

ESTUDO DAS ENZIMAS PRODUZIDAS POR

Trichoderma longibrachiatum RESPONSÁVEIS

PELA DEGRADAÇÃO DE MATERIAIS CELULÓSICOS

09/92

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

ESTUDO DAS ENZIMAS PRODUZIDAS POR
Trichoderma longibrachiatum RESPONSÁVEIS
PELA DEGRADAÇÃO DE MATERIAIS CELULÓSICOS

Parecer

Este exemplar corresponde a
redação final da Tese defen-
dida por Valéria Reginatto
e aprovada pela Comissão
 julgadora em 17.03.92.

VALERIA REGINATTO 263

Lúcia R. Durrant

ORIENTADOR

DRA. LÚCIA REGINA DURRANT 264

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos
da Universidade Estadual de Campinas para a obtenção do
Título de Mestre em Ciência de Alimentos

BANCA EXAMINADORA

Lúcia R. Durrant

Dra. Lúcia R. Durrant
(orientadora)

Arlindo M. Sales

Dr. Arlindo Moreira Sales
(membro)

Nelson Duran

Dr. Nelson Duran
(membro)

Suplente

Dr. Ranulfo Monte Alegre
(membro)

Campinas, 17 de março 1992

Aos meus pais e irmãos,
pelo amor e incentivo,
os quais me fazem prosseguir.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora, Lúcia R. Durrant, pela dedicação, amizade e exemplo de vida.

A ABIA pelas cópias deste trabalho.

A CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

Aos amigos do Laboratório de Bioquímica do ITAL: Arlindo, Jacy, Lena, Sandra Paulon, Sandra Benedito, Nice, Lú e Rê pela amizade e apoio, e, em especial, à Chefe da Seção, Vera Lúcia Baldini, pelo auxílio e por possibilitar a realização dos trabalhos de purificação.

Ao Rodolfo, pelo carinho e compreensão nas horas mais difíceis.

A minha amiga Rê, pela convivência e carinho durante todos estes anos.

A Eli pela grande amizade conquistada durante a realização do trabalho.

A Carmen e Lourdes pela amizade e serviço de digitação.

ÍNDICE

Página

ÍNDICE DE FIGURAS

ÍNDICE DE TABELAS

RESUMO

SUMMARY

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1. Principais Fontes e Composição dos Resíduos	
Celulósicos.....	3
2.1.2. Estrutura da Celulose.....	4
2.2. Sistema Enzimático Celulolítico.....	8
2.2.1. Modo de Ação.....	9
2.2.2. Substratos para Medida de Atividades	
Celulolíticas.....	13
2.2.3. Regulação da Biossíntese.....	17
2.3. Produção de Celulases por Microrganismos.....	19
2.3.1. Produção de Celulases por Fungos.....	21
2.3.1.1. Fungos Aeróbios.....	21
2.3.1.2. Fungos Anaeróbios.....	28
2.3.2. Produção de Celulases por Bactérias.....	29
2.3.2.1. Bactérias Aeróbias.....	30
2.3.2.2. Bactérias Anaeróbias.....	33
2.4. Melhoramento de Microrganismos Celulolíticos.....	34
2.4.1. Genética Clássica.....	38
2.4.2. Genética Molecular.....	41
2.5. Aplicação das Celulases.....	42
2.5.1. Hidrólise da Celulose.....	42
2.5.2. Outras Aplicações.....	48

3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	50
3.1. Isolamento e Seleção de Microrganismos.....	50
3.1.1. Coleta de Amostras.....	50
3.1.2. Isolamento de Microrganismos.....	50
3.1.3. Seleção de Microrganismos.....	50
3.2. Manutenção dos Microrganismos.....	51
3.3. Microrganismos Utilizados.....	52
3.4. Mutação.....	52
3.4.1. Seleção das colônias mutadas.....	53
3.5. Produção de Enzimas Celulolíticas.....	54
3.5.1. Produção de Celulases em Meio Líquido.....	54
3.5.1.1. Influência da Fonte de Carbono.....	54
3.5.1.2. Influência do Inóculo.....	55
3.5.1.3. Influência do Tempo de Cultivo.....	55
3.5.2. Produção de Celulases em Meio Sólido.....	55
3.6. Obtenção das Enzimas.....	56
3.7. Determinações das Atividades Enzimáticas.....	56
3.7.1. Atividade de Carboximetilcelulase (CMCase)..	57
3.7.2. Atividade de Avicelase.....	57
3.7.3. Atividade de Hidrólise de Papel de Filtro...	58
3.7.4. Atividade de Xilanase.....	58
3.7.5. Atividade de β -glicosidase.....	58
3.8. Modo de Ação das Enzimas Celulolíticas.....	59
3.9. Determinações Analíticas.....	59
3.9.1. Determinação de Proteínas.....	59
3.9.2. Determinação do pH.....	60
3.9.3. Determinação de Açúcares.....	60
3.9.4. Cromatografia em papel para Detecção de Açúcares Redutores.....	61
3.10. Caracterização do Extrato Enzimático Bruto.....	62
3.10.1. Efeito do pH na Atividade e Estabilidade da Enzima.....	62
3.10.2. Efeito da Temperatura na Atividade e Estabilidade da Enzima.....	63

3.10.3. Efeito da Concentração do Substrato na Atividade Enzimática da β -glicosidase.....	63
3.11. Aplicação do Extrato Enzimático na Degradação de Material Celulósico.....	64
3.12. Purificação da Enzima.....	64
3.12.1. Fracionamento com Sulfato de Amônio.....	65
3.12.2. Cromatografia de Troca Iônica em coluna DEAE-Sephadex A-50.....	65
3.12.3. Determinação do Peso Molecular	66
 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	 67
4.1. Isolamento e Seleção dos Microrganismos.....	67
4.1.1. Identificação do Microrganismo.....	68
4.2. Mutação.....	68
4.3. Produção de Celulases em Meio Líquido.....	71
4.3.1. Influência da Fonte de Carbono.....	71
4.3.2. Influência do Inóculo.....	87
4.3.3. Influência do Tempo de Cultivo.....	88
4.4. Produção de Celulases em Meio Sólido.....	91
4.5. Aplicação do Extrato Enzimático Bruto na Degradação de Material Celulósico.....	94
4.6. Efeito da Temperatura na Atividade e Estabilidade da Enzima.....	99
4.7. Efeito do pH na Atividade e Estabilidade da Enzima.....	103
4.8. Efeito da Concentração do Substrato na atividade de β -glicosidase.....	106
4.9. Modo de Ação das Enzimas Celulolíticas.....	107
4.10. Purificação do Extrato Enzimático Bruto.....	111
4.10.1. Cromatografia em coluna de DEAE Sephadex A-50.....	111
4.10.2. Fracionamento em gel Sephadex G-100.....	114
4.11. Determinação do Peso Molecular.....	118

5. CONCLUSÕES.....	121
--------------------	-----

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	128
------------------------------------	-----

ÍNDICE DE TABELAS

	Página
TABELA 1: ENSAIOS PARA DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADES CELULOLÍTICAS.....	15
TABELA 2: MICRORGANISMOS PRODUTORES DE CELULASES.....	20
TABELA 3: APLICAÇÕES DAS CELULASES.....	49
TABELA 4: PRODUÇÃO DE ENZIMAS CELULOLÍTICAS POR MUTANTES DERIVADOS DO <i>T. longibrachiatum</i> (Blu 6.5).....	70
TABELA 5: ATIVIDADES ENZIMÁTICAS DOS MICRORGANISMOS Blu 6.5, m ₉₈ , <i>T. reesei</i> QM 6a E QM 9414, UTILIZANDO CELULOSE MICROCRISTALINA EM MEIO LÍQUIDO APÓS 6 DIAS DE CRESCIMENTO A 30°C E 150 RPM.....	72
TABELA 6: ATIVIDADES ENZIMÁTICAS DOS MICRORGANISMOS Blu 6.5, m ₉₈ , <i>T. reesei</i> QM 6a E QM 9414, UTILIZANDO CARBOXIMETILCELULOSE EM MEIO LÍQUIDO APÓS 6 DIAS DE CRESCIMENTO A 30°C E 150 RPM.....	73
TABELA 7: ATIVIDADES ENZIMÁTICAS DOS MICRORGANISMOS Blu 6.5, m ₉₈ , <i>T. reesei</i> QM 6a E QM 9414, UTILIZANDO SOLKA-FLOC BW 200 EM MEIO LÍQUIDO APÓS 6 DIAS DE CRESCIMENTO A 30°C E 150 RPM.....	74

