de $8,5 \times 10^6$ esporos/ml.

FIGURA 3



Atividades de xilanase obtidas por fermentação submersa e por cultura em semi-sólido para Trichoderma viride QM-9123

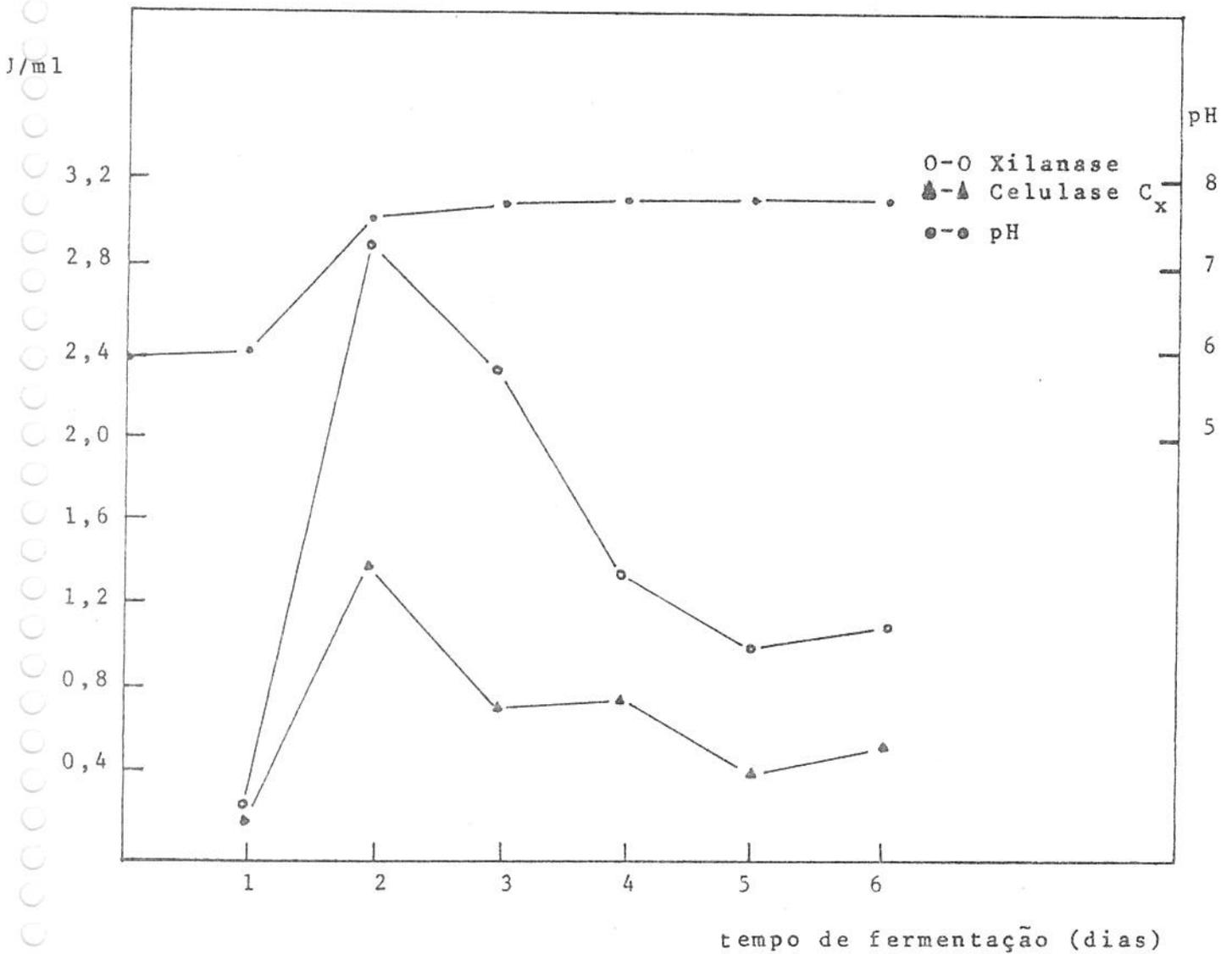
Meio (a) Submerso: Reese e Mandels

(b) Semi-sólido: Farelo de trigo com 40-45% umidade

Inóculo(a) Submerso: 1 ml de uma suspensão de esporo de $8,5 \times 10^6$ esporos/ml.

(b) Semi-sólido: 2 ml de uma suspensão de esporos de $8,5 \times 10^6$ esporos /ml.

FIGURA 4

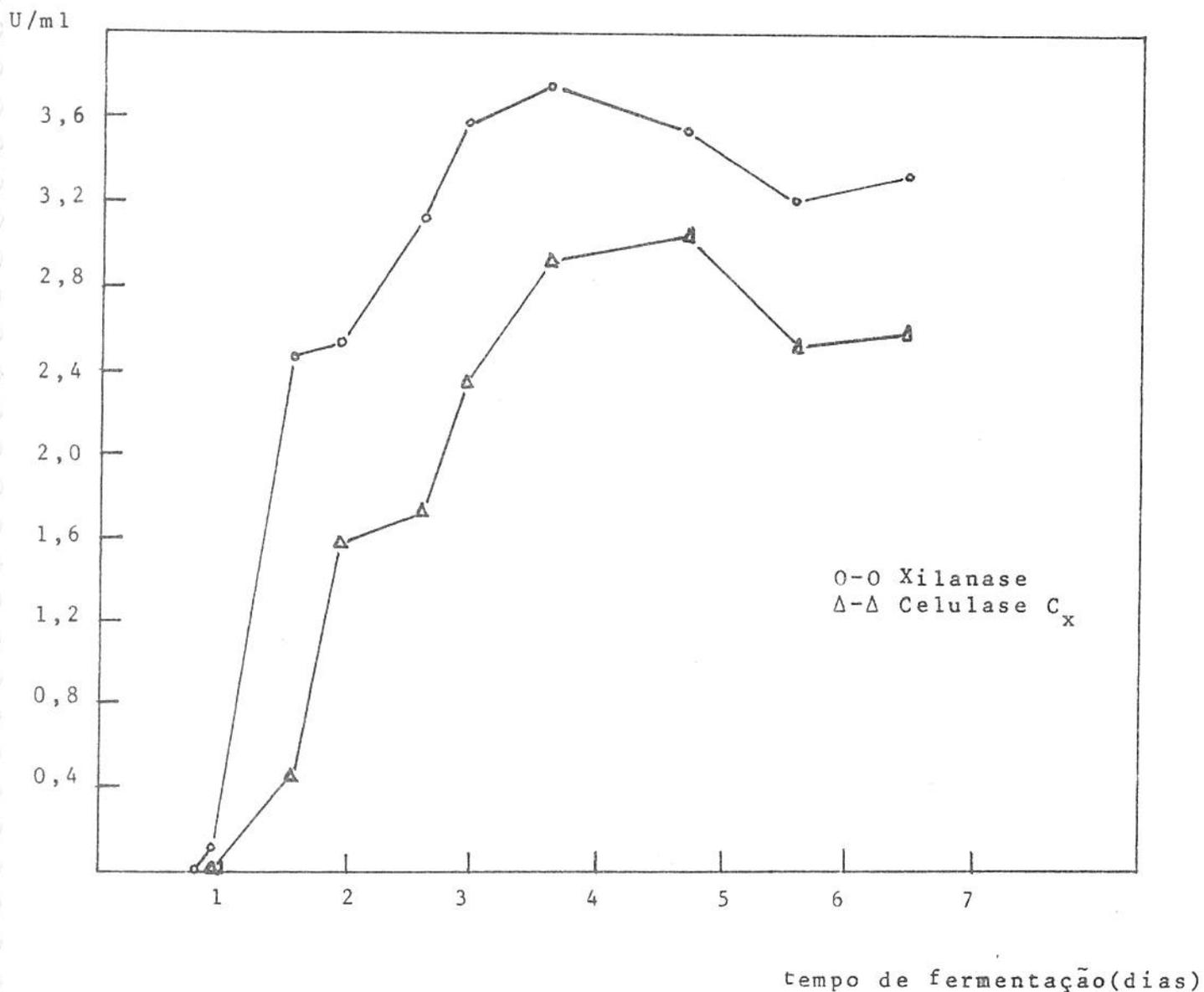


Atividades de celulase C_x e xilanase, no filtrado de cultura, obtidas por fermentação submersa para Trichoderma viride QM 9123

Meio : Reese e Mandels

Inóculo: 1,5 ml de uma suspensão de esporo de $9,4 \times 10^6$ esporos/ml

FIGURA 5

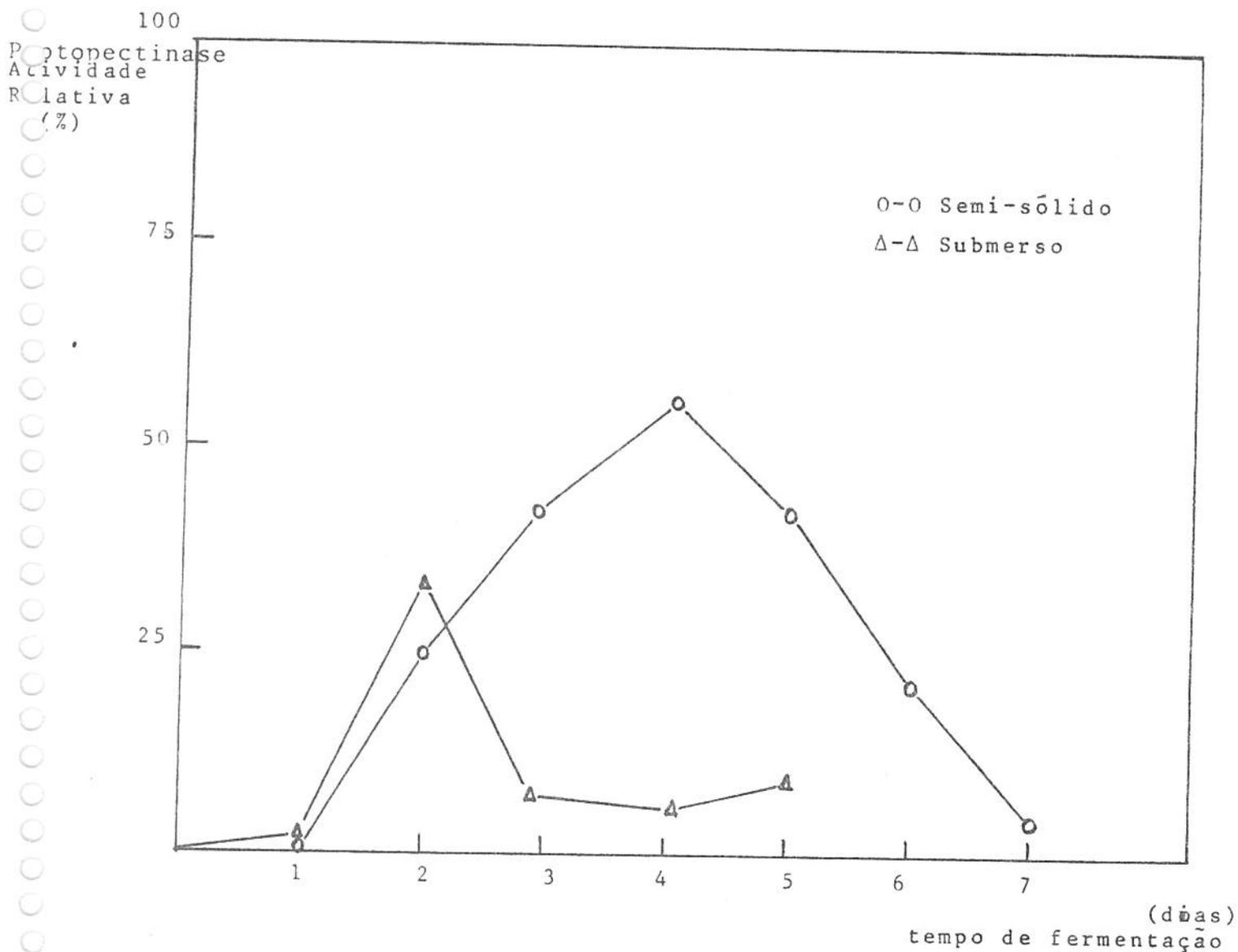


Atividades de celulase C_x e xilanase, no filtrado de cultura, obti-
das por cultura em semi-sólido para Trichoderma viride QM 9123

Meio : Farelo de trigo com 40 - 45% umidade

Inóculo: 1 ml da suspensão de esporos de uma cultura estoque em
20 ml de água destilada.

FIGURA 6



Atividades de protopectinase (cell separating enzyme) obtidas por fermentação submersa e por cultura em semi-sólido para Trichoderma viride QM 9123

Meio: (a) Submerso: Reese e Mandels

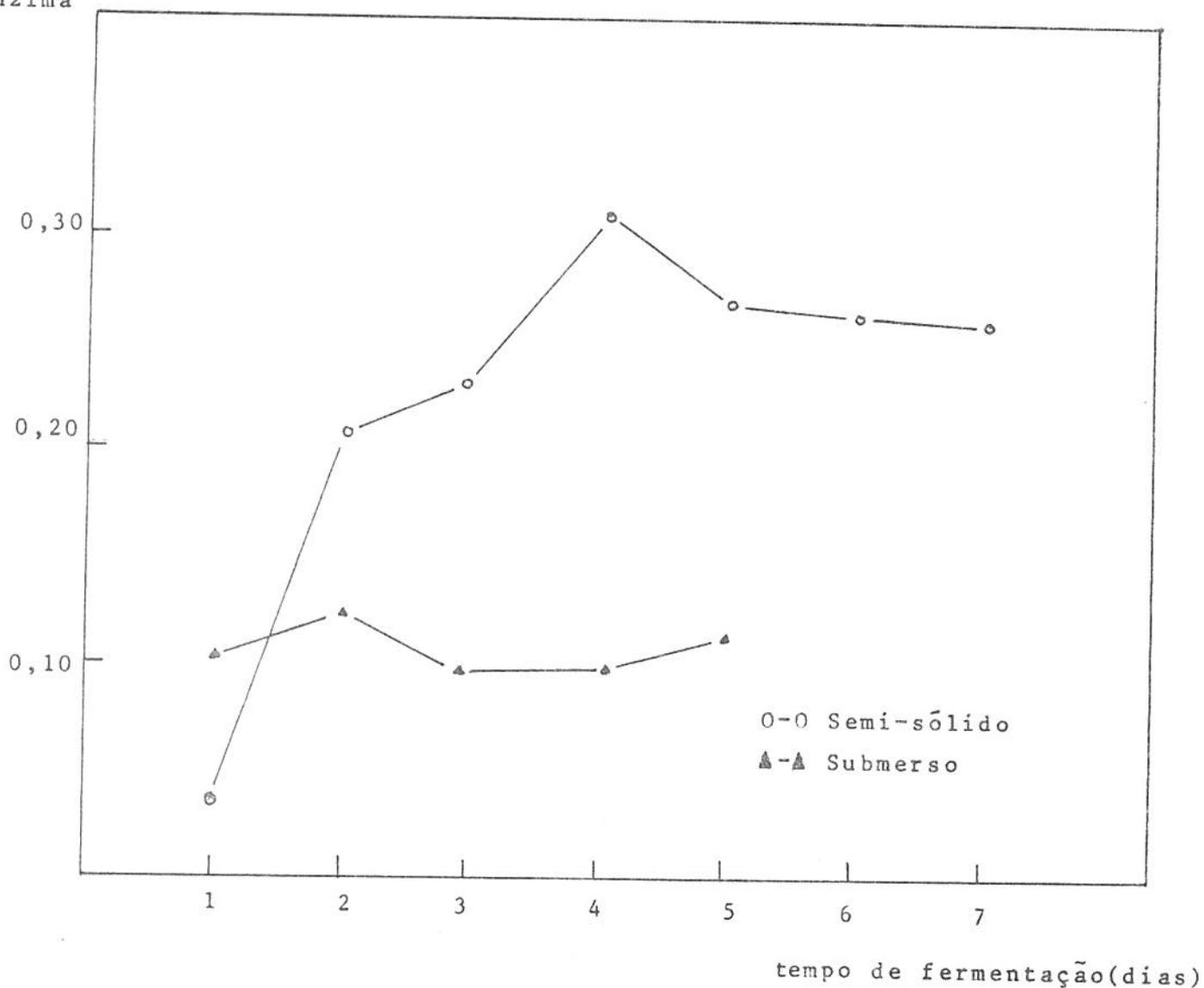
(b) Semi-sólido: Farelo de trigo com 40-45 % umidade

Inóculo (a) Submerso: 1 ml de uma suspensão de esporo de $8,5 \times 10^6$ esporos/ml.

(b) Semi-sólido: 2 ml de uma suspensão de esporo de $8,5 \times 10^6$ esporos/ml.

FIGURA 7

Proteína Solúvel
g de proteína/
g de enzima
rata



Proteína Solúvel - Fermentação submersa e semi-sólido para T.vi-
ride QM 9123

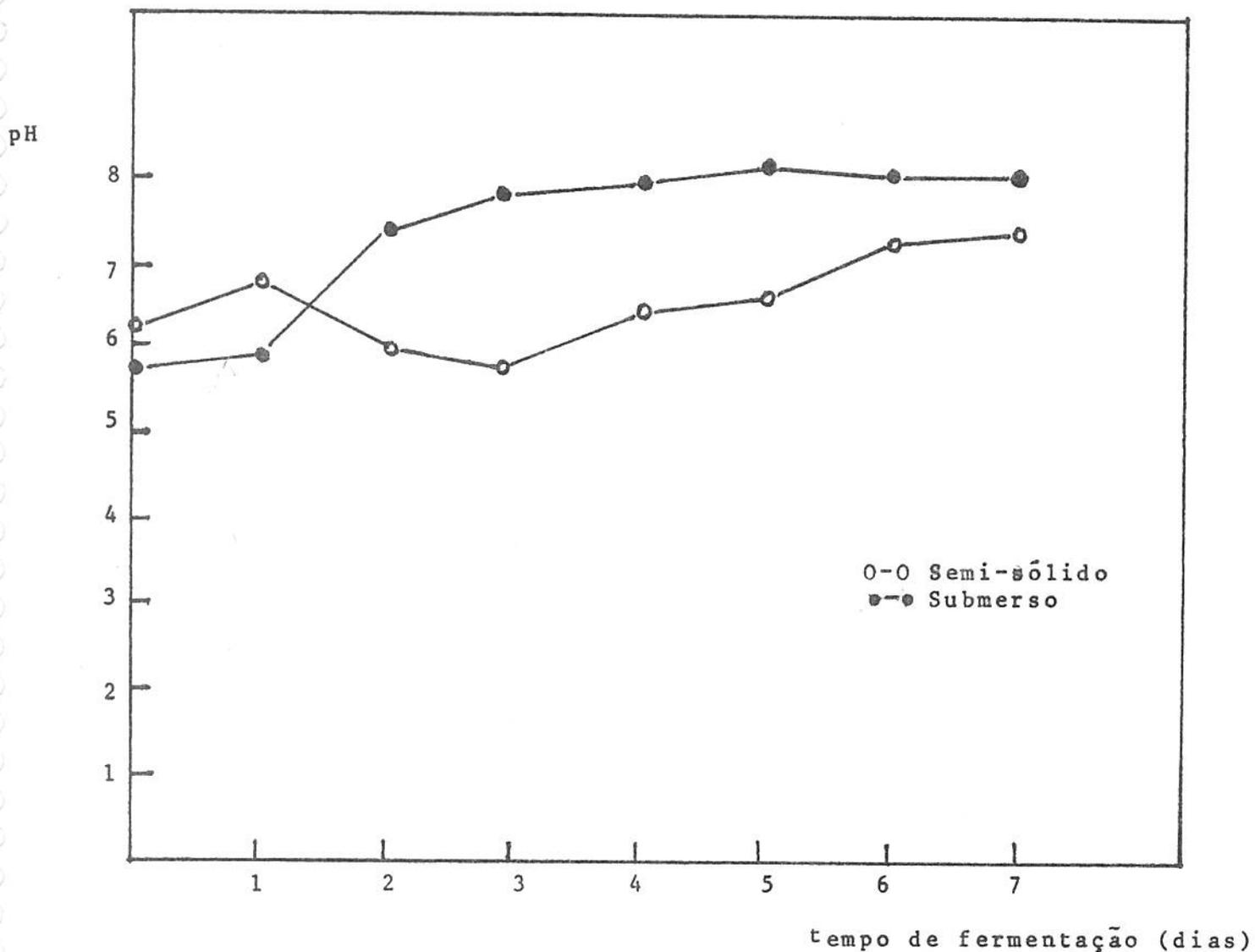
Meio : (a) Submerso: Reese e Mandels

(b) Semi-sólido: Farelo de trigo com 40-45% de umidade

Inóculo (a) Submerso; 1 ml de uma suspensão de esporo de $8,5 \times 10^6$ esporos/ml.

(b) Semi-sólido: 2 ml de uma suspensão de esporo de $8,5 \times 10^6$ esporos/ml.

FIGURA 8

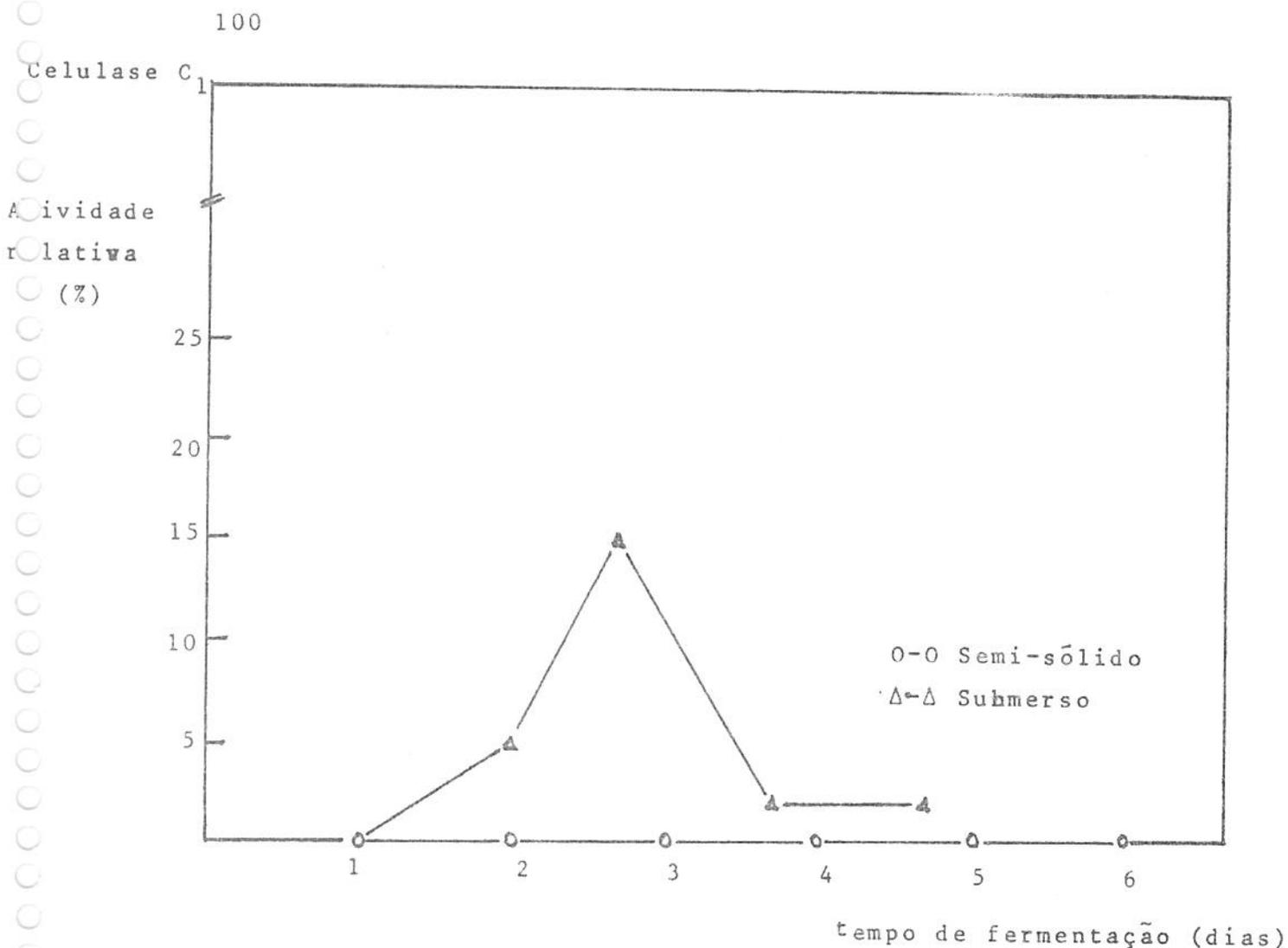


Variação de pH durante as fermentações submersa e semi-sólido para Trichoderma viride QM 9123

Meio : (a) Submerso: Reese e Mandels
(b) Semi-sólido; Farelo de trigo com 40-45% de umidade

Inóculo : (a) Submerso: 1 ml de uma suspensão de esporos de $8,5 \times 10^6$ esporos/ml.
(b) Semi-sólido: 2 ml de uma suspensão de esporos de $8,5 \times 10^6$ esporos/ml.

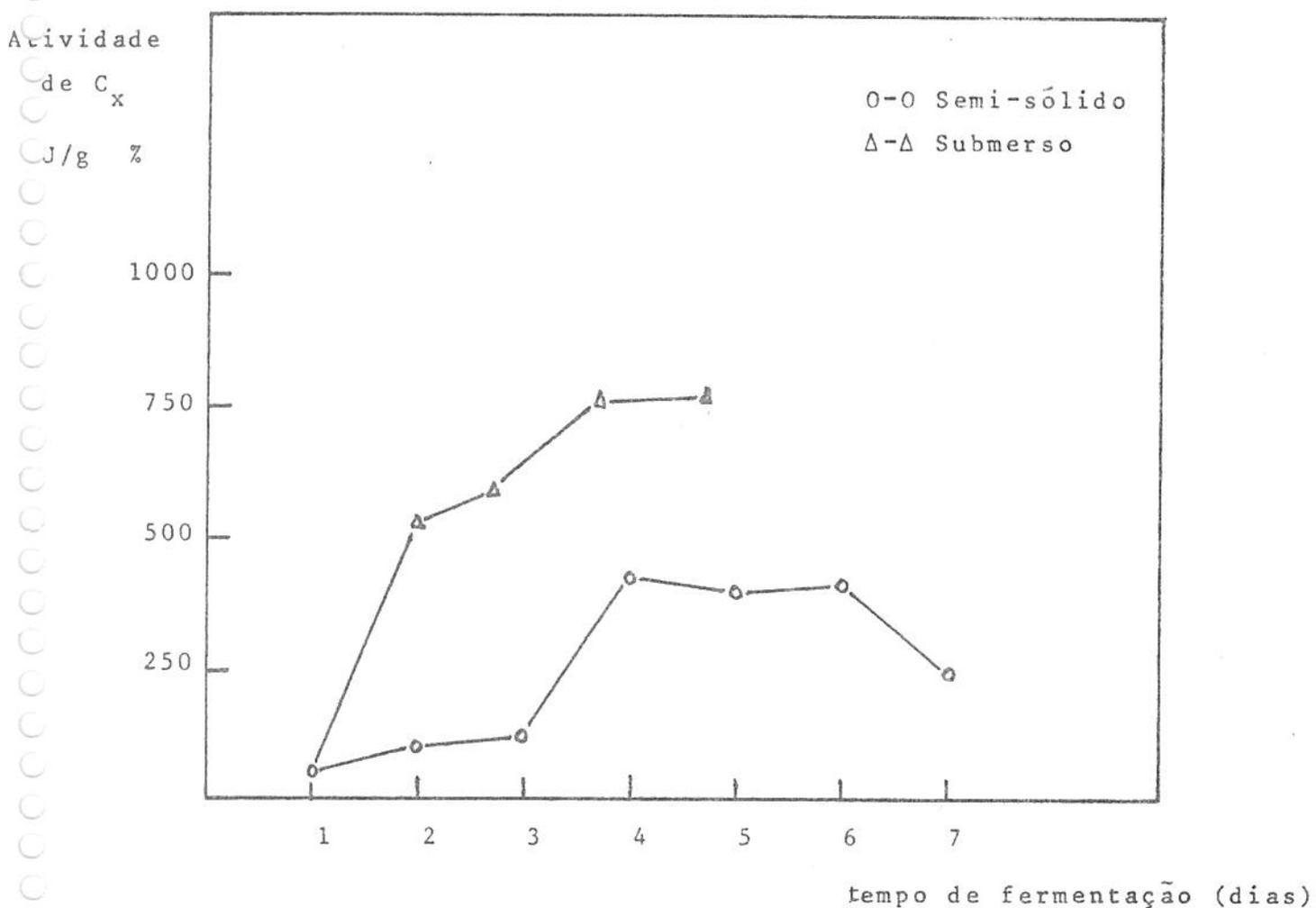
FIGURA 9



Atividades da celulase C₁ obtidas por fermentação submersa e por cultura em semi-sólido para o fungo Pestalotiopsis westerdijkii QM 381.

- Meios: (a) Submerso: Reese e Mandels
(b) Semi-sólido: Farelo de trigo com 40-45% de umidade
- Inóculo: (a) Submerso: 1 ml de uma suspensão de esporos de $3,4 \times 10^6$ esporos/ml.
(b) Semi-sólido: 1,5 ml de uma suspensão de esporos de $3,4 \times 10^6$ esporos/ml.

FIGURA 10



Atividades de celulase C_x obtidas por fermentação submersa e por cultura em semi-sólido para o fungo Pestalotiopsis westerdijkii QM 381.