TABELA 8:	ATIVIDADES ENZIMÁTICAS DOS MICRORGANISMOS Blu 6.5, m_{98} , <i>T. reesei</i> QM 6a E QM 9414, UTILIZANDO SOLKA-FLOC BW 40 EM MEIO LÍQUIDO APÓS 6 DIAS DE CRESCIMENTO A 30°C E 150 RPM.....	75
TABELA 9:	ATIVIDADES ENZIMÁTICAS DOS MICRORGANISMOS Blu 6.5, m_{98} , <i>T. reesei</i> QM 6a E QM 9414, UTILIZANDO LACTOSE EM MEIO LÍQUIDO APÓS 6 DIAS DE CRESCIMENTO A 30°C E 150 RPM.....	76
TABELA 10:	ATIVIDADES CELULOLÍTICAS DAS ENZIMAS PRODUZIDAS PELO MICRORGANISMO Blu 6.5 EM MEIO CONTENDO 0,5% DE LACTOSE E 0,5% DE SOLKA-FLOC BW 40.....	78
TABELA 11:	ATIVIDADES ENZIMÁTICAS DO MICRORGANISMO Blu 6.5 EM MEIO CONTENDO SORO DE LEITE EM PÓ COMO FONTE DE CARBONO APÓS 6 DIAS DE CRESCIMENTO A 30°C E 150 RPM.....	79
TABELA 12:	ATIVIDADES ENZIMÁTICAS DOS MICRORGANISMOS Blu 6.5, m_{98} , <i>T. reesei</i> QM 6a E QM 9414, QUANDO CULTIVADOS EM MEIO LÍQUIDO CONTENDO CASCA DE ARROZ COMO FONTE DE CARBONO, POR 6 DIAS A 30°C E 150 RPM.....	81
TABELA 13:	ATIVIDADES ENZIMÁTICAS DOS MICRORGANISMOS Blu 6.5, m_{98} , <i>T. reesei</i> QM 6a E QM 9414, QUANDO CULTIVADOS EM MEIO LÍQUIDO CONTENDO FARELO DE TRIGO COMO FONTE DE CARBONO, POR 6 DIAS A 30°C E 150 RPM.....	82
TABELA 14:	ATIVIDADES ENZIMÁTICAS DOS MICRORGANISMOS Blu 6.5, m_{98} , <i>T. reesei</i> QM 6a E QM 9414, QUANDO CULTIVADOS EM MEIO LÍQUIDO CONTENDO	

CASCA DE MANDIOCA COMO FONTE DE CARBONO, POR 6 DIAS A 30°C E 150 RPM.....	83
--	----

TABELA 15: ATIVIDADES ENZIMÁTICAS DOS MICROORGANISMOS Blu 6.5, m ₉₈ , <i>T. reesei</i> QM 6a E QM 9414, QUANDO CULTIVADOS EM MEIO LÍQUIDO CONTENDO BAGAÇO DE CANA COMO FONTE DE CARBONO, POR 6 DIAS A 30°C E 150 RPM.....	84
--	----

TABELA 16: ATIVIDADES ENZIMÁTICAS DOS MICROORGANISMOS Blu 6.5, m ₉₈ , <i>T. reesei</i> QM 6a E QM 9414, QUANDO CULTIVADOS EM MEIO LÍQUIDO CONTENDO FARINHA DE BABAÇU COMO FONTE DE CARBONO, POR 6 DIAS A 30°C E 150 RPM.....	85
---	----

TABELA 17: ATIVIDADES ENZIMÁTICAS DOS MICROORGANISMOS Blu 6.5, m ₉₈ , <i>T. reesei</i> QM 6a E QM 9414, QUANDO CULTIVADOS EM MEIO LÍQUIDO CONTENDO SERRAGEM COMO FONTE DE CARBONO, POR 6 DIAS A 30°C E 150 RPM.....	86
--	----

TABELA 18: INFLUÊNCIA DO INÓCULO NA PRODUÇÃO DE CELULASES EM MEIO LÍQUIDO CONTENDO CELULOSE MICROCRISTALINA COMO FONTE DE CARBONO POR 6 DIAS A 30°C E 150 RPM.....	87
---	----

TABELA 19: ATIVIDADES ENZIMÁTICAS ESPECÍFICAS DOS MICROORGANISMOS CULTIVADOS EM RESÍDUO CELULÓSICOS E ÁGUA OU SAIS, COM 5 DIAS DE CRESCIMENTO A 30°C.....	92
--	----

TABELA 20: CONCENTRAÇÃO DE AÇÚCARES REDUTORES (g/l) PRODUZIDOS PELA AÇÃO DO EXTRATO ENZIMÁTICO BRUTO EM BAGAÇO DE CANA E PAPEL JORNAL EM CONCENTRAÇÕES DE 5, 10 E 15%.....	95
--	----

TABELA 21: PURIFICAÇÃO DO EXTRATO ENZIMÁTICO BRUTO EM COLUNA DEAE SEPHADEX A-50.....	115
TABELA 22: FRACIONAMENTO EM GEL SEPHADEX G-100.....	116

ÍNDICE DE FIGURAS

Página

FIGURA	1: CADEIA DE CELULOSE MOSTRANDO A ROTAÇÃO DE 180° ENTRE OS RESÍDUOS DE CADEIAS VIZINHAS E AS PONTES DE HIDROGÊNIO INTER E INTRAMOLECULARES.....	5
FIGURA	2: ESTRUTURA INTERNA DAS MICROFIBRILAS QUE COMPÕE AS VÁRIAS CAMADAS DA PAREDE CELULAR.....	6
FIGURA	3: DIAGRAMA MOSTRANDO AS DIFERENTES CAMADAS DA PAREDE CELULAR SECUNDÁRIA DA MADEIRA.....	8
FIGURA	4: ESQUEMA DO MODELO PROPOSTO PARA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DA CELULOSE.....	11
FIGURA	5: MODO DE AÇÃO DAS CELOBIOHIDROLASES (CBHD I e II.....	13
FIGURA	6: HIDRÓLISE DA CELULOSE PELO SISTEMA ENZIMÁTICO CELULOLÍTICO DAS BACTÉRIAS.....	30
FIGURA	7: PROGRAMAS DE SELEÇÃO DE MUTANTES PARA CEPAS DE <i>T. reesei</i>	36
FIGURA	8: PROGRAMA DE SELEÇÃO DE MUTANTES REALIZADA PELO "NATICK U.S. ARMY LABORATORY".....	39

FIGURA 9:	MICROORGANISMOS Blu 6.5 (a), QM 8a (b) e QM 9414 (c) APÓS 7 DIAS DE CRESCIMENTO EM MEIO SELETIVO, CONTENDO FITA DE PAPEL DE FILTRO, COMPARADOS COM UM MEIO SEM INÓCULO (B).....	67
FIGURA 10:	RELAÇÃO ENTRE A DOSE DE RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA E SOBREVIVÊNCIA DAS COLÔNIAS DE <i>T. longibrachiatum</i> (Blu 6.5).....	69
FIGURA 11:	INFLUÊNCIA DO TEMPO DE CULTIVO <i>T. longibrachiatum</i> (Blu 6.5) NAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS	89
FIGURA 12:	CONCENTRAÇÃO DE AÇÚCARES REDUTORES (g/l) PRODUZIDOS PELA AÇÃO DO EXTRATO ENZIMÁTICO BRUTO EM CONCENTRAÇÃO DE 10% EM PAPEL JORNAL (a) e BAGAÇO DE CANA (b).....	96
FIGURA 13:	DETERMINAÇÃO DA TEMPERATURA ÓTIMA PARA ATIVIDADE DAS CELULASES DE <i>T. longibrachiatum</i> (Blu 6.5).....	100
FIGURA 14:	EFEITO DA TEMPERATURA SOBRE A ESTABILIDADE DAS CELULASES DE <i>T. longibrachiatum</i> (Blu 6.5).....	101
FIGURA 15:	EFEITO DO pH NA ATIVIDADE DAS CELULASES DE <i>T. longibrachiatum</i> (Blu 6.5).....	103
FIGURA 16:	EFEITO DO pH NA ESTABILIDADE DAS CELULASES DE <i>T. longibrachiatum</i> (Blu 6.5).....	105
FIGURA 17:	EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE O-NITRO- β -D-GLICOSÍDEO NA ATIVIDADE DE β -GLICOSIDASE.....	107

FIGURA 18: AÇÃO DO EXTRATO ENZIMÁTICO BRUTO SOBRE CARBOXIMETILCELULOSE.....	108
FIGURA 19: AÇÃO DO EXTRATO ENZIMÁTICO BRUTO BRUTO SOBRE CELULOSE MICROCRISTALINA.....	110
FIGURA 20: CROMATOGRAFIA DO EXTRATO ENZIMÁTICO BRUTO EM COLUNA DE TROCA IÔNICA DEAE SEPHADEX A-50.....	112
FIGURA 21: CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA DETERMINAÇÃO DO PESO MOLECULAR.....	119

RESUMO

Um total de 626 microrganismos foram isolados de amostras de solos e de material celulósico em decomposição, coletadas em várias regiões brasileiras. Destes, um fungo mesofílico, o qual foi identificado como *Trichoderma longibrachiatum*, foi selecionado e utilizado em estudos de produção e caracterização de enzimas que promovem a degradação de materiais celulósicos. Celuloses comerciais e resíduos agroindustriais compuseram as fontes de carbono. As maiores atividades de hidrólise de papel de filtro, celulose microcristalina e carboximetilcelulose, foram obtidas, após crescimento do microrganismo em Solka-Floc, enquanto que, β -glicosidase e xilanase apresentaram um máximo de atividade após crescimento em meio líquido contendo bagaço de cana.

A atividade do sistema celulolítico, determinada por hidrólise de papel de filtro, apresentou pH ótimo na faixa de 4,6 e 5,0 e conservou 87% de sua atividade depois de 24 horas de incubação na faixa de pH 4,4 e 5,0. A temperatura ótima de ação foi 55°C e após 1 hora e 24 horas de incubação a esta temperatura a enzima conservou em torno de 70% e 15% de sua atividade, respectivamente.

O sistema enzimático produzido pelo fungo, foi parcialmente purificado, após cromatografia em coluna DEAE Sephadex A-50 e filtração em gel Sephadex G-100. O peso molecular de alguns de seus componentes foi estimado aproximadamente, obtendo-se uma β -glicosidase de 44 kDa, duas xilanases de 14 e 16 kDa e uma exoglicanase de 60 kDa.