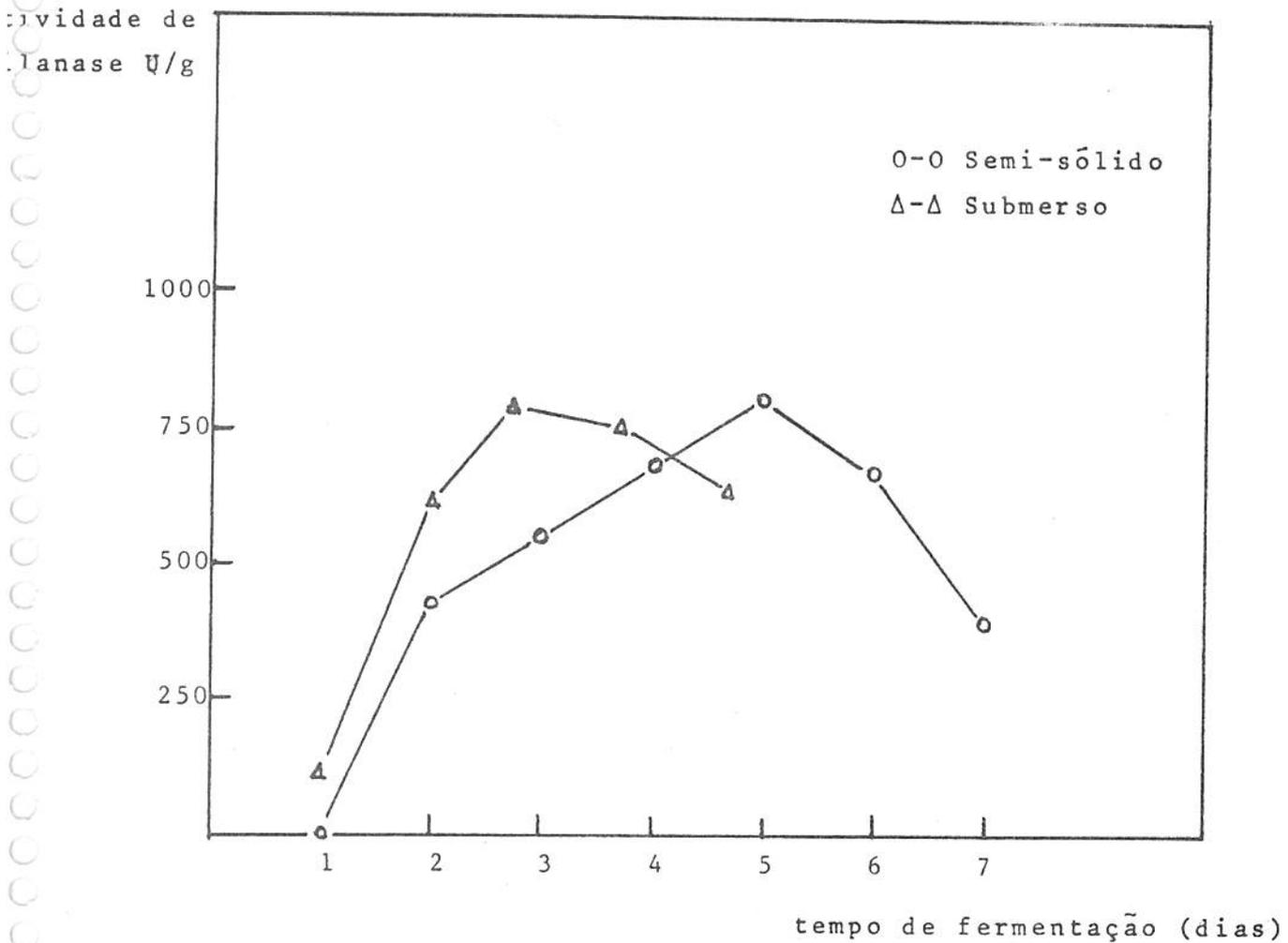
Meios: (a) Submerso: Reese e Mandels

(b) Semi-sólido: Farelo de trigo com 40-45% de umidade

Inoculase: (a) Submerso: 1 ml de uma suspensão de esporos de $3,4 \times 10^6$ esporos/ml.

(b) Semi-sólido: 1,5 ml de uma suspensão de esporos de $3,4 \times 10^6$ esporos/ml.

FIGURA 11



Atividades de xilanase obtidas por fermentação submersa e por cultura em semi-sólido para o fungo Pestalotiopsis westerdijkii QM 381.

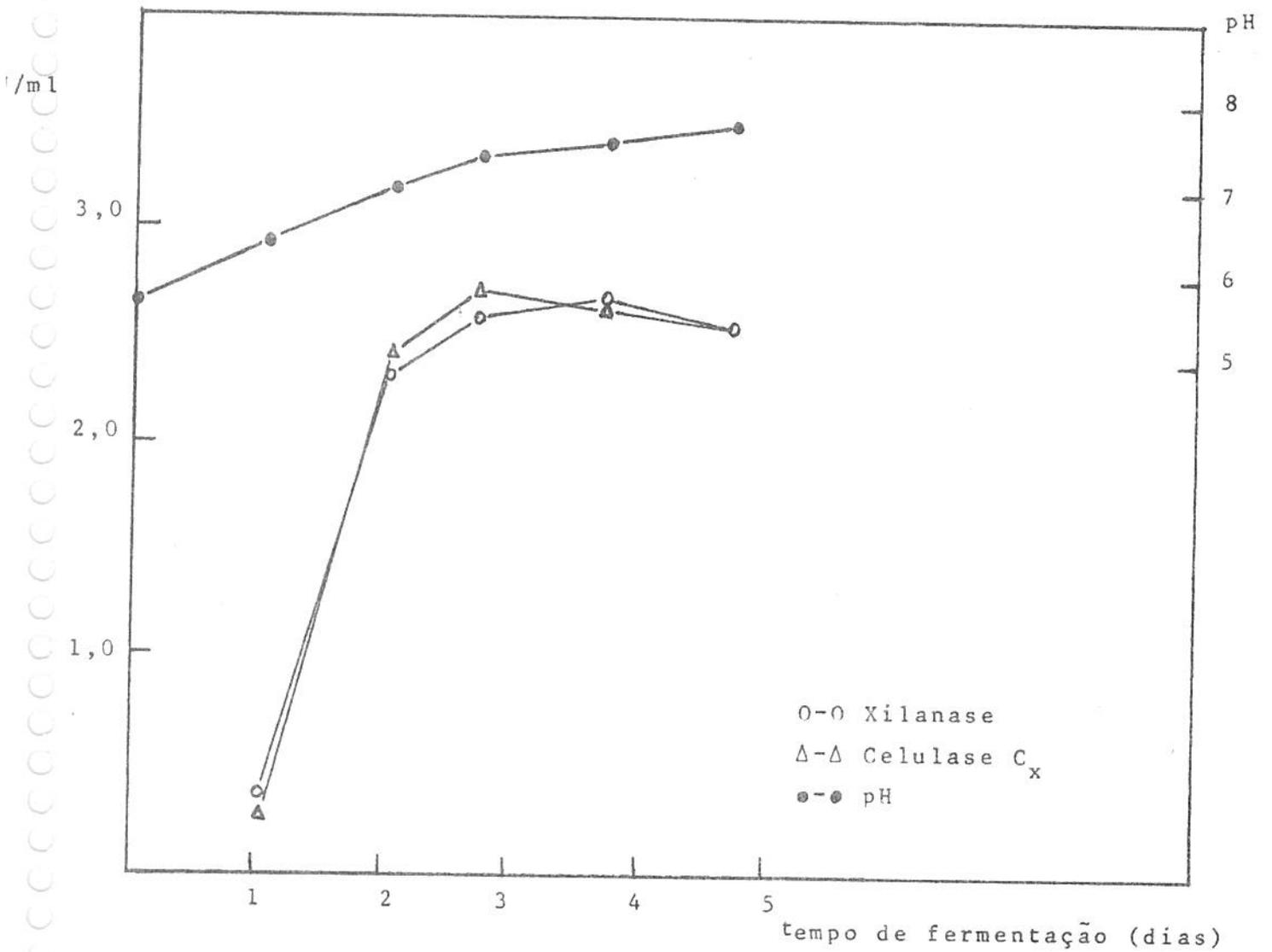
Meios: (a) Submerso: Reese e Mandels

(b) Semi-sólido: Farelo de trigo com 40-45% de umidade

Inóculo: (a) Submerso: 1 ml de uma suspensão de esporo de $3,4 \times 10^6$ esporos/ml.

(b) Semi-sólido; 1,5 ml de uma suspensão de esporo de $3,4 \times 10^6$ esporos/ml.

FIGURA 12

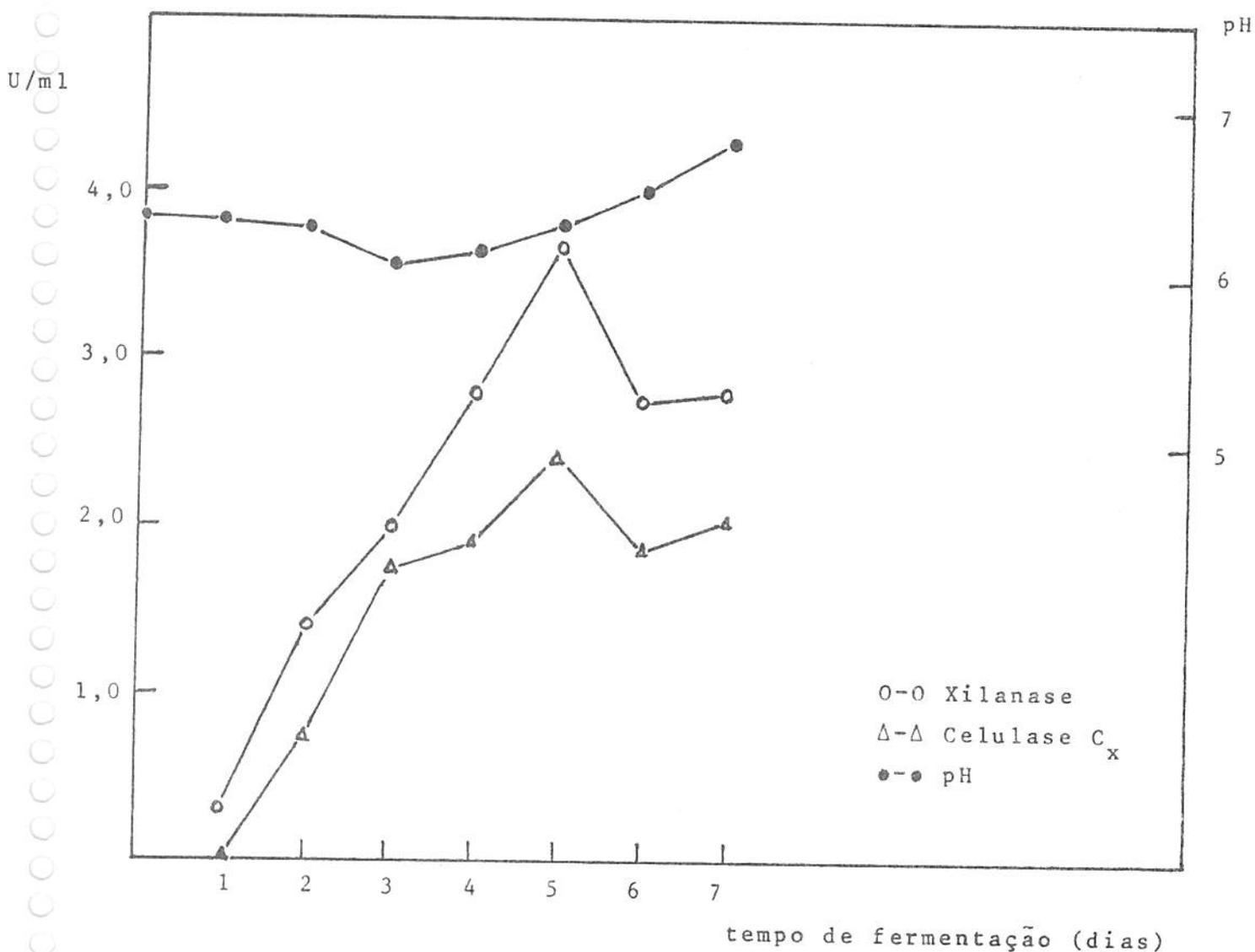


Atividades de celulase C_x e xilanase, no filtrado de cultura, obtidas por fermentação submersa para Pestalotiopsis westerdijkii QM 381.

Meio: Reese e Mandels

Inóculo: 1 ml de uma suspensão de esporo de $3,4 \times 10^6$ esporos/ml.

FIGURA 13

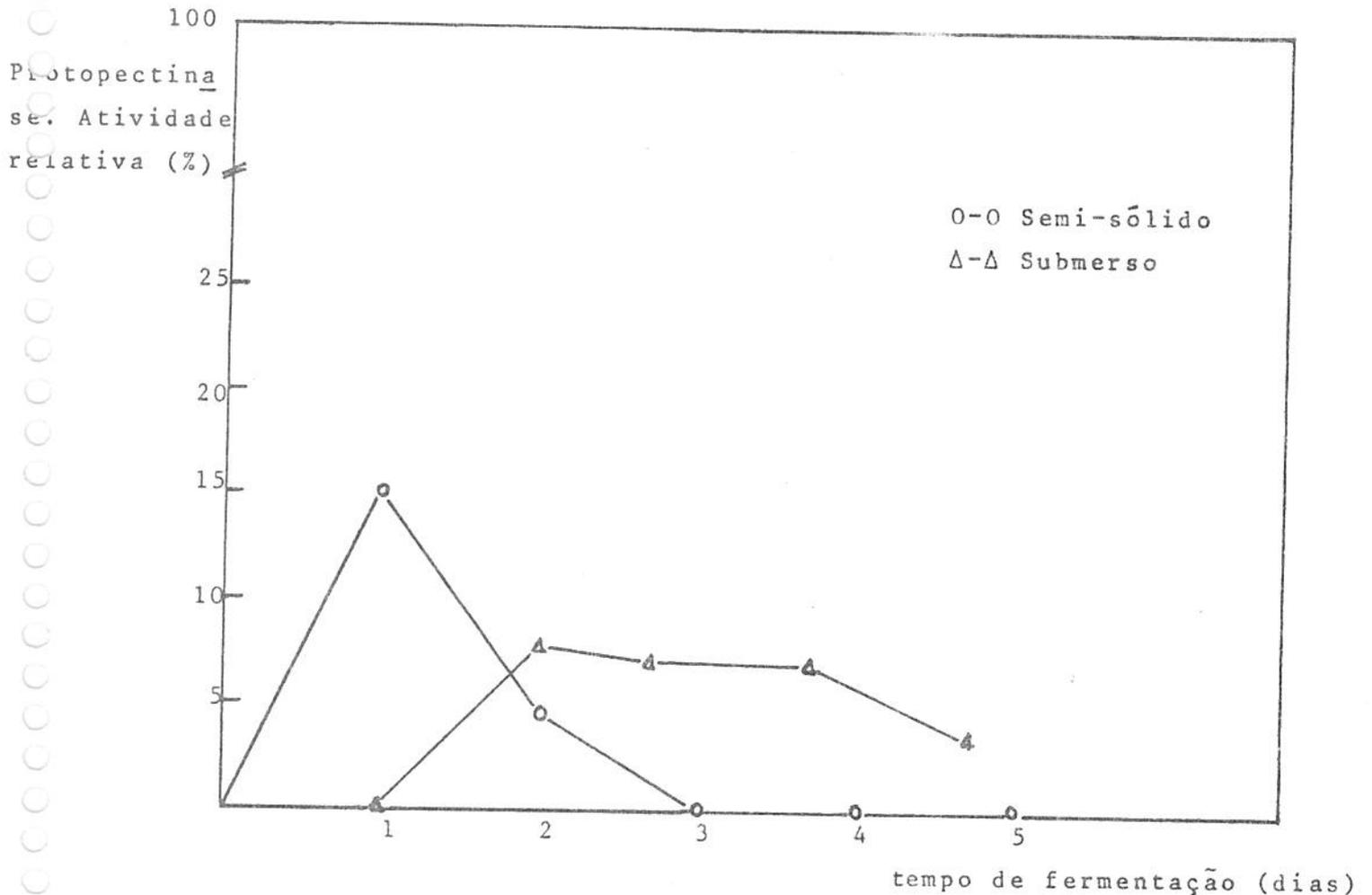


Atividades de celulase C_x e xilanase, no filtrado de cultura, obtidas por cultura em semi-sólido para Pestalotiopsis westerdijkii QM 381.

Meio: Farelo de trigo com 40-45% de umidade

Inóculo: 1,5 ml de uma suspensão de esporo de $3,4 \times 10^6$ esporos/ml.

FIGURA 14



Atividades de protopectinase obtidas por fermentação submersa e por cultura em semi-sólido para Pestalotiopsis westerdijkii QM 381.

Meios: (a) Submerso: Reese e Mandels

(b) Semi-sólido: Farelo de trigo com 40-45% de umidade

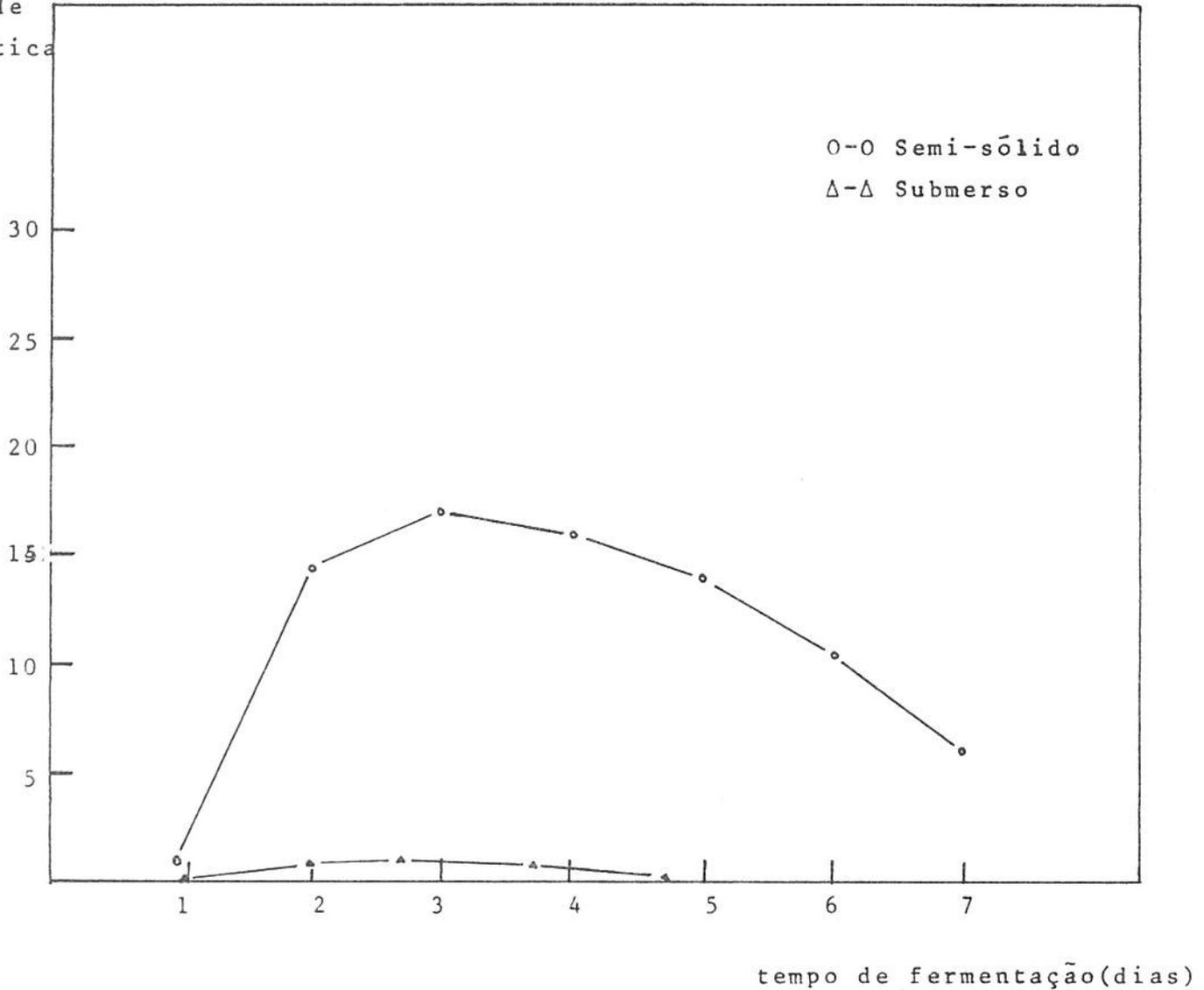
Inóculos. (a) Submerso: 1 ml de uma suspensão de esporos de $3,4 \times 10^6$ esporos/ml.

(b) Semi-sólidos: 1,5 ml de uma suspensão de esporos de $3,4 \times 10^6$ esporos/ml.

FIGURA 15

Atividade
Proteolítica

(Absorvância) x100



Atividades proteolíticas obtidas por fermentação submersa e por cultura em semi-sólido para o fungo Pestalotiopsis westerdijkii QM 381.

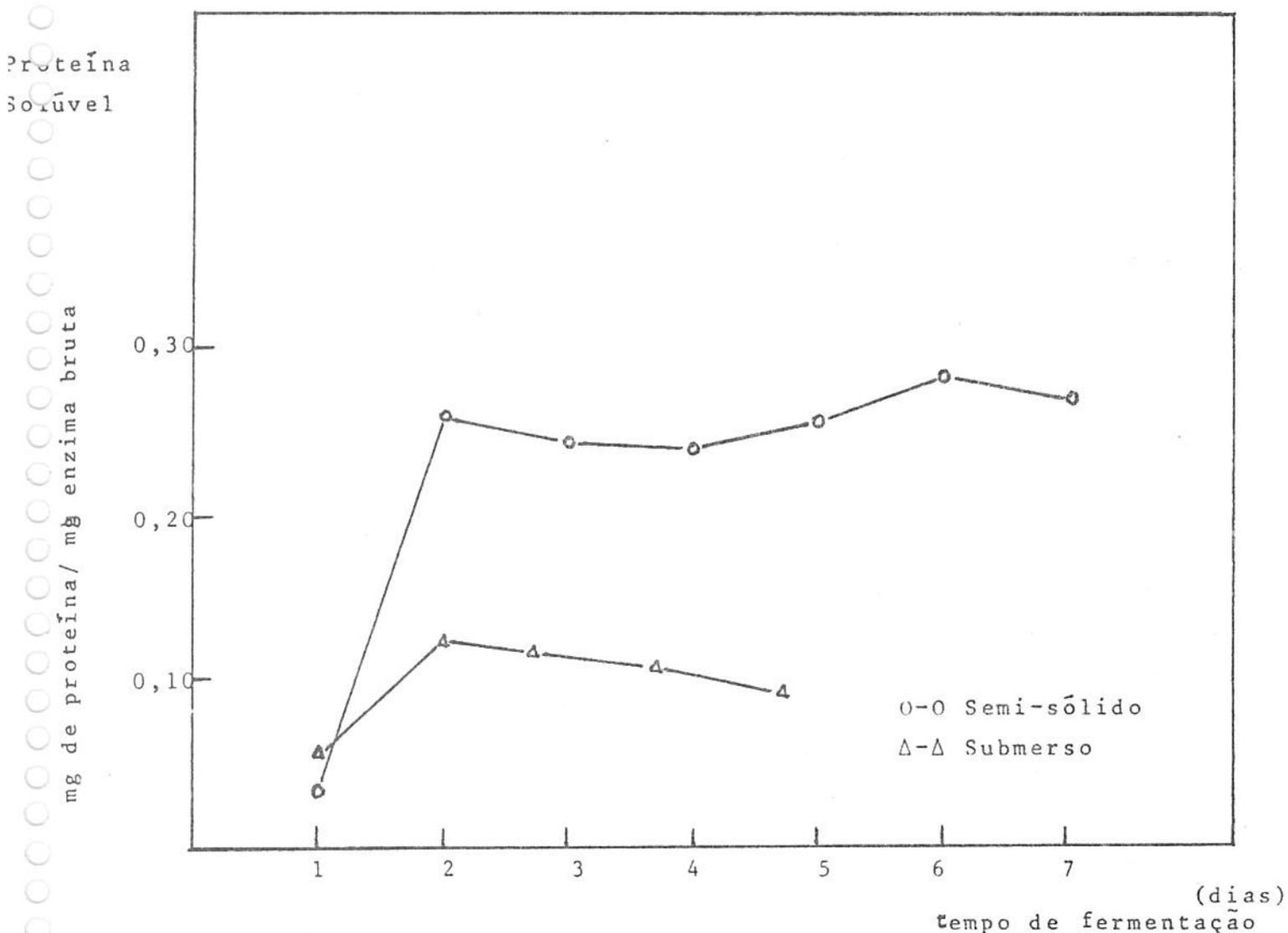
Meios: (a) Submerso: Reese & Mandels

(b) Semi-sólido: Farelo de trigo com 40-45% de umidade

Inóculo: (a) Submerso: 1 ml de uma suspensão de esporos de $3,4 \times 10^6$ esporos/ml.

(b) Semi-sólido: 1,5 ml de uma suspensão de esporos de $3,4 \times 10^6$ esporos/ml.

FIGURA 16



Proteína solúvel - Fermentação submersa e semi-sólida para *Pestalotiopsis westerdijkii* QM 381.

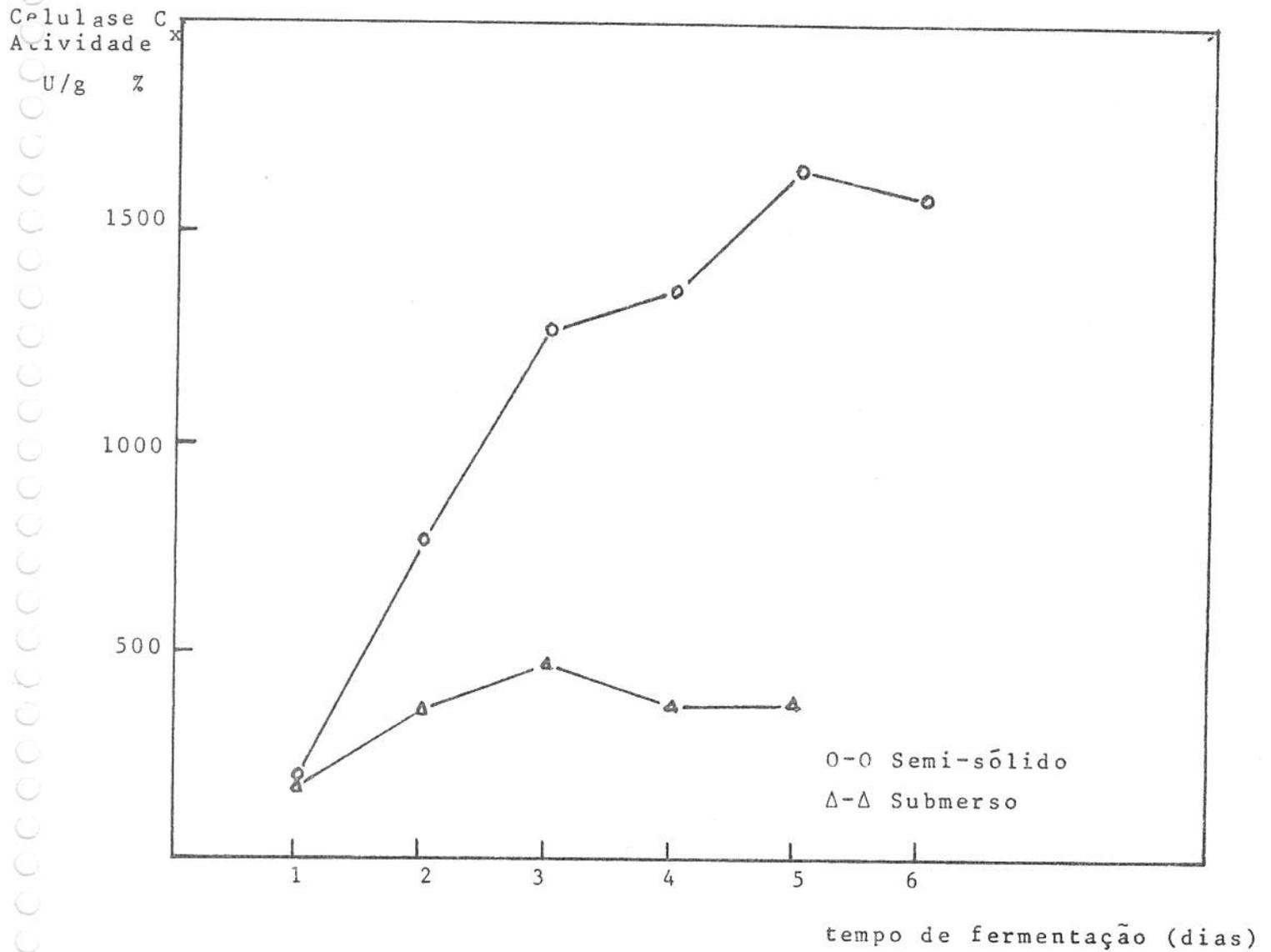
Meios: (a) Submerso: Reese e Mandels

(b) Semi-sólido: Farelo de trigo com 40-45% de umidade

Inóculos: (a) Submerso: 1 ml de uma suspensão de esporos de $3,4 \times 10^6$ esporos/ml.

(b) Semi-sólidos: 1,5 ml de uma suspensão de esporos de $3,4 \times 10^6$ esporos/ml.

FIGURA 17



Atividades de Celulase C_x obtidas por fermentação submersa e por cultura em semi-sólido para Aspergillus niger ATCC 1004

Meio: (a) Submerso: Reese e Mandels

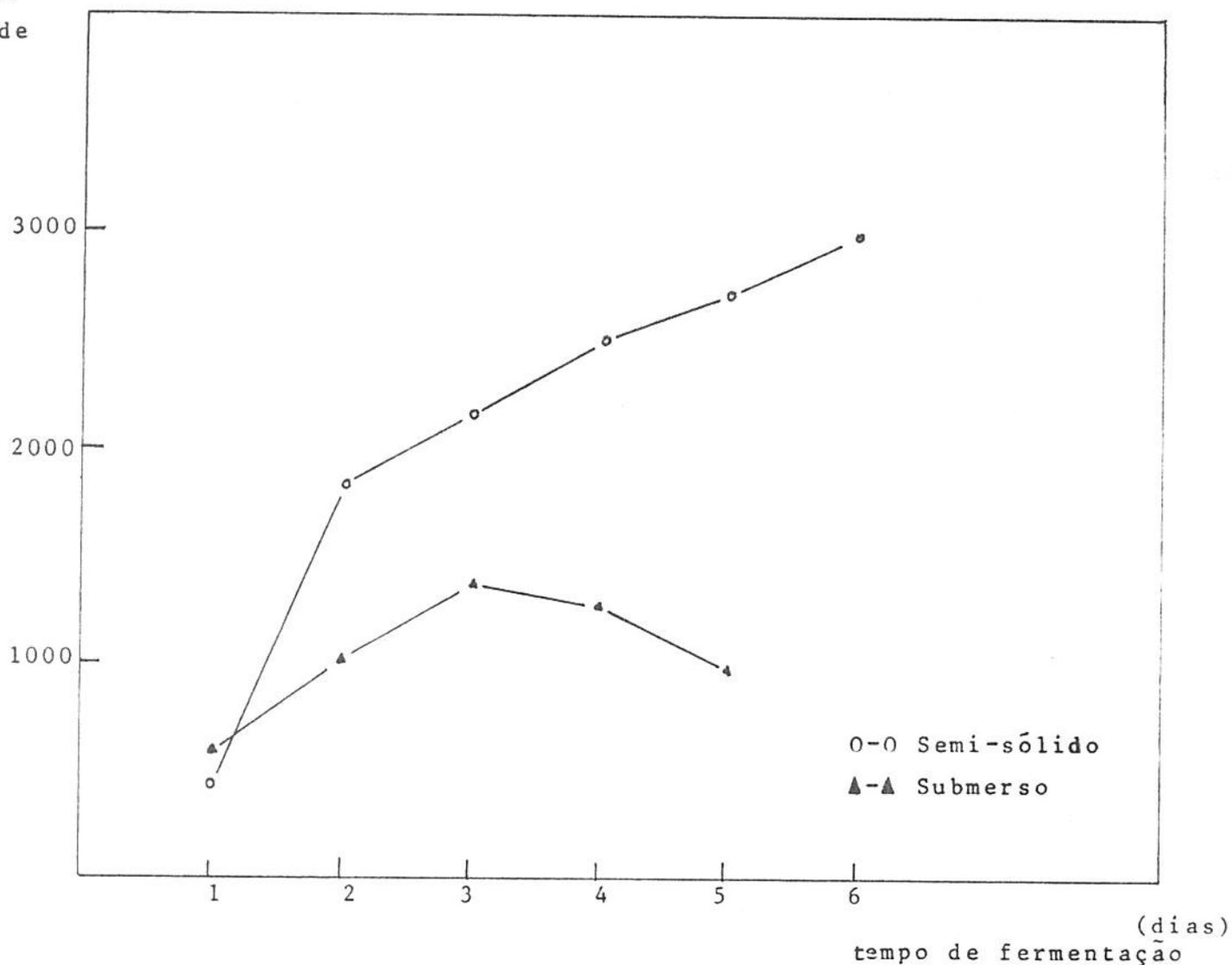
(b) Semi-sólido: Farelo de trigo com 40-45% de umidade

Inóculo(a) Submerso: 1 ml de uma suspensão de esporo de $25,5 \times 10^6$ esporos/ml.