Um mutante foi obtido por exposição da cepa isolada à luz ultravioleta. O mesmo, apresentou características morfológicas diferentes da linhagem original e produção enzimática menor, indicando possíveis alterações no sistema secretório.

SUMMARY

A total of 626 microorganisms were isolated from samples of soil and biodegraded cellulosic material collected from various areas in Brazil. One mesophilic fungus, which was identified as *Trichoderma longibrachiatum* was selected. The production and characterization of the enzymes, which promote the degradation of cellulosic materials were studied.

Relatively pure celluloses and agrindustrial residues were used as carbon sources. The highest filter paper, microcrystalline cellulose and carboxymethylcellulose hydrolysis activities were obtained following growth of the microorganism in Solka-Floc, whereas β -glucosidase and xylanase exhibited the greatest activities after growth in sugar cane bagasse.

The activity of the cellulolytic system, determined as filter paper hydrolysis showed pH optimum at the 4.6-5.0 interval and maintained 87% of its original activity after 24 hours incubation at the pH range 4.4-5.0. The optimum temperature for activity was 55°C and after 1 hour and 24 hours incubation at this temperature the enzyme kept 70% and 15% respectively, of its activity.

The enzymatic system produced by the fungus was partially purified after DEAE-Sephadex A-50 column chromatography and Sephadex G-100 gel filtration. The molecular weight of some of the components was approximately estimated, getting a 44 kDa β -glucosidase, 14 and 16 kDa xylanases and a 60 kDa exoglucanase.

A mutant was obtained after exposition of the isolated strain to U.V. light. Its morphological characteristics were different from the original strain and its enzymatic production was lower, indicating a possible alteration in the secretory system.

1. INTRODUÇÃO

Com o objetivo de se utilizar a biomassa celulósica, um recurso renovável e disponível em grandes quantidades no mundo, tem sido realizados trabalhos, tanto em pesquisa relacionada com a microbiologia da degradação da celulose como em sua utilização industrial para produção de açúcares, etanol, butanol e outros combustíveis.

A celulose natural é um polímero insolúvel composto de subunidades de glicose, unidas por ligações β -1,4-glicosídicas. A estrutura deste composto envolve regiões mais organizadas, denominadas de cristalinas e, regiões com baixo grau de organização, também conhecidas como amorfas.

A hidrólise da celulose requer alguns tipos de enzimas. O modelo geral da hidrólise enzimática é derivado de estudos feitos com o fungo *Trichoderma reesei*, conforme descrito a seguir:

... exoglicanase ou β -1,4-D-glicano-celobiohidrolase (E.C. 3.2.1.91) as quais clivam unidades de celobiose a partir de finais não redutores da cadeia de celulose;

endoglicanase ou endo- β -1,4-glicano-glicanohidrolase (E.C. 3.2.1.4), as quais hidrolisam ligações glicosídicas internas;

β -D-glicosidase ou celobiase (E.C. 3.2.1.21), atuam em extremidades não redutoras de celooligosacarídeos liberando glicose.

Existe uma grande variedade de microrganismos celulolíticos (fungos ou bactérias) na natureza. Apenas alguns são conhecidos como celulolíticos verdadeiros, isto é, que possuem a capacidade de degradar a celulose natural.

A utilização biotecnológica da celulose requer um sistema de enzimas celulolíticas eficiente. A bioconversão de materiais celulósicos tem sido impedida pelo alto custo de produção destas enzimas. Por este motivo, o isolamento de novos microrganismos produtores de enzimas celulolíticas e estudos relacionados com a sua produção são importantes para a obtenção de celulasas mais eficientes e economicamente acessíveis, daí o objetivo desta tese.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. PRINCIPAIS FONTES E COMPOSIÇÃO DOS RESÍDUOS CELULÓSICOS

A celulose é o recurso natural renovável mais abundante, disponível ao homem. Cerca de 40% de toda biomassa (matéria orgânica), está estocada nas plantas superiores, o que significa uma produção anual média de resíduos celulósicos de 4×10^{10} toneladas (MONTGOMERY, 1983; KNAPP, 1985; COUGHLAN^a, 1985; ERIKSSON & WOOD, 1985; EVELEIGH, 1987; ROBSON & CHAMBLISS, 1989). Na natureza a celulose não é encontrada na sua forma pura, ou seja, está sempre associada com hemicelulose, lignina e polissacarídeos como pectina e amido (COWLING & KIRK, 1976).

As hemiceluloses incluem polímeros ou heteropolímeros de galactose, manose, xilose, arabinose e outros açúcares e seus ácidos urônicos, sendo que seu grau de polimerização raramente excede 200 (COUGHLAN^b, 1985; DEKKER, 1985; KHOWALA *et al.* 1988; JOHNSON *et al.* 1988).

A lignina é um polímero fenólico, tridimensional formado por unidades de álcool coniferílico, siringílico e cumarílico e se encontra intimamente ligada à celulose e hemicelulose, na constituição da parede celular das plantas superiores (COWLING & KIRK, 1976; KNAPP, 1985).

A maioria dos resíduos agroindustriais, como por exemplo, os resíduos agrícolas, os lixos urbanos, e os resíduos de

processamento de papel ou alimentos são compostos de celulose, hemicelulose e lignina (COWLING & KIRK, 1976).

Os resíduos agrícolas contém cerca de 20 a 60% de celulose, 20 a 30% de hemicelulose e 15 a 30% de lignina. O bagaço de cana, farelo de trigo e de arroz, por exemplo, contém cerca de 25 a 40% de celulose e o restante de hemicelulose (20-35%) e lignina (15 a 35%). Os jornais possuem aproximadamente a mesma composição que as madeiras das quais são derivados, isto é, 40 a 55% de celulose, 25 a 40% de hemicelulose e 18 a 30% de lignina. A maioria dos resíduos de indústria de alimentos como, polpa de frutas e peles de vegetais, contém pouca lignina mas são ricos em outros polissacarídeos não celulósicos (COWLING & KIRK, 1976).

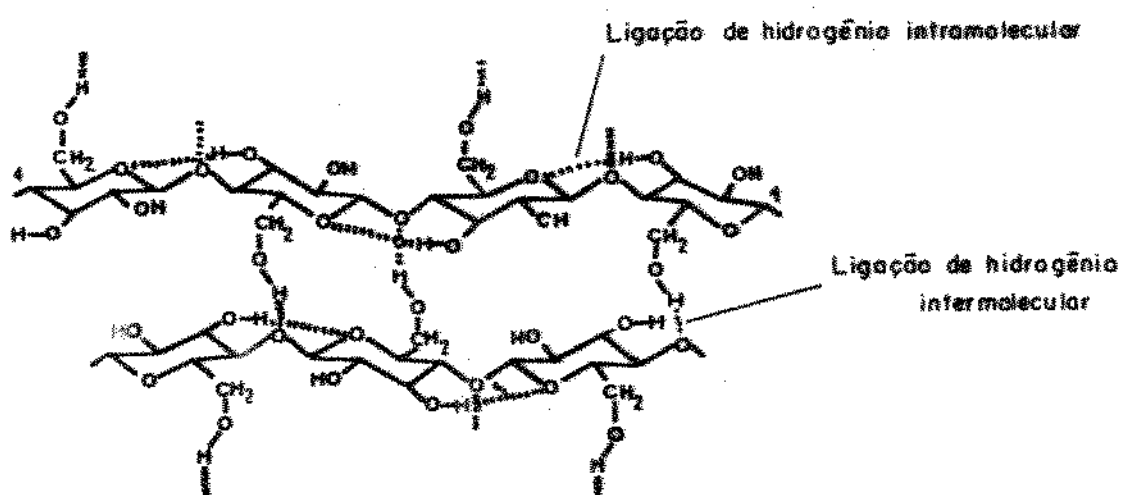
2.1.2. ESTRUTURA DA CELULOSE

Quimicamente, a celulose é um homopolímero linear composto de unidades de D-anidro-glicopiranosídeo unidas por ligações β -1,4-glicosídicas sendo que sua unidade básica é a celobiose (2 unidades de glicose). O número de moléculas de glicose por molécula de celulose (grau de polimerização) é de 10 a 14.000 unidades, tendo em média 3.000 unidades de glicose e podendo medir, aproximadamente, 7,0 μ m de comprimento (MONTGOMERY, 1983; EVELEIGH, 1987; COUGHLAN^a, 1985).

Normalmente, as moléculas de celulose não se encontram isoladas, mas unidas entre si para formar as fibrilas

elementares. Cada molécula de celobiose sofre rotação de 180 graus em relação a sua molécula vizinha (Figura 1). As cadeias de celulose estão orientadas paralelamente e são ligadas por pontes de hidrogênio inter e intramoleculares entre as glicoses sucessivas e adjacentes respectivamente (Figura 1).

FIGURA 1: CADEIA DE CELULOSE MOSTRANDO A ROTAÇÃO DE 180° ENTRE OS RESÍDUOS DE CADEIAS VIZINHAS E AS PONTES DE HIDROGÊNIO INTER E INTRAMOLECULARES

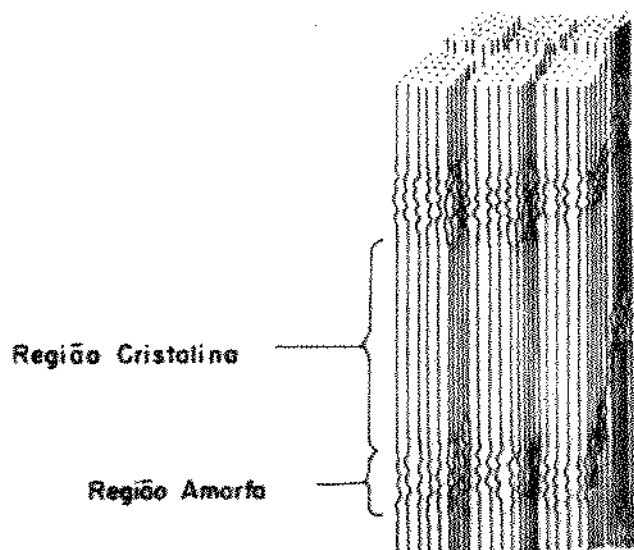


FONTE: COUGHLAN^a, 1985.

Estas fibrilas tornam a unir-se por pontes de hidrogênio e forças de Van der Waals intercadeias resultando na formação de um polímero insolúvel denominado de microfibrila (EVELEIGH, 1987; COWLING & KIRK, 1976). Quando as fibrilas elementares se unem para formar as microfibrilas, podem ter um arranjo altamente ordenado, chamado de região cristalina da celulose. Entretanto, em algumas partes, as fibrilas não se encontram muito bem ordenadas, denominando-se então de região amorfa (KNAPP, 1985; MONTGOMERY, 1983) como pode ser observado

na figura abaixo:

FIGURA 2: ESTRUTURA INTERNA DAS MICROFIBRILAS QUE COMPÕE AS VÁRIAS CAMADAS DA PAREDE CELULAR



FONTE: MONTGOMERY, 1983.

Envolvendo a estrutura cristalina e infiltrando-se na região amorfa, existem hemiceluloses e cadeias isoladas de celulose (MONTGOMERY, 1983).

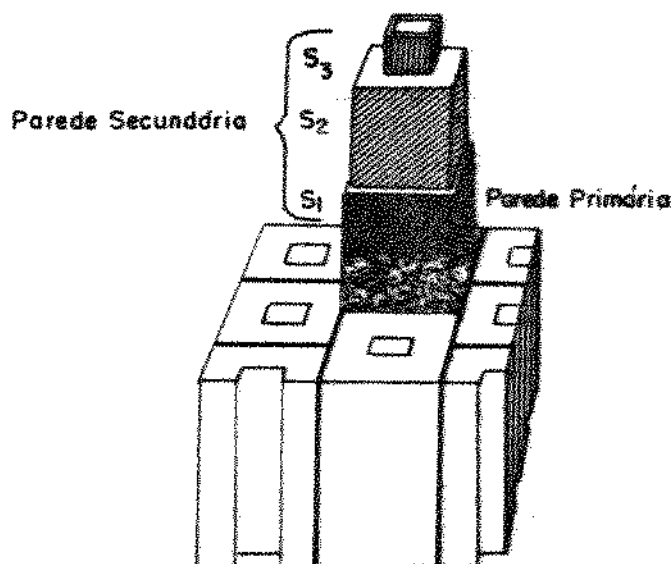
A cristalinidade juntamente com a presença de lignina são os maiores impedimentos na hidrólise enzimática da celulose (KNAPP, 1985; ERIKSSON & WOOD, 1985; COUGHLAN^a, 1985).

A madeira e as fibras naturais de algodão são as fontes mais comuns de celulose, contendo 45% e 90% do polímero respectivamente. Portanto, o conhecimento de suas estruturas é

importante na compreensão da celulose como um substrato para processos de bioconversão. A estrutura molecular da celulose no algodão e na madeira são muito semelhantes porém, as fibras de algodão não contém substância intercelular. Entretanto, as fibras de madeira, formam uma estrutura tridimensional coesiva, cuja integridade é assegurada por uma grande quantidade de substância intercelular, composta principalmente de lignina (MONTGOMERY, 1983; COWLING & KIRK, 1976).

Tanto a fibra de celulose do algodão, quanto a da madeira, possuem uma parede celular primária fina que envolve uma parede secundária relativamente espessa, sendo que estas são separadas entre si pela lamela média. Geralmente, a parede celular secundária é constituída de três camadas denominadas de S_1 , S_2 e S_3 (Figura 3). As camadas da parede celular diferem em estrutura e conteúdo. A lamela média e a parede celular primária, contém alto teor de lignina e pectina e relativamente pouca celulose (20 a 35%), enquanto a parede celular secundária tem alto teor de celulose (35 a 65%) e hemicelulose, e baixo de lignina. Em termos de estrutura, as paredes primárias e secundárias, diferem na orientação das fibrilas de celulose. Estas camadas da parede celular diferem também em termos da sua degradação por enzimas (COWLING & KIRK, 1976; KNAPP, 1985).

FIGURA 3: DIAGRAMA MOSTRANDO AS DIFERENTES CAMADAS DA PAREDE CELULAR SECUNDÁRIA DA MADEIRA



FONTE: COWLING & KIRK, 1978.

2.2. SISTEMA ENZIMÁTICO CELULOLÍTICO

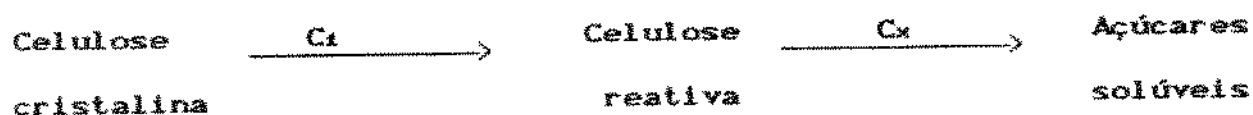
Celulase é um sistema ou um complexo enzimático no qual várias enzimas atuam em conjunto para hidrolisar a celulose (GRITZALI & BROWN, 1979; MANDELS, 1982; MULLINGS, 1985; EVELEIGH, 1987).

O complexo de enzimas varia de acordo com o microrganismo que o produziu, seu estado nutricional e fase de crescimento (MULLINGS, 1985). Sendo assim, o modelo básico de ação das celulasas está fundamentado principalmente no sistema dos fungos, e em particular de *Trichoderma* (GRITZALI & BROWN, 1979;

MANDELS, 1982; ROBSON & CHAMBLISS, 1989). Este sistema possui três enzimas principais: endo- β -1,4-glicanase, exo-celobiohidrolase e β -glicosidase (MANDELS, 1982; WARD, 1986; MULLINGS, 1985), que serão tratadas com mais detalhes no item 2.2.1.

2.2.1. MODO DE AÇÃO

Segundo COUGHLAN^o(1985), o modo de ação das enzimas celulolíticas fúngicas esteve por muito tempo baseado na teoria clássica de REESE, SIU e LEVINSON (1950). Eles propuseram que o substrato cristalino tornava-se susceptível à hidrólise, pela ação de um componente C_1 , o qual possuiria ação não hidrolítica e que romperia a cadeia cristalina ou as pontes de hidrogênio que sustentam a estrutura da celulose. Assim, a celulose modificada ou reativa era hidrolisada pelos componentes C_x , um grupo de enzimas que hidrolisavam ligações glicosídicas produzindo açúcares redutores (MANDELS *et al.*, 1976; REESE & MANDELS, 1984). Esta hipótese está demonstrada no esquema a seguir:



Pequenas modificações foram feitas nesta teoria, a qual se manteve até o início da década de 70, quando então, WOOD & McCRAE (1972) propuseram uma nova teoria, posteriormente incrementada por outros pesquisadores (Figura 4). Esta teoria é a

mais aceita atualmente e compreende os grupos de enzimas descritos abaixo:

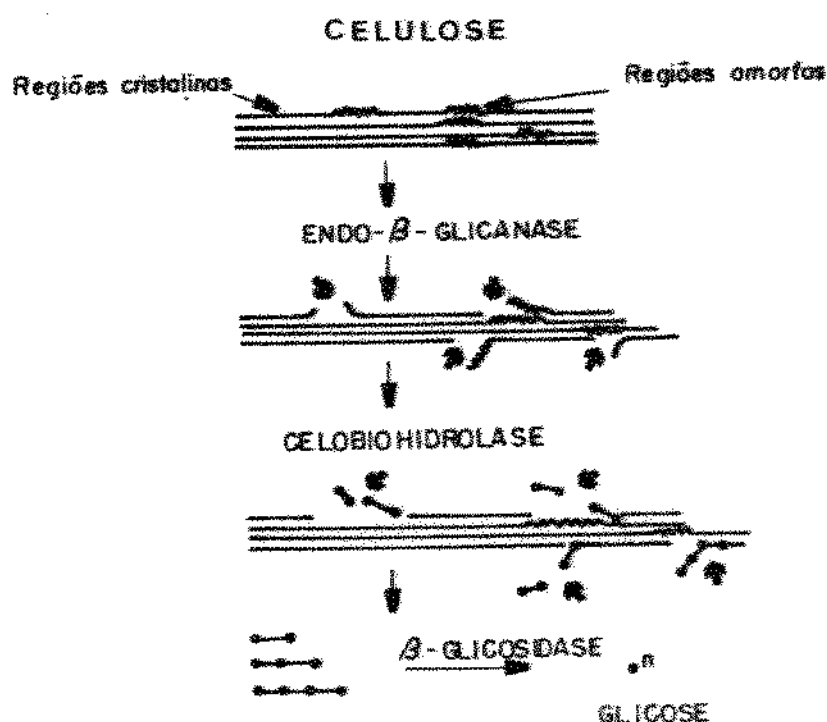
a) endo- β -1,4-D-glicanase (1,4- β -D-glicano-4-glicanohidrolase E.C. 3.2.1.4.). Este grupo de enzimas promove a hidrólise interna da cadeia de celulose na região amorfa, aumentando o número de finais não redutores. Alguns autores a consideram como a antiga C_x descrita por Reese e colaboradores em 1950. Existem vários tipos de endoglicanases que variam no seu modo de hidrólise da celulose (GRITZALI & BROWN, 1979; MANDELS, 1982; MULLINGS, 1985).