(b) Semi-sólido: 1,5 ml de uma suspensão de esporo de $25,5 \times 10^6$ esporos/ml.

FIGURA 18

xi Lanase
atividade
U/g



Atividades de xilanase obtidas por fermentação submersa e por cultura em semi-sólido para Aspergillus niger ATCC 1004

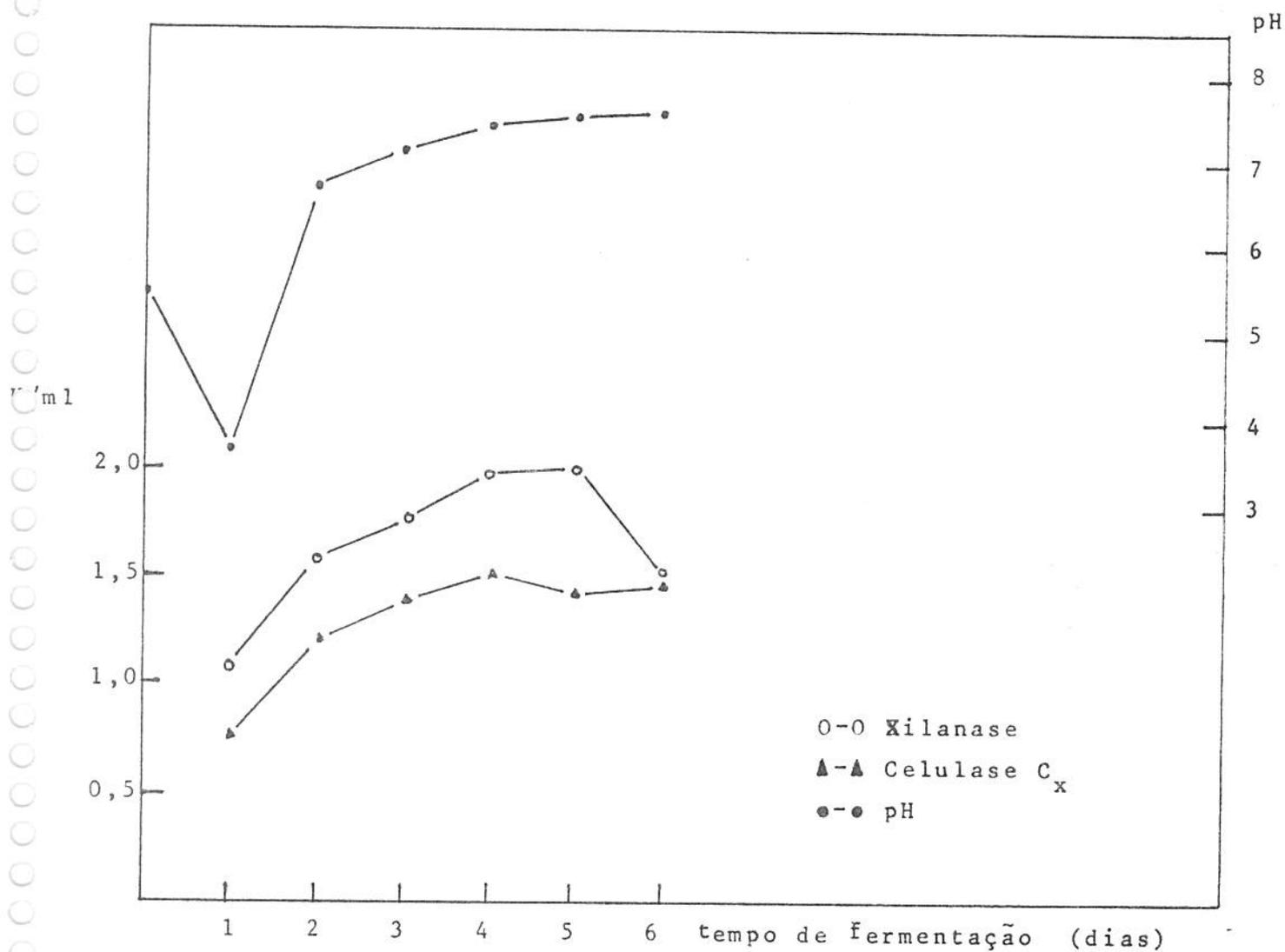
Meio (a) Submerso: Reese e Mandels

(b) Semi-sólido: Farelo de trigo com 40-45% de umidade

Inóculo(a) Submerso: 1 ml de uma suspensão de esporo de $25,5 \times 10^6$ esporos/ml.

(b) Semi-sólido: 1,5 ml de uma suspensão de esporo de $25,5 \times 10^6$ esporos/ml.

FIGURA 19

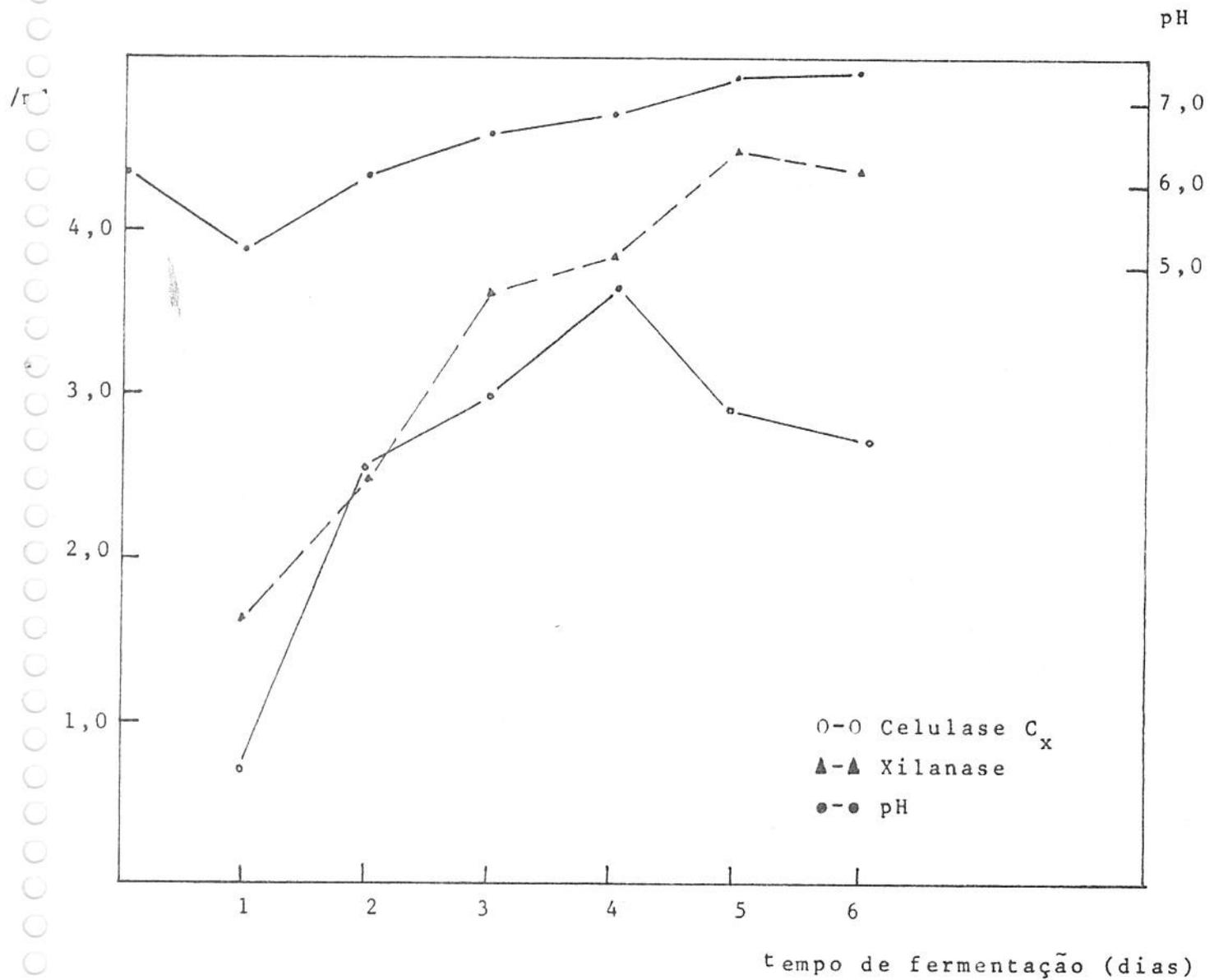


Atividades de celulase C_x e xilanase, no filtrado de cultura, obtidas por fermentação submersa para Aspergillus niger ATCC 1004

Meio: Reese e Mandels

Inóculo: 1 ml de uma suspensão de esporos de $25,5 \times 10^6$ esporos/ml.

FIGURA 20

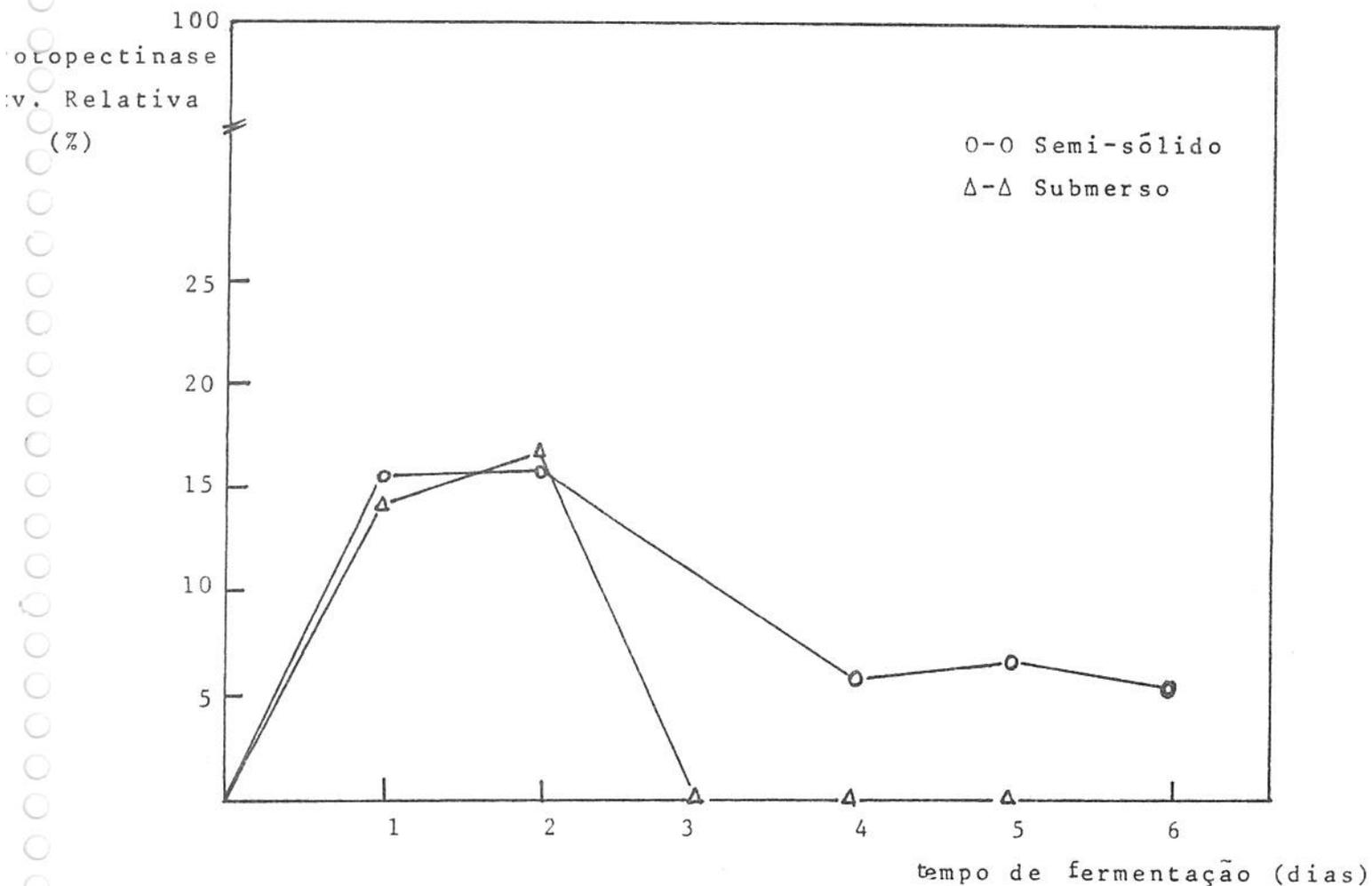


Atividades de celulase C_x e xilanase, no filtrado de cultura, obtidas por cultura em semi-sólido para Aspergillus niger ATCC 1004

Meio: Farelo de trigo com 40 - 45% de umidade

Inóculo: 1,5 ml de uma suspensão de esporos de $25,5 \times 10^6$ esporos/ml.

FIGURA 21

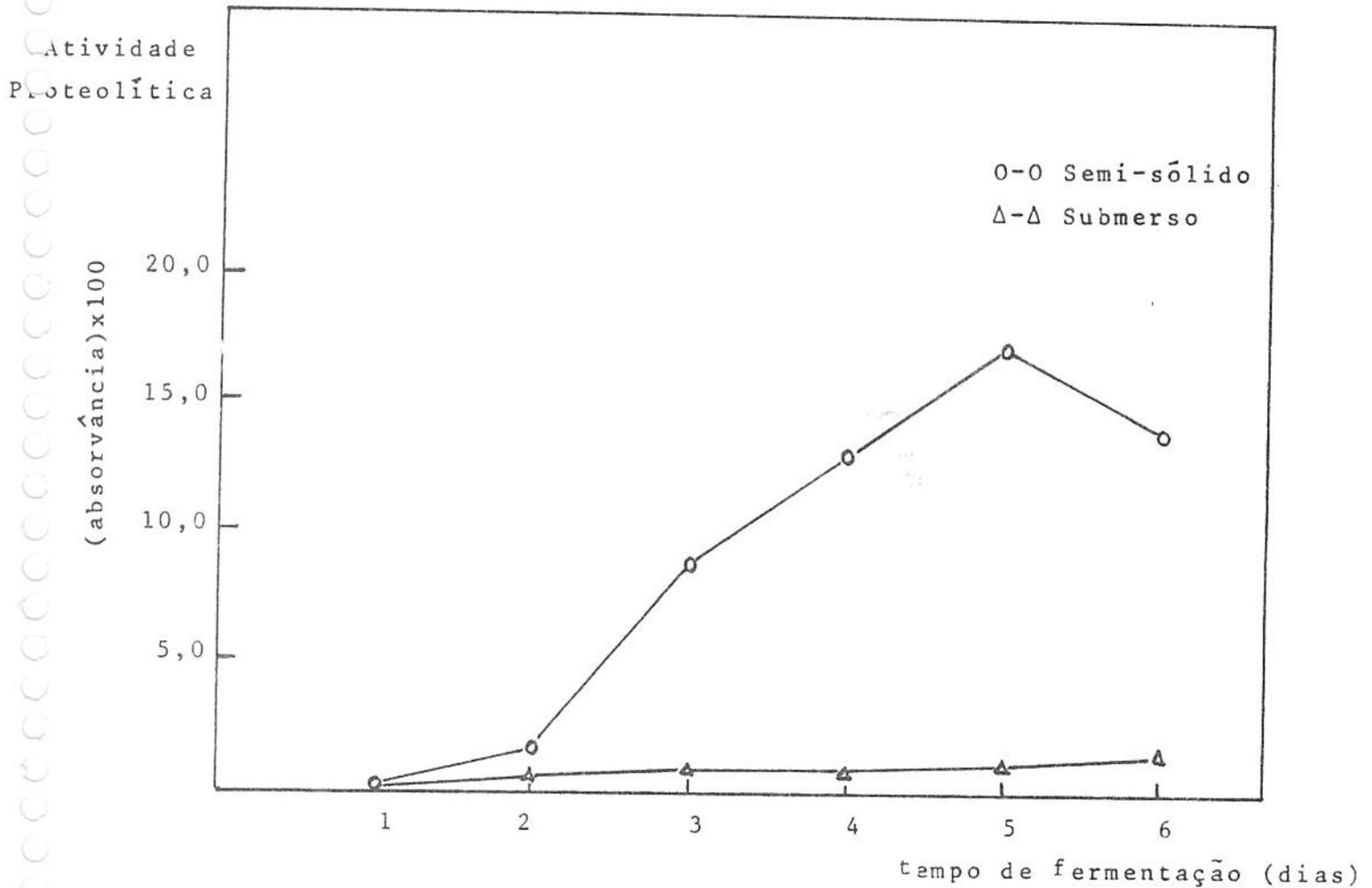


Atividades de protopectinase obtida por fermentação submersa e por cultura em semi-sólido para Aspergillus niger ATCC 1004.