b) exo- β -1,4-D-glicanase, existem dois tipos, ambas atuando em finais não redutores. A exo-glicohidrolase (1,4- β -D-glicano glicohidrolase, E.C. 3.2.1.74.) remove unidades de glicose e a exo-celobiohidrolase (1,4- β -D-glicano celobiohidrolase E.C. 3.2.1.91), remove celobiose. As exoenzimas atuam causando a inversão na configuração do carbono 1 do resíduo liberado (MANDELS, 1982; KNAPP, 1985; EVELEIGH, 1987). Estas enzimas hoje são consideradas as antigas C_1 (REESE & MANDELS, 1984) descrita por Reese e colaboradores em 1950.

c) celobiase ou β -D-glicosidase (β -D-glicosídeo-glicosil-hidrolase, E.C. 3.2.1.21.) convertem a celobiose e outras celodextrinas de baixo peso molecular, de até sete glicoses, à glicose. A celobiase não é considerada uma celulase especificamente; ela apenas ajuda a ação das celulases pela remoção dos resíduos de celobiose que são inibitórios (KNAPP,

1985; ERIKSSON & WOOD, 1985). A configuração beta da glicose liberada permanece, e isto a distingue das exoglicanases (COUGHLAN^a, 1985). A β -glicosidase também catalisa reações de transglicosilação, isto é, transfere unidades de glicose a outros oligosacarídeos. GRITZALI & BROWN (1979) observaram que a β -glicosidase é inibida pela presença de glicose em altas concentrações, e de celobiose e celotriose devido a transferência de unidades glicosil formando tri ou tetrasacarídeo, respectivamente.

FIGURA 4: ESQUEMA DO MODELO PROPOSTO PARA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DA CELULOSE



FONTE: CUSKEY *et al.*, 1981

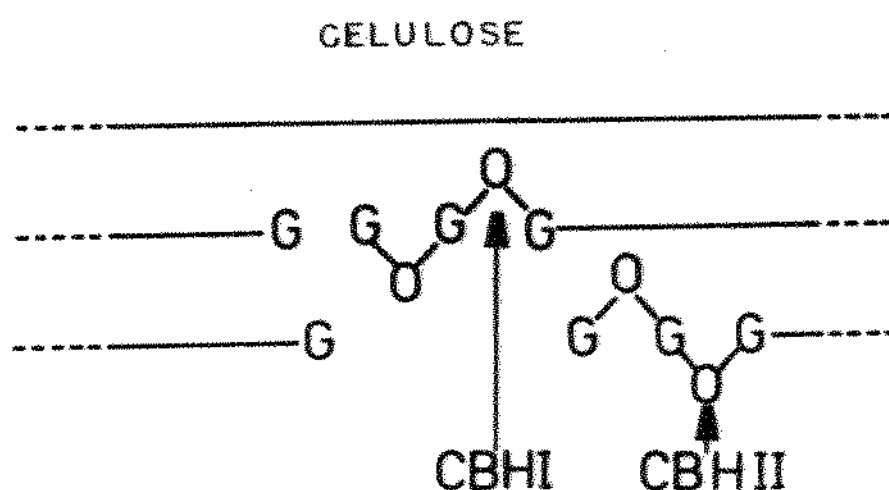
Este modelo de ação das celulases, sugere um sinergismo entre a endo e exoglicanases. Sendo que, a endoglicanase atua sobre a região amorfa da cadeia de celulose criando finais não redutores para a ação das exoglicanases.

Dentro deste trabalho básico de elucidação do sistema celulolítico enzimático, alguns esquemas de atividade enzimática foram propostos, envolvendo a ação sinérgica entre as enzimas. O primeiro trabalho neste sentido, citado por ERIKSSON & WOOD (1985), foi realizado em 1954, utilizando celulose tratada com ácido fosfórico. Soluções enzimáticas de *Trichoderma viride* e *Myrothecium verrucaria* foram fracionadas por cromatografia e foi verificado que a hidrólise da celulose tratada era maior para as frações reunidas do que para cada fração individual. Uma década mais tarde, Mandels e Reese demonstraram que os componentes C_1 (exoglicanase) e C_x (endoglicanase) de *Trichoderma reesei* atuaram sinérgicamente para efetuar a hidrólise de substratos mais cristalinos como algodão, e Avicel (COUGHLAN^a, 1985). Com base nesta e outras evidências WOOD & McCRAE (1972) sugeriram que dois sinergismos podem ocorrer entre as três enzimas.

O sinergismo do tipo "endo-exo" acontece num primeiro estágio, quando uma enzima A (endoglicanase) produz novos finais não redutores para a ação da enzima B (celobiohidrolase); enquanto que, o outro sinergismo ocorre num segundo estágio, onde uma enzima C (β -glicosidase) remove o produto inibitório (celobiose) da ação da enzima B.

HENRISSAT *et al.*, (1985) e HERIBAN & CLAEYSSSENS (1990), evidenciaram um novo tipo de sinergismo, o qual envolve duas exoglicanases. As enzimas foram chamadas de celobiohidrolase I e celobiohidrolase II e exibem diferente estereoespecificidade pelos finais não redutores da celulose (Figura 5).

FIGURA 5: MODO DE AÇÃO DAS CELOBIOHIDROLASES (CBHI E II



FONTE: ERIKSSON & WOOD, 1985..

2.2.2. SUBSTRATOS PARA MEDIDA DE ATIVIDADES CELULOLÍTICAS

Devido à falta de substratos específicos e de padronização para as determinações das atividades celulolíticas, é muito difícil a comparação entre as atividades realizadas em diferentes laboratórios (ENARI e PAAVOLA, 1987).

Entretanto, foram desenvolvidos alguns ensaios relativamente específicos para os diferentes componentes do complexo celulolítico que estão listados na Tabela 1. Estes métodos, baseiam-se principalmente na determinação de açúcares redutores liberados a partir da hidrólise enzimática do substrato celulósico. Dependendo da cristalinidade do substrato, o ensaio serve para medir endo ou exoglicanase (ROBSON & CHAMBLISS; 1989). Substratos como: celulosas tratadas quimicamente (com ácido fosfórico) ou fisicamente (triturada em moinho de bolas), celulose com baixo grau de substituição (carboximetilcelulose ou hidroximetilcelulose), são utilizados para medir atividade de endo- β -1,4-glicanase pela grande presença de regiões amorfas (MONTENECOURT *et al.*, 1985; ENARI & PAAVOLA, 1987; ROBSON & CHAMBLISS; 1989).

A atividade de endo- β -1,4-glicanase também pode ser determinada pelo decréscimo na viscosidade, ou aumento da fluidez da solução do substrato. Este método pode ser utilizado para diferenciar uma exo de uma endoglicanase, pois a exo causa apenas uma diminuição insignificante na viscosidade, devido a produção de açúcares redutores a partir da extremidade da cadeia (COUGHLAN^a, 1985; ROBSON & CHAMBLISS, 1989).

TABELA 1: ENSAIOS PARA A DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADES CELULOLÍTICAS

Enzima	Substrato utilizado	Produto ou propriedade medida
Complexo celololítico completo	algodão	açúcares redutores
	Avicel	açúcares redutores
	papel de filtro	açúcares redutores
	Solka-Floc	açúcares redutores
	celulose tingida	liberação de cor
	ágar celulose	clarificação do ágar
Endoglicanase	carboximetilcelulose (CMC)	açúcares redutores e perda de viscosidade
	hidroxiethylcelulose	perda de viscosidade
	celooligosacarídeos	açúcares redutores
	CMC-ágar	clarificação do ágar
Exocelobiohidrolase	celulose amorfa	açúcares redutores
	celooligosacarídeos	celobiose
	p-nitrofenil- β -D-celobiosídeo	p-nitrofenol
Exoglicohidrolase	celulose amorfa	açúcares redutores
	celooligosacarídeos	glicose
β -glicosidase	celooligosacarídeos	açúcares redutores
	celobiose	glicose
	p-nitrofenil- β -D-glicosídeo	p-nitrofenol

FONTE: MANDELS *et al.*, 1976; COUGHLAN ^a, 1985.

A determinação da atividade de $\text{exo-}\beta\text{-1,4-glicanase}$ em misturas de enzimas é muito difícil de ser realizada. A dificuldade consiste em não existir nenhum substrato específico para a determinação da ação desta enzima. Van TILBEURGH *et al.*, (1982) utilizaram metil-lumbeliferil-celobiosídeo (MUC) e $p\text{-nitrofenil-}\beta\text{-D-celobiosídeo}$ (pNPC) porém, estes substratos também podem sofrer alguma ação das endoglicanases. As exoglicanases degradam a celulose tratada mas não degradam a carboximetilcelulose enquanto que as endoglicanases são ativas sobre os dois substratos. Entretanto as duas atividades são necessárias para a degradação de celulose microcristalina como por exemplo, Avicel.

Algodão, Avicel e papel de filtro (Whatman N°1) são citados na literatura tanto como substrato para as exoglicanases, como para medir a atividade do complexo celulolítico total (MANDELS *et al.*, 1976; MONTENECOURT *et al.*, 1985; ROBSON & CHAMBLISS, 1989).

A única enzima do complexo que possui ensaio enzimático definido é a $\beta\text{-glicosidase}$. Sua atividade pode ser medida pela liberação de $p\text{-nitrofenol}$ a partir do substrato $p\text{-nitrofenil-}\beta\text{-D-glicosídeo}$ ou pela liberação de glicose a partir de celobiose ou celooligosacarídeos com até sete unidades de glicose (ENARI & PAAVOLA, 1987; JAFELICE *et al.*, 1990).

2.2.3. REGULAÇÃO DA BIOSSÍNTESE

A biossíntese das enzimas celulolíticas está sujeita a uma série de controles bioquímicos e genéticos. Foi observado que a mesma é induzida pela presença de celulose, lactose, soforose e celobiose e reprimida por glicose ou açúcares facilmente metabolizáveis (MANDELS, 1982; MONTENECOURT, 1983).

Em 1957, Mandels & Reese constataram que, a celulose e a lactose induziam a produção de celulases por *T. reesei*. Hoje, sabe-se que a lactose é um indutor apenas quando presente em altas concentrações (ERIKSSON & WOOD, 1985).

ERIKSSON & HAMP (1978) demonstraram que a atividade de endoglicanase em *S. pulverulentum* é induzida por celobiose a baixas concentrações (1mg/l), enquanto que em *T. reesei* esta mesma concentração não induz a formação de endoglicanase. Porém, a soforose (2-O- β -D-glicopiranosil-D-glicose), na concentração de 1 mg/ml causa a indução da endoglicanase neste microrganismo. A soforose, apesar de ser um potente indutor das endo e exoglicanases, não induz celobiase em *T. reesei* (MANDELS, 1982). A celobiase em *T. reesei* é constitutiva e produzida intracelularmente a baixos níveis (STERNBERG et al., 1977).

A natureza da indução ainda é desconhecida porém, a maioria dos autores aceita a teoria de que os microrganismos produzem pequenas quantidades de celulases basais ou

constitutivas. Estas enzimas quebram a celulose, e os produtos solúveis, como a celobiose, são carregados para dentro da célula onde são convertidos, pela própria β -glicosidase (MERIVUORI et al., 1985).

GRITZALI & BROWN, (1979) sugeriram que a celobiase constitutiva deve ser responsável pela formação de soforose dentro da célula através da transferência de unidades glicosil à celobiose (transglicosilação), e que, sendo assim, a soforose seria o verdadeiro indutor das celulases. Porém, nem todas as espécies de *Trichoderma* e outros microrganismos respondem positivamente à soforose.

A repressão catabólica foi observada nos fungos produtores de celulases. Os produtos formados pela ação do próprio sistema enzimático reprimem a ação destas enzimas (MONTENECOURT, & EVELEIGH^a 1977). Nos microrganismos procarióticos, os genes sujeitos a repressão catabólica só são reprimidos na presença de duas condições; se a concentração de glicose for baixa, a concentração cAMP deve ser alta ou, na presença de indutor apropriado para ligar-se ao repressor de proteína, causando a dissociação do gene operador. Em fungos não há correlação entre a quantidade de cAMP e repressão catabólica na produção de celulases (MERIVUORI et al., 1985).

A secreção das celulases é outro possível ponto no qual o controle pode ser exercido (STUTZENBERGER, 1987). Todas as

proteínas extracelulares sintetizadas pelo *Trichoderma* durante o seu crescimento em celulose, são glicoproteínas. Alguns estudos demonstraram que estas enzimas estão localizadas no retículo endoplasmático e em vesículas secretórias. Isto é comprovado pela existência de alguns mutantes hipersecretórios com grande quantidade de retículo endoplasmático (CUSKEY et al., 1981).

2.3. PRODUÇÃO DE CELULASES POR MICRORGANISMOS

Devido à grande quantidade de celulose existente em todo o mundo, sua biodegradação é quantitativamente importante em muitos habitats naturais, tais como o solo, folhas e florestas, sedimentos aquáticos e sistemas feitos pelo homem, como a compostagem e digestores anaeróbicos (KNAPP, 1985).

A multiplicidade de formas das enzimas celulolíticas, como por exemplo: celulase de *T. reesei* que contém duas celobiohidrolases, I e II, na proporção de 60 e 25% respectivamente, varia conforme o microrganismo produtor (ERIKSSON & WOOD, 1985). Assim, as propriedades das enzimas, isto é, seu modo de ação, peso molecular, especificidade pelo substrato, também podem diferir, de acordo com o microrganismo que as produz.

Os principais microrganismos produtores de celulases estão listados na Tabela 2.

TABELA 2: MICRORGANISMOS PRODUTORES DE CELULASES

Grupo	Organismo
Bactéria	<i>Acetivibrio cellulolyticus</i> , <i>Bacteroides cellulosolvens</i> , <i>B. succinogenes</i> , <i>Cellulomonas</i> sp., <i>Cellvibrio fulvus</i> , <i>C. gilvus</i> , <i>C. vulgaris</i> , <i>C. thermocellum</i> , <i>C. thermomonospora</i> , <i>Pseudomonas fluorescens</i> , <i>Ruminococcus albus</i>
Actinomycetes	<i>Streptomyces griseus</i> , <i>Thermoactinomyces</i> sp., <i>Thermomonospora curvata</i> , <i>T. fusca</i> .
Fungos	<i>Agaricus bisporus</i> , <i>Aspergillus fumigatus</i> , <i>A. niger</i> , <i>A. terreus</i> , <i>Botryodiplodia theobromae</i> , <i>Chaetomium thermophilum</i> , <i>Eupenicillium javanicum</i> , <i>Fusarium solani</i> , <i>Humicola insolens</i> , <i>Macrophoma phaseolina</i> , <i>Myrothecium verrucaria</i> , <i>Mycellophthora thermophila</i> , <i>Pellicularia filamentosa</i> , <i>Penicillium citrinum</i> , <i>Penicillium funiculosum</i> , <i>P. trensis</i> , <i>P. janthinellum</i> , <i>P. variabilia</i> , <i>Pestalotiopsis westerdijkii</i> , <i>Polyporus adustus</i> , <i>P. tulipiferae</i> (<i>Irpex lacteus</i>), <i>P. versicolor</i> , <i>Poria</i> sp., <i>Sporotrichum cellulophilum</i> , <i>S. dimorphosporum</i> , <i>S. pulverulentum</i> (<i>Chrysosporium lignorum</i>), <i>S. pruinatum</i> , <i>S. thermophile</i> , <i>Talaromyces emersonii</i> , <i>Thermoascus aurantiacus</i> , <i>Thielavia terrestris</i> , <i>Trametes sanguinea</i> , <i>Trichoderma harzianum</i> , <i>T. koningii</i> , <i>T. lignorum</i> , <i>T. longibrachiatum</i> , <i>T. pseudokoningii</i> , <i>T. reesei</i> , <i>Trichosporum cutaneum</i> , <i>T. pullulans</i>

FONTE: LJUNGDAHL & ERIKSSON, 1985.

2.3.1. PRODUÇÃO DE CELULASES POR FUNGOS

2.3.1.1. Fungos Aeróbios

Entre os fungos aeróbios mais efetivos na biodegradação natural dos resíduos lignocelulósicos, estão os fungos de decomposição branca ("white-rot-fungi"), os fungos de decomposição marrom ("brown-rot-fungi") e os fungos de decomposição branda ("soft-rot-fungi") (MONTGOMERY, 1983; KNAPP, 1985).

Os fungos de decomposição branca possuem em comum a capacidade de degradar lignina tão bem quanto os polissacarídeos da madeira. O fungo de degradação branca mais estudado é o *Sporotrichum pulverulentum* que é termoresistente, crescendo bem a temperaturas em torno de 38 e 39°C. O mecanismo de ação do *S. pulverulentum* envolve cinco endo- β -1,4-glicanase e duas β -glicanases (MONTGOMERY, 1983; ERIKSSON & WOOD, 1985).

Uma enzima oxidativa, a qual foi denominada de celobiose oxidase, oxida celobiose, grandes celodextrinas e seus correspondentes ácidos urônicos utilizando oxigênio molecular (VAHERI, 1982). Além da celobiose oxidase, *S. pulverulentum* possui outra enzima capaz de promover a oxidação da celobiose, chamada de celobiose quinona também conhecida como celobiose desidrogenase (WESTERMARK & ERIKSSON, 1974). Esta enzima catalisa a oxidação de celobiose e oligossacarídeos acima de celopentaose a suas

correspondentes lactonas, e parece estar relacionada com a degradação de lignina e celulose pelos fungos de degradação branca (COUGHLAN^a, 1985).

Dichomitus squalens é um fungo de decomposição branca pouco estudado, mas que possui alta produção de endo- β -1,4-glicanase somente em meio líquido (ROUAU & ODIER, 1986).

Os fungos de decomposição marrom atacam extensivamente a celulose. Estes fungos produzem endo- β -1,4-glicanases, fato verificado através de análises de madeira degradada por este tipo de fungo que mostra o decréscimo no grau de polimerização da celulose. Em 1974, Koenigs, sugeriu que o ataque inicial da celulose microcristalina por este tipo de fungo era realizado via sistema H_2O_2/Fe^{+2} , porém o mecanismo de degradação completa ainda não é conhecido (LJUNGDAHL & ERIKSSON, 1985).