Meios : (a) Submerso: Reese e Mandels
(b) Semi-sólido: Farelo de Trigo com 40 -45% de umidade

Inóculo : (a) Submerso: 1 ml de uma suspensão de esporo de $25,5 \times 10^6$ esporos/ml.
(b) Semi-sólido; 1,5 ml de uma suspensão de esporo de $25,5 \times 10^6$ esporos/ml.

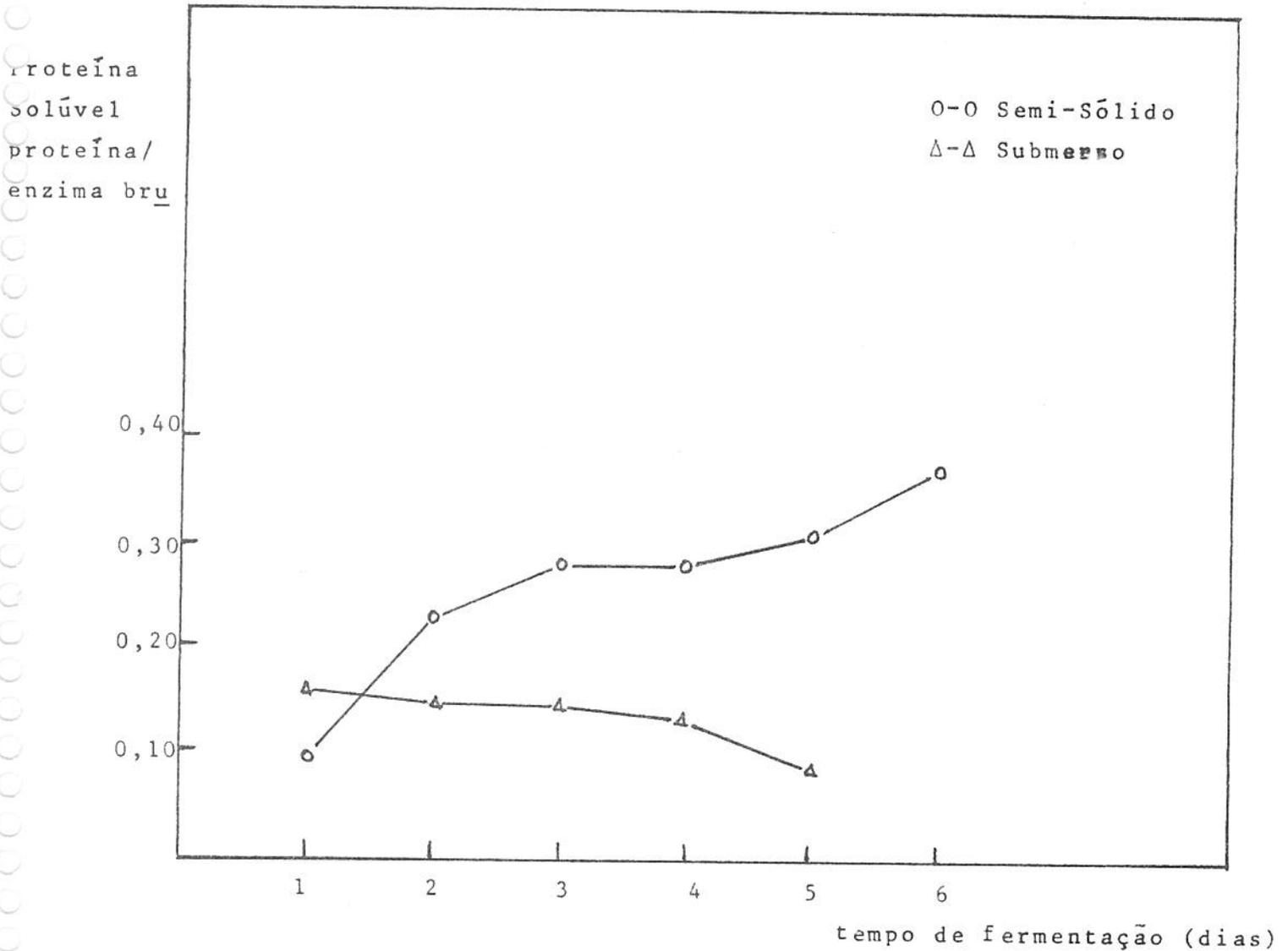
FIGURA 22



Atividades proteolíticas obtidas por fermentação submersa e por cultura em semi-sólido para Aspergillus niger ATCC 1004

- Meios: (a) Submerso: Reese e Mandels
(b) Semi-sólido; Farelo de trigo com 40 - 45% de umidade
- Inóculo: (a) Submerso: 1 ml de uma suspensão de esporos de $25,5 \times 10^6$ esporos ml.
(b) Semi-sólido: 1,5 ml de uma suspensão de esporos de $25,5 \times 10^6$ esporos ml.

FIGURA 23



Proteína Solúvel - Fermentação submersa e semi-sólida para Aspergillus niger ATCC 1004

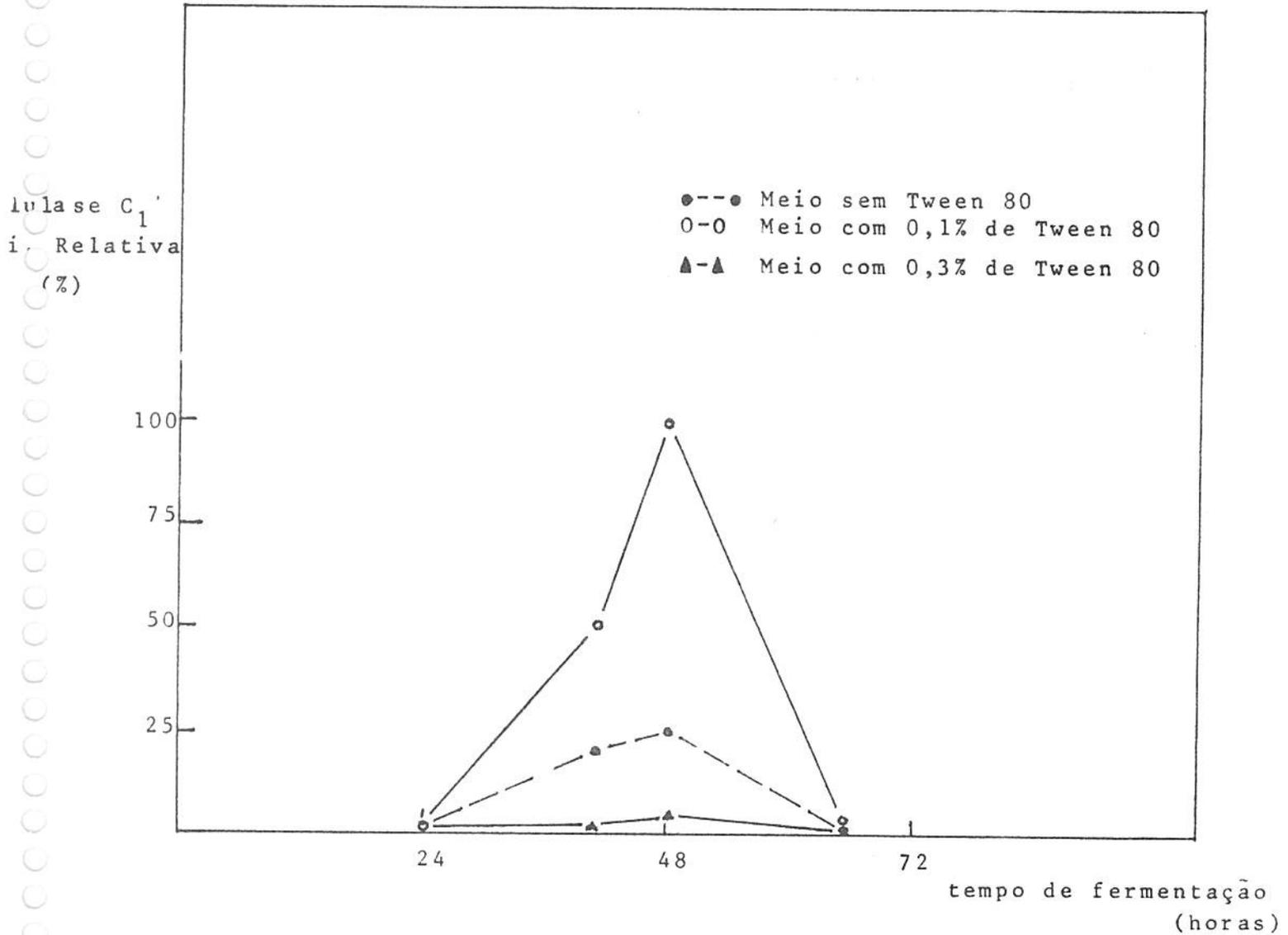
Meios : (a) Submerso: Reese e Mandels

(b) Semi-sólido: Farelo de trigo com 40 -45% de umidade

Inóculo: (a) Submerso: 1 ml de uma suspensão de esporos de $25,5 \times 10^6$ esporos/ml.

(b) Semi-sólido; 1,5 ml de uma suspensão de esporos de $25,5 \times 10^6$ esporos/ml.

FIGURA 24



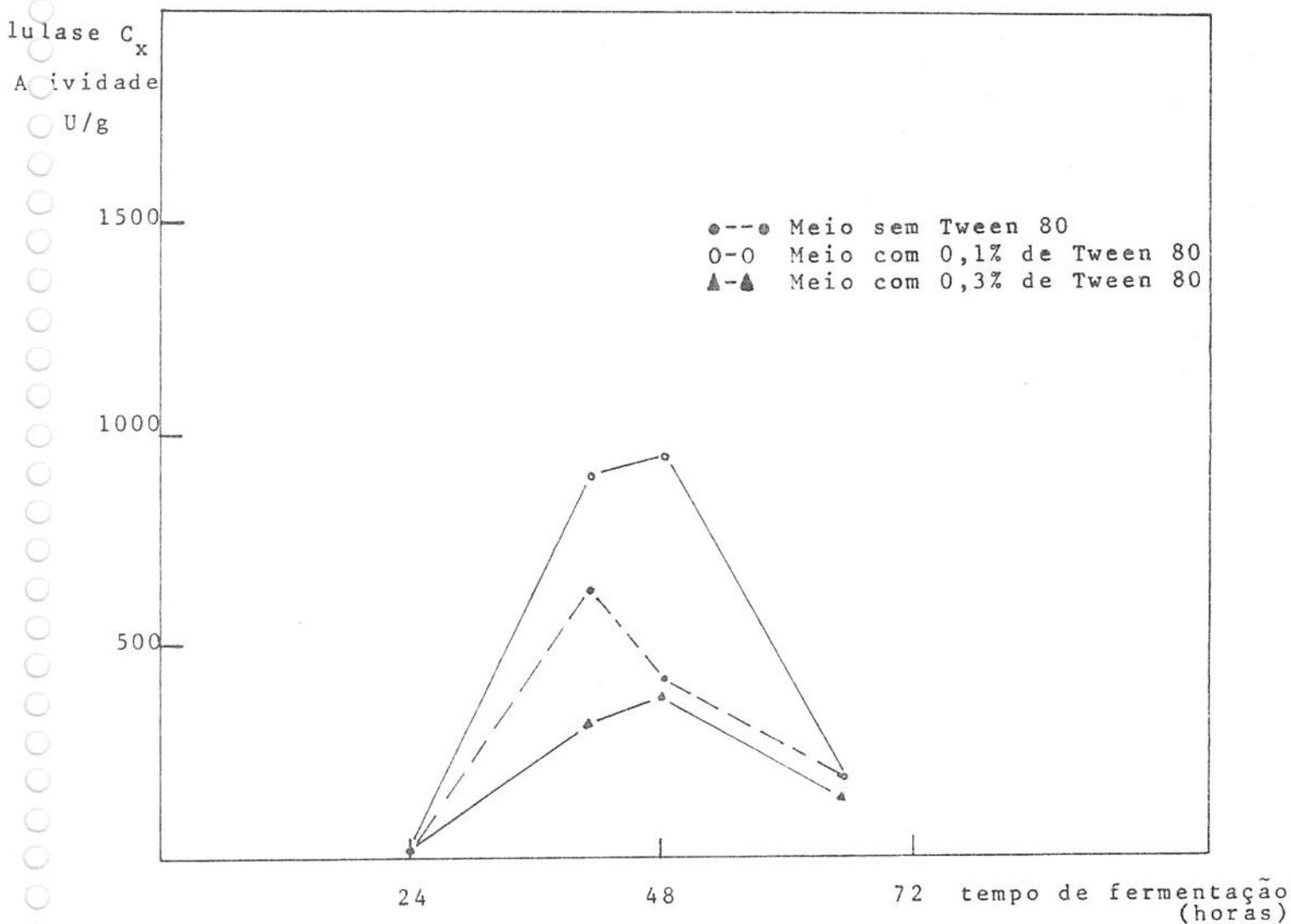
Efeito da adição de Tween 80 na produção de celulase C₁ por fermentação submersa.

Microorganismo : T. viride QM 9123

Meio : Reese e Mandels

Inóculo : 1 ml de uma suspensão de esporos de $4,3 \times 10^6$ esporos/ml.

FIGURA 25



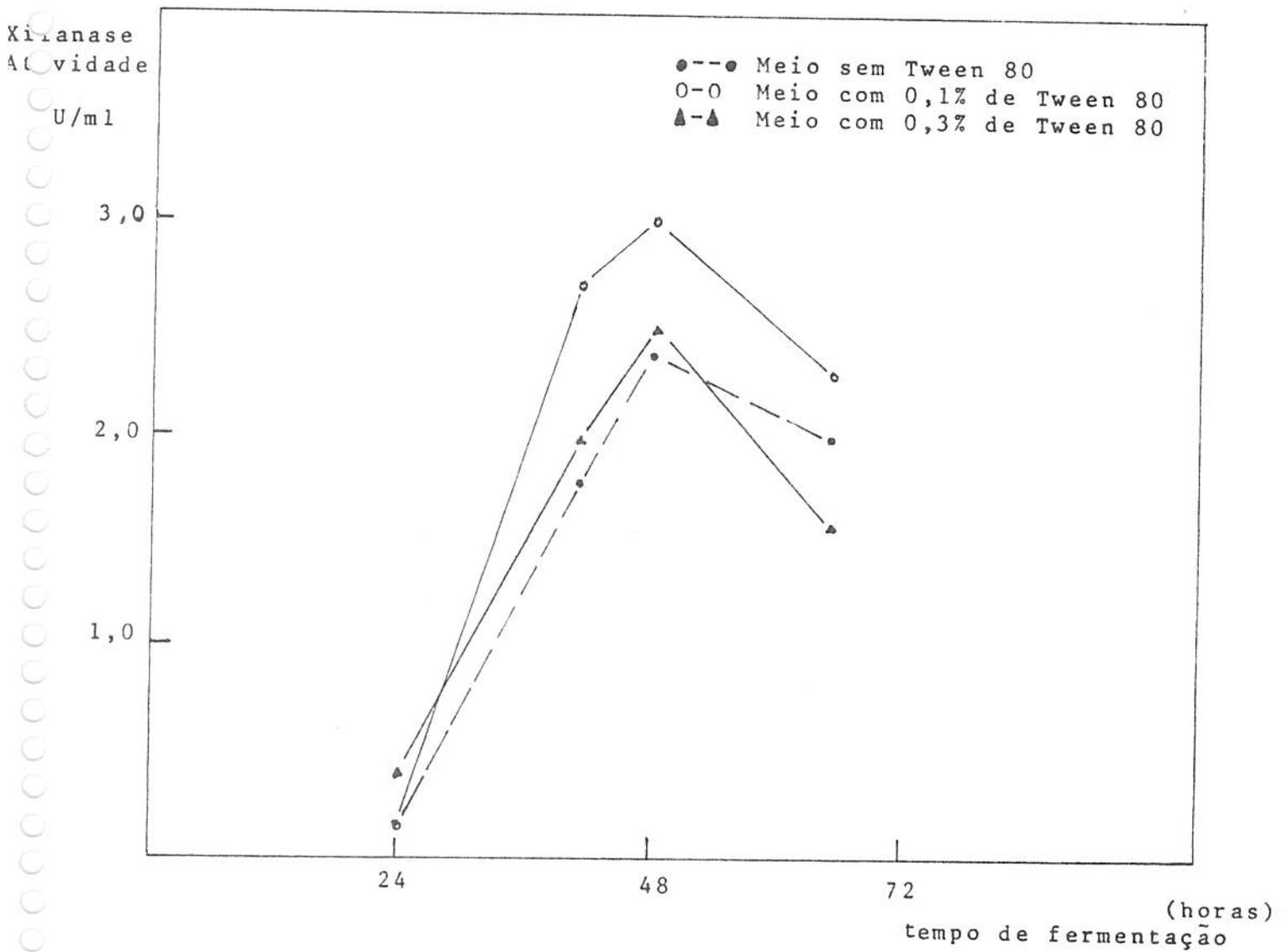
Efeito da adição de Tween 80 na produção de celulase C_x por fermentação submersa.