Segundo COUGHLAN^a (1985), em 1955 e em 1964, foi observado que os fungos de decomposição branca atacam principalmente os polissacarídeos da madeira. Estes, atacam preferencialmente a camada S_2 da parede celular secundária, sendo que a camada S_3 e a lamela média são resistentes ao ataque, provavelmente pelo alto teor de lignina.

Embora os fungos de decomposição branca sejam capazes de degradar a celulose cristalina, sob condições de

laboratório, apenas algumas espécies estudadas parecem liberar extracelularmente complexo enzimático capaz de promover a hidrólise completa deste material, isto é, endo e exoglicanases e β -glicosidases. Neste sentido, o microrganismo mais estudado é o *Trichoderma viride*, isolado a partir de material em decomposição do exército americano, na Nova Guiné, durante a II Guerra Mundial. A partir de 1977, esta cepa foi designada *T. reesei* em homenagem ao seu principal estudioso Edwin Reese (AUGUSTINE, 1976; MANDELS, 1982).

O *T. reesei* é prototrófico, isto é, cresce em meio inorgânico contendo apenas uma fonte simples de carbono tais como, glicose e lactose (ANDREOTTI *et al.*, 1980). Não há necessidade de suplementação do meio com vitaminas, aminoácidos ou outros fatores de crescimento. Devido ao fato do *Trichoderma* não utilizar nitratos como fonte de nitrogênio, geralmente $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e uréia são utilizados. A adição de cobalto e cálcio não é necessária para o crescimento, mas a sua adição promove um aumento na produção de celulases (STERNBERG, 1976).

Fontes de carbono, tais como, celulose microcristalina (Avicel), celulose triturada em moinho de martelo ou em moinho de bolas (Solka-Floc BW 40 e Solka-Floc BW 200) resíduos agroindustriais, podem ser utilizados em concentrações que variam de 0,5 a 2% em laboratório, embora concentrações em torno de 8% já tenham sido utilizadas na produção de celulases (STERNBERG, 1976; MANDELS & ANDREOTTI, 1978). Entretanto,

praticamente toda a celulase de *Trichoderma* disponível comercialmente é produzida em meio sólido (fermentação Koji) (TOYAMA, 1976).

Para a produção enzimática em meio líquido, geralmente, são adicionados detergentes não iônicos, como o Tween 80, em concentrações que variam entre 0,05 e 2% (REESE & MAGUIRE, 1969). Os detergentes parecem atuar a nível de membrana aumentando a secreção enzimática (STERNBERG, 1976).

Alguns indutores tais como: sofrose, celobiose e lactose são adicionados ao meio de produção (ANDREOTTI *et al.*, 1980; MANDELS, 1982; REESE & MANDELS, 1984). Quando o *T. reesei* cresce em meio contendo glicose como fonte de carbono e sofrose como indutor, o complexo formado contém celobiohidrolase I e II na proporção de 60 e 25% respectivamente, 15% de endo- β -1,4-glicanase e alguma β -glicosidase (GRITZALI & BROWN, 1979).

A temperatura ótima para produção de celulases por *T. reesei* é 28°C (MANDELS, 1982) porém, a secreção enzimática (principalmente de endoglicanase e xilanase) é maior a temperaturas mais baixas (SUH *et al.*, 1988; MERIVUORI *et al.*, 1990).

O pH também é fator importante durante a fermentação. Enquanto o microrganismo cresce melhor em pH próximo a 5,0, a produção de celulases é maior em pH em torno de 3,0.

Então, para produção em batelada, utiliza-se o controle natural de pH, uma vez que o meio líquido utilizado possui pH inicial por volta de 5,7, e após 40 horas de fermentação cai para 3,0-3,5, mantendo-se constante até o final de fermentação (MANDELS & ANDREOTTI, 1978).

Um estudo relacionando pH, fonte de carbono e de nitrogênio e suas concentrações, foi realizado por COCHET (1991), utilizando um mutante do *T. reesei* (E-12). O estudo revelou uma relação balanceada ou equivalente entre atividade de hidrólise de papel de filtro e celobiase quando as enzimas foram produzidas em meio contendo 8% de celulose microcristalina suplementado com farelo de amendoim a pH 4,5 (COCHET, 1991).

Outros fungos são capazes de produzir o complexo celulolítico completo, tais como: *T. koningii* (WOOD & Mc CRAE, 1972), *Penicillium funiculosum* (BORCHERT & BUCHHOLZ, 1987), *Fusarium solani* (ENARI & PAAVOLA, 1987) e *Neurospora crassa* (YAZDI *et al.*, 1990). Estes fungos produzem grande quantidade de endoglicanases e quantidade variável de β -glicosidase, mas pouca exoglicanase. Um mutante de *P. pinophilum* (NTG II/6) foi capaz de produzir extracelularmente todo o complexo celulolítico, especialmente em meio contendo Avicel ou Solka-Floc, como fonte de carbono e água de maceração de milho, como fonte de nitrogênio. A β -glicosidase não foi produzida quando foram utilizadas fontes inorgânicas de nitrogênio (BROWN *et al.*, 1987).

Algumas espécies do gênero *Aspergillus* parecem produzir β -glicosidase em grande quantidade, tais como: *A. niger* (GOKHALE et al., 1988; MADAMWAR et al., 1989), *A. japonicus* (SANYAL et al., 1988), *A. phoenicis* (DESCHAMPS & HUET, 1984), *A. fumigatus* (WASE & VAID, 1983) e *A. aculeatus* (ARAI et al., 1989) sendo que desta última espécie foram caracterizadas duas avicelases, e a temperatura ótima de atividade de ambas foi 65°C.

KUBICEK, (1982) estudou o mecanismo de excreção das β -glicosidases em *T. pseudokoningii* que foi relacionado com a lise ou solubilização da parede celular do fungo.

BORGIA & SYPHERD (1977) estudaram o controle da síntese e a produção de β -glicosidase por *Mucor racemosus*, em diversas fontes de carbono e verificaram que esta enzima é sintetizada na presença de glicerol, lactato, xilose, ribose, α -metilglicosídeo, α -fenilglicosídeo, maltose e celobiose, como fontes de carbono.

Alguns autores estudaram a produção de celulasas utilizando resíduos agroindustriais como fonte de carbono. Neste sentido, SOUNDAR & CHANDRA (1988), isolaram duas cepas de *Hemicella grisea* mesofílicas com alta atividade de endoglicanase, quando crescidas em casca de banana. SHAMALA & SREEKANTIAH (1987) realizaram um cultivo sucessivo de cinco fungos (*A. ustus*, duas cepas de *Trichoderma* sp., *Botrytis* sp. e *S. pulverulentum*) em casca de arroz e farelo de trigo. As atividades celulolíticas

foram diminuindo a cada cultivo pelos diferentes fungos sendo que, a perda do substrato em peso foi de 55% para a casca de arroz e 73% para o farelo de trigo.

A maioria dos fungos produtores de celulasas produzem xilanases, como é o caso do *T. reesei*, algumas espécies de *A. niger*, *Agaricus bisporus*, *Talaromyces* sp. entre outros (DEKKER, 1985).

Recentemente, uma nova espécie de *Trichoderma*, o *T. longibrachiatum*, está sendo estudado por apresentar, além de celulasas, alta produção de xilanases em meio contendo oligômeros de xilose como indutores (ROYER & NAKAS, 1989 e 1990).

A maioria dos fungos celulolíticos são mesofílicos, o que dificulta o seu cultivo em regiões tropicais onde a biomassa celulósica é abundante. Outra desvantagem é que, as celulasas produzidas por microrganismos mesofílicos, em geral, não são resistentes a altas temperaturas. Isto pressupõe que, durante sua utilização no processo de sacarificação da celulose, possa ocorrer contaminação por *Bacillus* sp., os quais são termotolerantes (KAWAMORI *et al.* 1987).

Entre os fungos termofílicos, o *Thermoascus aurantiacus* é um dos mais estudados. Este fungo é capaz de crescer e produzir celulasas a 50°C, as quais são resistentes a 70°C por, no mínimo, 24 horas. Gentiobiase e sofrose não são indutores

da produção de celulases por este fungo (FELDMAN et al., 1988). Uma cepa de *T. aurantiacus*, denominada de A 131, foi isolada por KAWAMORI et al. (1987), sendo que, sua produção enzimática é altamente induzida pela presença de polissacarídeos amorfos contendo ligações β -1,4, tais como a xilana.

A cepa termofílica *Talaromyces emersonii* CBS 814.70 produz um sistema celulolítico extracelular completo sendo que, uma β -glicosidase, (das diversas produzidas pelo fungo) chamada de BGIII, não foi afetada pela inibição de glicose (McHALE & MORRISON, 1986). O *T. emersonii* CBS 814.70 é capaz de crescer em meio líquido contendo lactose onde as celulases produzidas são secretadas no meio durante o crescimento do microrganismo (MORRISON et al., 1987).

Outros fungos termofílicos foram estudados para a produção de celulases, como *Sporotrichum* (*Chrysosporium*) *thermophile* (CANEVASCINI & MEYER, 1979; MEYER & CANEVASCINI, 1981; FRACHEBOUD & CANEVASCINI, 1989); *Termitomyces clypeatus* (SENGUPTA & SENGUPTA, 1990) e *Chaetomium thermophile* var *coprophile* (LUSIS & BECKER, 1973).