Microorganismo: T.viride QM 9123

Meio : Reese e Mandels.

Inóculo : 1 ml de uma suspensão de esporos de $4,3 \times 10^6$ esporos/ml.

FIGURA 26



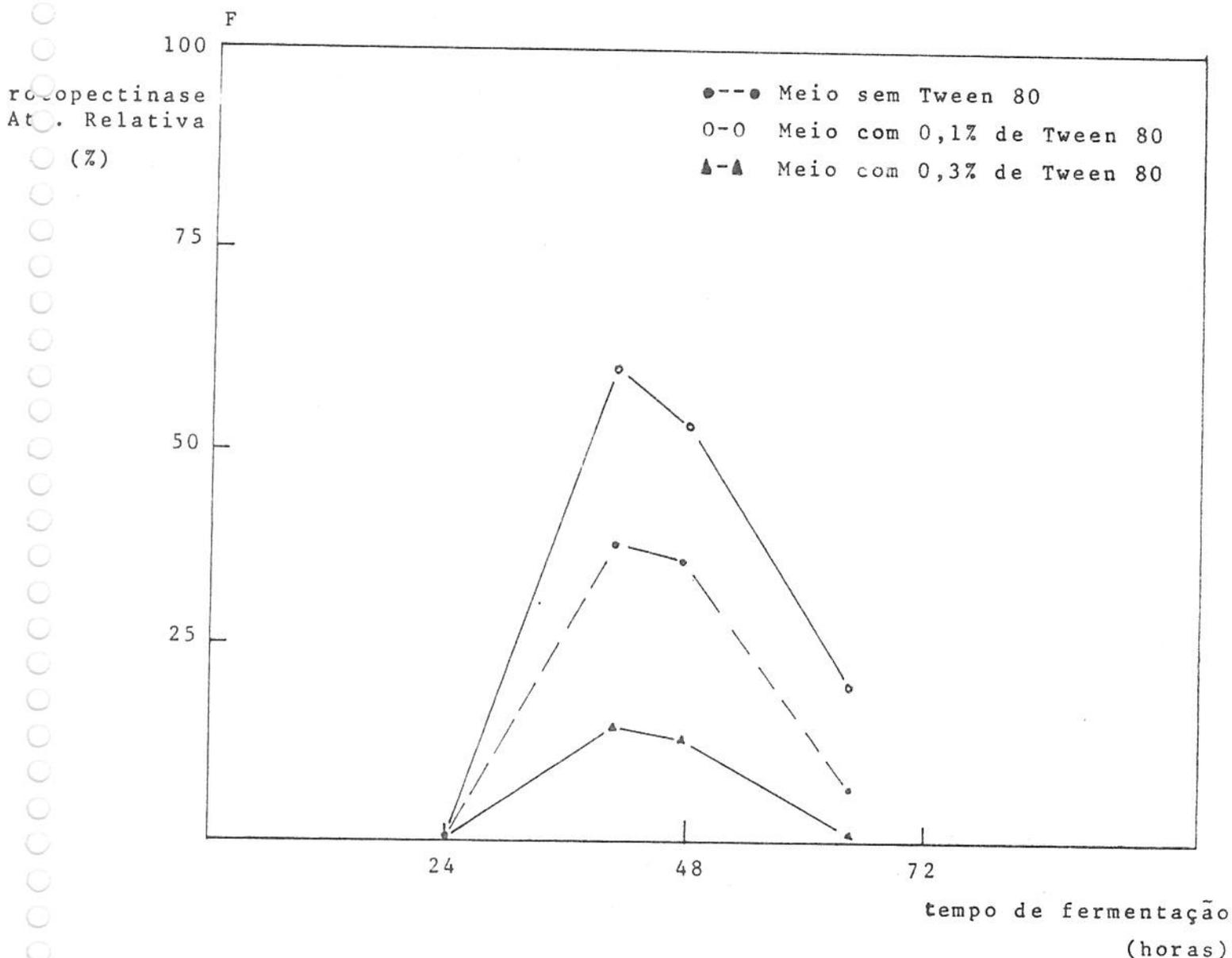
Efeito da adição de Tween 80 na produção de xilanase por fermentação submersa.

Microrganismo : T. viride QM 9123

Meio : Reese e Mandels

Inóculo : 1 ml de uma suspensão de esporos de $4,3 \times 10^6$ esporos/ml.

FIGURA 27



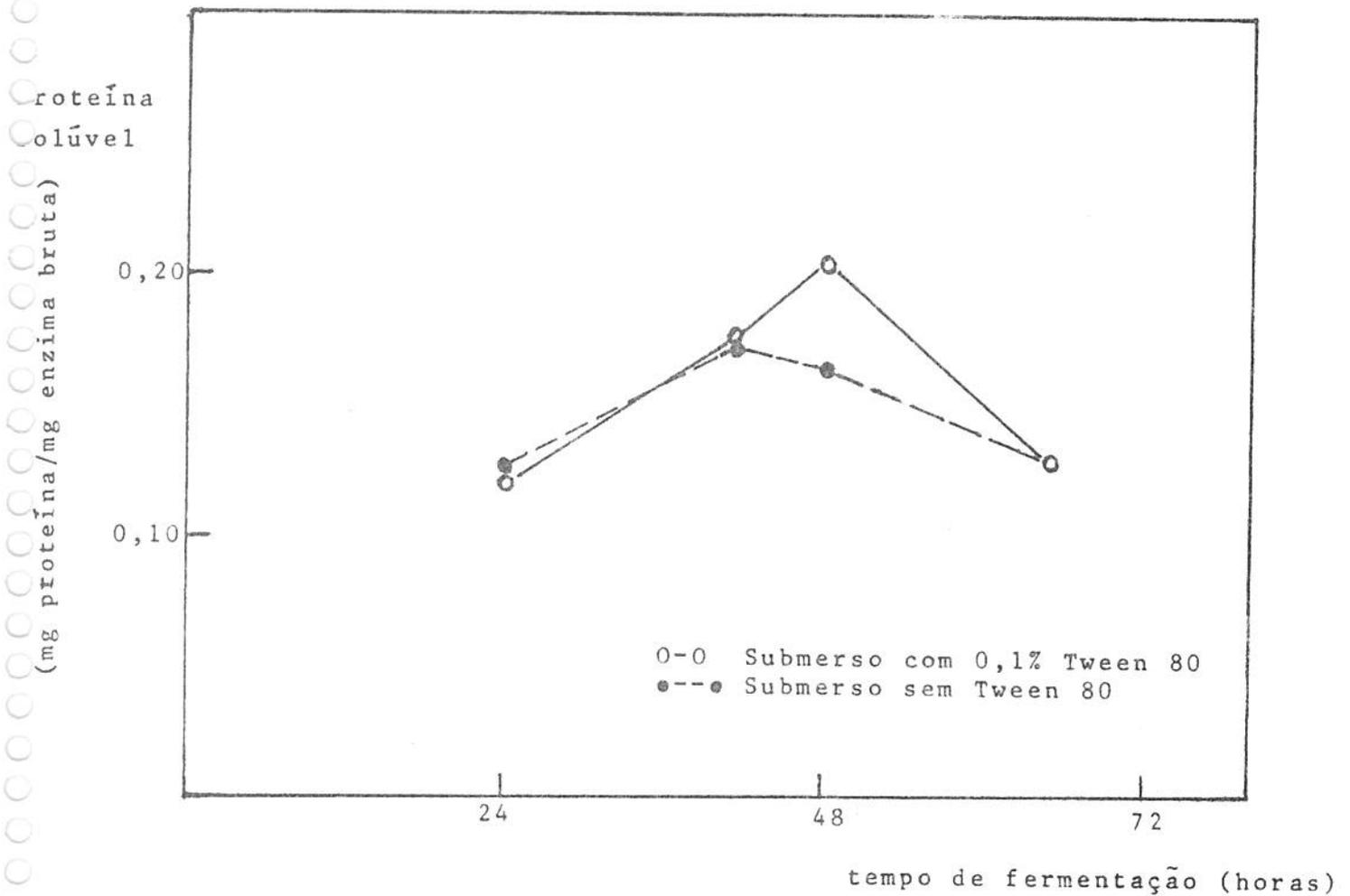
Efeito da adição de Tween 80 na produção de protopectinase por fermentação submersa.

Microorganismo: T. viride QM 9123

Meio : Reese e Mandels

Inóculo : 1 ml de uma suspensão de esporo de $4,3 \times 10^6$ esporos/ml.

FIGURA 28



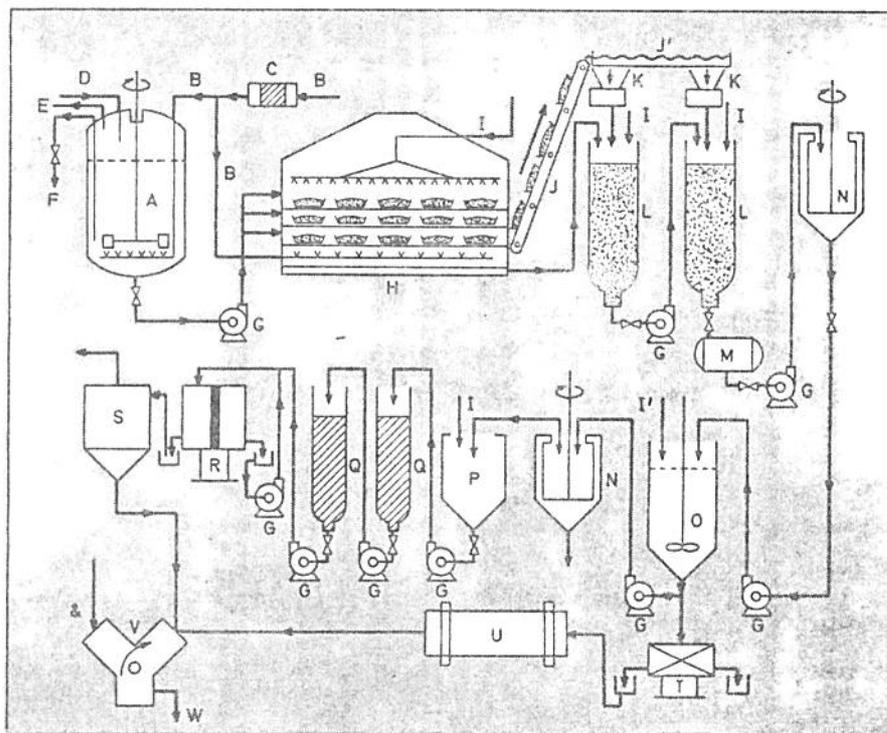
Proteína solúvel - Efeito da adição de Tween 80 na produção de enzimas por fermentação submersa

Microorganismo: T. viride QM 9123

Meio : Reese e Mandels

Inóculo : 1 ml de uma suspensão de esporo de $4,3 \times 10^6$ esporos/ml.

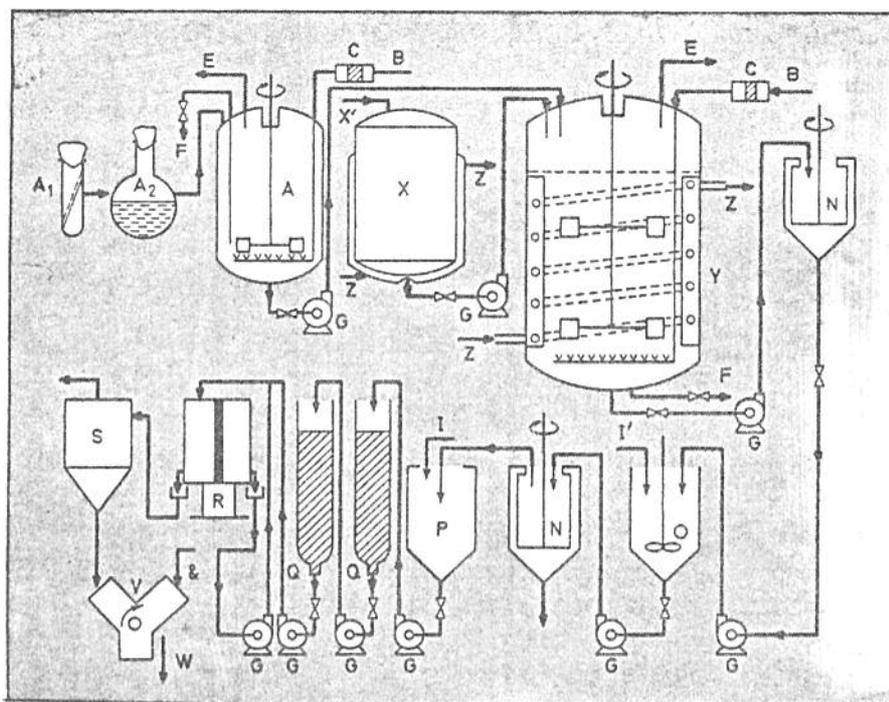
APÊNDICE A



Fluxograma do processo para produção de celulase fúngica por cultura em meio semi-sólido de farelo de trigo.

A - preparação do material da sementeira por cultura submersa; B - linha de ar (livre de óleo), C - filtro de ar; D - inóculo; E - ar de exaustão; F - coleta de amostras; G - bomba centrífuga; H - cultura em meio semi-sólido de farelo de trigo, controlada automaticamente; I - spray de água; I' - sulfato de amônio, acetona, álcool e água; J - correia transportadora; J' - transportador de parafuso; K - funil de descarga; L - coluna de extração; M - tanque de armazenamento; N - centrífuga; O - tanque de precipitação; P - tanque de mistura; Q - coluna de intercâmbio iônico; K - concentrador de membrana; S - spray dryer; T - filtro prensa; U - sacador de tambor; V - misturador; W - preparação celulase; & - sais estabilizadores.

Fonte: Process biochemistry, April 1973, p. 35-38.



Fluxograma do processo para produção de celulase fúngica por cultura em submerso.

A₁ - cultura inclinada em meio agar-batata-dextrose; A₂ - suspensão de esporos do fungo; A - preparação do material de semeadura; B - linha de ar (livre de óleo); C - filtro de ar; E - ar de exaustão; F - coleta de amostras; G - bomba centrífuga; X - tanque de armazenamento do substrato; X' - centrífuga; O - tanque de precipitação; I' - sulfato de amônio; acetona, álcool e água; I - água; P - tanque de mistura; O - coluna de intercâmbio iônico; R - concentrador de membrana; S - spray dryer; V - misturador; W - preparação celulase; & - sais estabilizadores.

Fonte: Process biocnemestry, April 1973, p. 35-38.

C A P Í T U L O V I I I

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AMANO PHARMACEUTICAL CO. LTD., Cellulase AP Amano; cellulolytic enzyme preparation. Technical Bulletin CEZ-1. Nagoya, Japan, 1970.
2. _____ . Cellulase T-AP Amano; cellulolytic enzyme preparation. Technical Bulletin CEZ-2. Nagoya, Japan, 1970.
3. BAILEY, P. J.; et al. - Cellulase (B-1,4 glucan 4-glucanohydrolyase) from the wood-degrading fungus *Polyporus schweinitzii* Fr. I. Purification. *Biochem. Biophys. Acta.* 185: 381-391, 1969.
4. BRATHWAITE, C. W. D. & DICKEY, R. S. - Synergism between *Pseudomonas caryophylli* and a species of *Corynebacterium*. *Phytopathology* 60: 1046, 1970.
5. BUCHT, B. & ERIKSON, K. - Extracellular enzyme system utilized by the rot fungus *Stereum sanguinolentum* for the breakdown of cellulose. I. Studies on the enzyme production. *Arch. Biochem. Biophys.* 124: 135, 1968.
6. CHANG, W. S. & USAMIL, S. - Production and utilization of *Trichoderma* cellulase by submerged culture. *J. Ferment. Technol.* 47 (7): 447-455, 1969.
7. CALLIHAN, C. D. - How engineers are putting microbes to work. *Chem. Eng.* 21: 160, 1970.
8. DEAN, M. & WOOD, R. K. S. - Cell wall degradation by a pectate transeliminase from the soft-rotting bacterium *Erwinia aroi-*

- deae, precipitation, dialysis. Nature 214: 408-410, 1967. (conf. Biol. Abs. 48 (8), 112552, 1967).
9. FENIKSOVA, R. V.; ULEZLO, I. V. & SHALAMBERIDZE, N. G. - The effect of nitrogen sources on the formation of cellulolytic enzymes by the fungus *Trichoderma*. Soobsh. Akad. Nauk. Gruz. SSR. 57: 689, 1970. (conf. Biol. Abs. 52 (1), 10697, 1971).
 10. FORBATH, T. P. - Flexible processing keys enzymes' future. Chem. Eng. 64: 226-229, 1957.
 11. FRIEDMAN, M. - Inhibition of staphylococcal enterotoxin B formation. J. Bacteriol. 95: 1051-1055, 1968.
 12. GHOSE, T. K. - Continuous enzymatic saccharification of cellulose with culture filtrates of *T. viride* QM6a. Biotechnol. Bioeng. 11: 249, 1969.
 13. _____ & KOSTICK, J. A. - A model for continuous enzymatic saccharification of cellulose with simultaneous removal of glucose syrup. Biotechnol. Bioeng. 12: 921, 1970.
 14. _____ & PATHAK, A. N. - Cellulases-2 applications. Proc. Biochem. May, 20-21, 1973.
 15. _____ & KOSTICK, J. A. - Enzymic saccharification of cellulose in semi and continuously agitated system. Adv. Chem. Series. 95: 415-446, 1969. (conf. Chem. Abs. 72 (19), 99097 h, 1970).
 16. GRASSMANN, W.; ZECHMEISTER, G.; TÓTH, L. & STADLER, R. - Über die chitin-Spaltung durch Emulsin-Präparate (III Über enzymatische Spaltung von Polysaccharidem). Ber. Deutsh. Chem. Ges. 67 (1): 1-5, 1934. (conf. Biol. Abs. 9(2), 13393, 1935).

17. GREGORY, D. W. & COCKING, E. C. - The use of polygalacturonase for the isolation of plant protoplast and vacuoles. *Biochem. J.* 88: 40, 1963.
18. GUPTA, J. K.; DAS, N. B. & GUPTA, Y. P. - Effect of cultural conditions on cellulase formation by *Trichoderma viride*. *Agr. Biol. Chem.* 36 (11): 1961-1967, 1972.
19. HALLIWELL, G. - Hydrolysis of fibrous cotton and reprecipitated cellulose by cellulolytic enzymes from soil microorganisms. *Biochem. J.* 95: 270, 1965.
20. HAN, Y. W. & SRINIVASAN, V. R. - Isolation and characterization of a cellulose-utilizing bacterium. *Appl. Microbiol.* 16 (8): 1140-1145, 1968.
21. _____; DUNLAP, C. E. & CALLIHAN, C. D. - Single cell protein from cellulosic wastes. *Food Technol.* 25: 130, 1971.
22. HESSELTINE, C. W. - Solid state fermentations. *Biotech. Bioeng.* 14: 517-532, 1972.
23. HORTON, J. C. & KEEN, N. T. - Regulation of induced cellulases synthesis in *Pyrenochaeta terrestris* gorenz et al. by utilizable carbon compounds. *Can. J. Microb.* 12: 210, 1966.
24. JOHANSSON, M. - A comparison between the cellulolytic activity of white and brown rot fungi. I. The activity on insoluble cellulose. *Physiol. Plant.* 19: 709, 1966.
25. KATZ, M. & REESE, E. T. - Production of glucose by enzymatic hydrolysis of cellulose. *Appl. Microbiol.* 16: 419, 1968.
26. KAWAI, M. & ABE, S. - Maceration of plant tissues by Basidiomycetes. I. Screening test of Basidiomycetes on the production of macerating enzymes. *J. Ferment. Technol.* 50 (10): 685-690, 1972.

27. KAWAMINAMI, T. & IIZUKA, H. - Studies on xylanase from microorganisms. IV. Action of xylanase of *Chaetomium trilaterale* strain No. 2264 upon xylan. *J. Ferment. Technol.* 48: 161, 1970.
28. KRZEMINSKI, L. F. & QUACKENBUSH, F. W. - Stimulation of carotene synthesis in submerged cultures of *Neurospora crassa* by surface-active agents and ammonium nitrate. *Arch. Biochem. Biophys.* 88: 64-67, 1960.
29. LI, L. H.; FLORA, R. M. & KING, K. W. - Individual roles of cellulase components derived from *Trichoderma viride*. *Arch. Biochem. Biophys.* 111: 439-447, 1965.
30. LIU, T. H. & KING, K. W. - Fragmentation during enzymic degradation of cellulose. *Arch. Biochem. Biophys.* 120: 462, 1967.
31. LOWRY, O. H.; et al. - Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275, 1951.
32. LUMSDEN, R. D. - Sclerotinia sclerotiorum infection of bean and the production of cellulase. *Phytopathology.* 59: 653, 1969.
33. MANDELS, M.; WEBER, J. & PARIZEK, R. - Enhanced cellulase production by a mutant of *Trichoderma viride*. *Appl. Microbiol.* June, 152-154, 1971.
34. _____ & REESE, E. T. - Induction of cellulase in fungi by cellobiose. *J. Bacteriol.* 79: 816-826, 1960.
35. _____ & _____. - Induction of cellulase in *Trichoderma viride* as influenced by carbon sources and metals. *J. Bacteriol.* 73: 269-278, 1957.
36. _____ & _____. - Inhibition of cellulases. *Ann. Rev. Phytopath.* 13: 85, 1965.

37. MARSH, C. A. - Fragmentation of cotton fibres during early stages of (*Trichoderma koningi*) enzymic cellulolysis. *Biochem. Biophys. Acta* 122: 367-370, 1966.
38. MILES LABORATORIES INC. - Protease assay; by casein digestion technique-colorimetric Northrop method. Elkhart, Indiana, 1966. p. 1-3. Technical information.
39. NELSON, N. - A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *J. Biol. Chem.* 153: 375, 1944.
40. NISIZAWA, K. - Cellulose-splitting enzymes. VII. Starch zone electrophoresis of cellulase and other carbohydrases from *Irpex lacteus*. *Arch. Biochem. Biophys.* 96 (1): 152-157, 1962.
41. _____ . - Mode of the action of cellulases. *J. Ferment. Technol.* 51 (4): 267-304, 1973.
42. _____ ; et al. - Substrate specificity of C₁ and C_x cellulase components from fungi. In: TERUI, G. ed. *Fermentation technology today*. Osaka, Japan; Society of Fermentation Technology, 1972. p. 719-725.
43. NORKRANS, B. - Degradation of cellulose; host-parasite relationships. *Ann. Rev. Phytopath.* 1: 325-350, 1963.
44. _____ . - Studies in growth and cellulolytic enzyme of *Trichoderma* with special reference to mycorrhiza formation. *Symbolae Botanicae Upsalienses*, 11 (1): 1-126, 1950. (conf. *Biol. Abs.* 27 (1), 10464, 1953).
45. OKADA, G.; NISIZAWA, K. & SUZUKI, H. - Cellulase components from *Trichoderma viride*. *J. Biochem. Tokyo* 63: 591-607, 1968. (conf. *Biol. Abs.* 50 (4), 43798, 1969).

46. PARK, Y. K.; et al. - Produção de amilase fúngica por fermentação submersa, por cultura em semi-sólido e seu uso em panificação. Revista Brasileira de Tecnologia. 2 (4): 181-185, 1971.
47. PATHAK, A. N. & GHOSE, T. K. - Cellulase-1; sources, technology. Proc. Biochem. April, 35-38, 1973.
48. PETTERSON, L. G. - The mechanisms of enzymatic cellulose degradation. In: TERUI, G. ed. Fermentation technology today. Osaka, Japan; Society of Fermentation Technology, 1972. p. 727-729.
49. RAUTELA, G. S. & KING, K. W. - Significance of the crystal structure of cellulose in the production and action of cellulase. Arch. Biochem. Biophys. 123: 589-601, 1968.
50. REESE, E. T. & LEVINSON, H. S. - A comparative study of the breakdown of cellulose by microorganisms. Physiol. Plant. 5 (3): 345-366, 1952.
51. _____ . - A microbiological process report; enzymatic hydrolysis of cellulose. Appl. Microbiol. 4: 39-45, 1956.
52. _____ & MANDELS, M. - β -D-1,3 glucanases in fungi. Can. J. Microbiol. 5: 173-185, 1959.
53. _____ & _____. - Enzymic hydrolysis of cellulose and its derivatives. In: WHISTLER, R. L. ed. Methods in carbohydrate chemistry. New York, Academic Press, 1963. v.3, cap.24, p. 139-143.
54. _____. - Extracellular purine β -ribosidases from fungi. Can. J. Microbiol. 14: 377-382, 1968.

55. _____; BIRZGALLIS, R. & MANDELS, M. - Sucrases in fungi. *Can. J. Biochem. Physiol.* 40 (2): 273-283, 1962. (conf. Biol. Abs. 38 (2), 23579, 1962).
56. _____ & MAGUIRE, A. - Surfactants as stimulants of enzyme production by microorganisms. *Appl. Microbiol.* 17 (2): 242-245, 1969.
57. _____; SIU, R. G. H. & LEVINSON, H. S. - The biological degradation of soluble cellulose derivatives and its relationship to the mechanism of cellulose hydrolysis. *J. Bacteriol.* 59: 485, 1950.
58. SAUNDERS, P. R.; SIU, R. G. H. & GENEST, K. N. - A cellulolytic enzyme preparation from *Myrothecium verrucaria*. *J. Biol. Chem.* 174: 697, 1948.
59. SELBY, K. & MAITLAND, C. C. - The cellulase of *Trichoderma viride*. Separation of the components involved in the solubilization of cotton. *Biochem. J.* 104: 716-724, 1967.
60. _____ & _____. - Components of *Trichoderma viride* cellulase. *Arch. Biochem. Biophys.* 118: 254-257, 1967.
61. SHOTWELL, O. L.; et al. - Production of aflatoxin on rice. *Appl. Microbiol.* 14: 425-428, 1966.
62. SIU, R. G. H. & REESE, E. T. - Decomposition of cellulose by microorganisms. *Bot. Rev.* 19: 377, 1953.
63. _____. - Mechanism of microbiological decomposition of cellulose. *Text. Res. J.* 20: 281, 1950. (conf. Biol. Abs. 24 (2), 35285, 1950).

64. _____ . - Microbial decomposition of cellulose with special reference to cotton textiles. Reinhold Publishing, New York, 1951. (conf. Biol. Abs. 26 (1), 9212, 1952).
65. SOMOGYI, M. J. - A new reagent for the determination of sugars. J. Biol. Chem. 160: 61, 1945.
66. _____ . - Notes on sugar determination. J. Biol. Chem. 195: 19, 1952.
67. SPALDING, D. H. - Production of pectinolytic and cellulolytic enzymes by *Rhizopus stolonifer*. Phytopathology. 53: 929, 1963.
68. SRINIVASAN, V. R. & HAN, Y. W. - Purification and characterization of β -glucosidase of *Alcaligenes faecalis*. Adv. Chem. Series. 95: 147, 1969. (conf. Biol. Abs. 51(5), 50447, 1970).
69. STORVICK, W. O.; COLE, F. E. & KING, K. W. - Mode of action of cellulase component form *Cellulibric gilvus*. Biochem. 2 (5): 1106-1109, 1963.
70. STUBBLEFIELD, R. D.; et al. - Production of aflatoxin on wheat and oats: Measurement with a recording densitometer. Appl. Microbiol. 15: 186, 1967.
71. TOYAMA, N. - A crystalline enzyme from the mold *Trichoderma koningi*. Bull. Fac. Agric. Univ. Miyasaki, 2 (1/2): 79-81, 1957. (conf. Biol. Abs. 33 (3), 43116, 1959).
72. _____ . - Applications of cellulases in Japan. Adv. Chem. Series. 95: 359-390, 1969.
73. _____ . & OGAWA, K. - Utilization of cellulosic wastes by *Trichoderma viride*. In: TERUI, G. ed. Fermentation technology today. Osaka, Japan; Society of Fermentation Technology, 1972. p. 743-757.

74. WHITAKER, O. R. - Hydrolysis of a series of β -1,4 oligoglucosides by *Myrothecium verrucaria* cellulase. Arch. Biochem. Biophys. 53: 439-449, 1954.
75. WOOD, T. M. - Cellulolytic enzyme system of *Trichoderma koningi* separation of components attacking native cotton. Biochem. J. 109: 217, 1968.
76. _____ . - The C₁ component of the cellulase complex. In: TERUI, G. ed. Fermentation technology today. Osaka, Japan; Society of Fermentation Technology, 1972. p. 711-718.
77. _____ . - The cellulase of *Fusarium solani*. Resolution of the enzyme complex. Biochem. J. 115: 457-464, 1969.
78. _____ . & McCRAE, S. I. - The purification and properties of the C₁ component of *Trichoderma koningi* cellulase. Biochem. J. 128: 1183-1192, 1972.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor Young Kun Park pela orientação eficiente durante a realização deste trabalho.

Ao Professor Doutor André Tosello, Diretor da Faculdade de Tecnologia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, pelas possibilidades oferecidas para o desenvolvimento desta tese.

À Organização dos Estados Americanos pela concessão de Bolsa de Estudos através do Programa Multinacional de Tecnologia de Alimentos.

Aos Ministérios de Comércio e Indústria e Desenvolvimento Agropecuário da República de Panamá, pela ajuda econômica dispensada.

Ao Doutor E.T. Reese, do U.S. Army Natick Laboratories.U.S.A., pelo fornecimento das linhagens de fungos.

À Química Industrial Masako Toma, pela colaboração nas experiências de laboratório.

Ao Senhor Humberto Pitoli e Senhora Lucia Helena Lazinho Pitoli, pelo trabalho de tradução do texto.

A todos que, direta ou indiretamente, colaboraram para a execução deste trabalho.

.. 000.000 ..