2.3.1.2. Fungos Anaeróbios

Entre os fungos anaeróbios produtores de celulases destacam-se os fungos do rúmem, os quais sintetizam uma grande variedade de enzimas hidrolíticas. *Neocallimastix frontalis* e

Piromyces spp. são fungos anaeróbios presentes no rúmem de animais, porém, a grande maioria dos microrganismos anaeróbios envolvidos na degradação da celulose no rúmem são bactérias (KNAPP, 1985).

O sistema de enzimas extracelulares produzidas pelo fungo *Neocallimastix frontalis*, crescido em cocultura com a bactéria metanogênica *Methanobrevibacter smithii*, foi capaz de solubilizar algodão com mais eficiência que o *T. reesei* (LYND et al. 1989; BARICHIEVICH & CALZA, 1990).

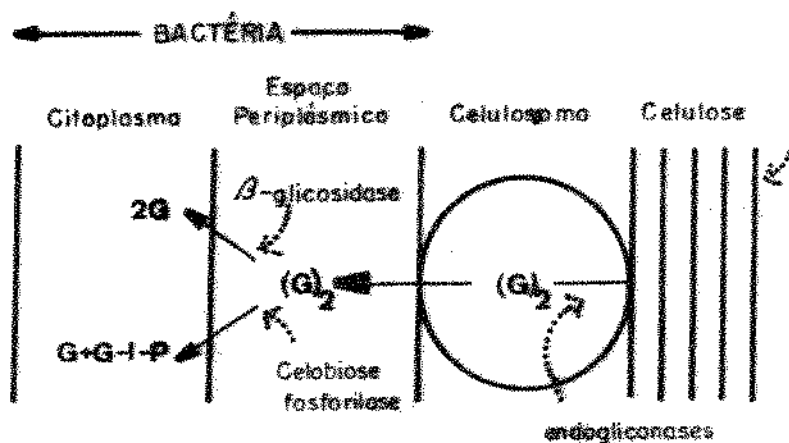
2.3.2. PRODUÇÃO DE CELULASES POR BACTÉRIAS

Há uma tendência em se comparar o sistema celulolítico bacteriano com o fúngico, por este motivo, as celulases de origem bacteriana são denominadas por endo e exo- β -1,4-glicanases. Em geral, as bactérias produzem pouca ou nenhuma exo- β -1,4-glicanase e β -glicosidase (LJUNGDAHL & ERIKSSON, 1985; ROBSON & CHAMBLISS, 1989). A enzima, celobiose fosforilase (celobiose-ortofosfato- α -D-glicosiltransferase E.C. 2.4.1.20) produzida intracelularmente, parece substituir a função da β -glicosidase fúngica, isto é, metaboliza a celobiose diminuindo seu efeito inibitório sobre a atividade celulolítica (COUGHLAN^a, 1985; LJUNGDAHL & ERIKSSON, 1985).

Ao contrário dos fungos, o sistema enzimático das bactérias é predominantemente intracelular. Uma estrutura de alto

peso molecular, associada a célula, o celulosoma, parece ser responsável pela aderência da bactéria ao substrato onde as endoglicanases (mais raramente, exocelobiohidrolases) atuam, hidrolizando a celulose. A celobiose e os oligocelossacarídeos restantes no celulosoma são metabolizados pela celobiose fosforilase (ou β -glicosidase) no espaço periplasmático (COUGHLAN^a, 1985). A hidrólise da celulose pelo sistema enzimático bacteriano está demonstrado na Figura 6.

FIGURA 6: HIDRÓLISE DA CELULOSE PELO SISTEMA ENZIMÁTICO CELULOLÍTICO DAS BACTÉRIAS



FONTE : COUGHLAN^a, 1985

2.3.2.1. Bactérias Aeróbias

Entre as bactérias aeróbias envolvidas na degradação da celulose, as mais importantes são as do gênero *Cellulomonas*, algumas cepas de *Pseudomonas* (*Cellvibrio* agora está incluída neste gênero), *Bacillus* e muitos actinomicetos como

Streptomyces, *Micromonospora* e *Thermoactinomyces* (MANDELS & ANDREOTTI, 1978; ERIKSSON & WOOD, 1985).

As espécies celulolíticas conhecidas do gênero *Cellulomonas* são: *C. fimi*, *C. uda*, *C. flavigena* e *C. fermentans*. O sistema celulolítico de *C. fimi* é composto de três, ou talvez quatro enzimas, sendo duas ou três endo- β -1,4-glicanases e uma exo- β -1,4-glicanase (ROBSON & CHAMBLISS, 1989). RODRIGUEZ et al. (1988) estudaram o efeito do pH e temperatura sobre as celulases produzidas por *Cellulomonas* sp. em bagaço de cana. As condições ótimas para atividade enzimática foram : pH 6,5 e temperatura de 50°C para CMCase, pH 7,0 e 50°C para atividade em papel de filtro e para β -glicosidase pH 7,0 e 45°C.

Diversas espécies de *Bacillus* são produtoras de celulases como, *B. subtilis*, *B. polymyxa*, *B. liqueniformis* e cepas alcalofílicas (ROBSON & CHAMBLISS, 1989; SHARMA et al., 1990). Pesquisadores japoneses isolaram um *Bacillus* sp. produtor de celulase alcalina que tem o crescimento celular máximo na faixa de pH entre 9 e 10 (ITO et al., 1989; SHIKATA et al., 1990). OKOSHI e colaboradores (1990) purificaram três endoglicanases produzidas por esta cepa alcalofílica e a faixa de pH ótimo destas enzimas foi entre 6 e 10.

Muitos autores estudaram a degradação de materiais lignocelulósicos por actinomicetos, uma vez que uma parte das celulases produzidas por estas bactérias são liberadas

extracelularmente. STUTZENBERGER (1987) verificou o aumento na liberação das celulases da bactéria termofílica, *Thermomonospora curvata*, pela adição de Tween-80 ao meio de cultivo da bactéria.

van ZYL (1985) utilizou *Streptomyces albogriseolus*, *S. nitrosporeus* e *Micromonospora melanosporea*, actinomicetos mesofílicos, na sacarificação de bagaço de cana não tratado, sendo que, o principal produto formado foi celobiose. Este fato foi explicado quando detectou-se que a maior parte de β -glicosidase produzida era intracelular. MASON e colaboradores (1988) identificaram enzimas celulolíticas produzidas em meio contendo glicose e em meio contendo palha triturada em moinho de bola, por *Actinomadura* sp., *Streptomyces cyaneus* e *Thermomonospora mesophila*. Algumas enzimas identificadas encontraram-se presentes em ambas condições de cultivo, porém outras foram específicas para o tipo de meio utilizado.

Bactérias termofílicas são importantes na produção de celulases termoresistentes, as quais podem ser utilizadas em processos industriais a altas temperaturas. Com este objetivo, foram isoladas as cepas de *Thermomonospora fusca* (WALKER, et al., 1990) e *T. curvata* (STUTZENBERGER, 1987), e estas, além de atividade de endo- β -1,4-glicanase, apresentaram atividade de exo- β -1,4 glicanase.

2.3.2.2. BACTÉRIAS ANAERÓBIAS

A degradação anaeróbia da celulose é especialmente importante em três ambientes: no rúmem dos animais, em solos pantanosos (águas residuais) e digestores anaeróbios (KNAPP, 1985).

Alguns animais herbívoros, incapazes de produzir enzimas que degradam a celulose, possuem relações simbióticas com microrganismos capazes de degradar este polissacarídeo. A microflora do rúmem do gado e do carneiro são bem conhecidas e estudadas, e as principais bactérias celulolíticas deste sistema são: *Bacterioides succinogenes*, *Ruminococcus albus*, *R. flavifaciens*, *Butyrovibrio fibrisolvens* e *Eubacterium cellulosolvens* (MANN, 1968; TEATHER & WOOD, 1982; ROBSON & CHAMBLISS, 1989; HUANG & FORSBERG, 1990; McALLISTER *et al.*, 1990).

A bactéria mesofílica, *Acetovibrio cellulolyticus* parece ser a mais importante isolada de águas de esgoto e difere da maioria das bactérias celulolíticas pela sua habilidade de usar apenas celulose, celobiose e salicina para crescer (ROBSON & CHAMBLISS, 1989).

Entre as bactérias anaeróbias produtoras de celulasas, as do gênero *Clostridium* são as mais estudadas. *C. cellobioparum* e *C. thermocellum* são encontradas em solos e sedimentos anaeróbios, e em digestores anaeróbios onde fermentam a

glicose e glicose-1-fosfato, via Embden-Meyerhof, à piruvato. Este composto é futuramente metabolizado à hidrogênio, CO_2 , etanol, acetato, lactato e em alguns casos, formato, butirato e succinato (JOHNSON *et al.*, 1981; GUILIANO *et al.*, 1983; LYND *et al.*, 1989). A produção de celulases pela bactéria termofílica, *C. thermocellum* é constitutiva e não reprimida por glicose (ROBSON & CHAMBLISS, 1989).

MORI (1990) isolou duas cepas de *Clostridium*, *C. thermohydrosulfuricum* YM 3 e *C. thermocellum* YM 4 de uma cocultura, sendo que a primeira possui alta resistência ao etanol produzido.

Uma avicelase (exoglicanase) termoresistente de *C. stercorarium* foi isolada por BRONNENMEIER & STAUDENBAUR (1990). A enzima é completamente estável a 60°C e degrada Avicel por vários dias sem perder a atividade.

2.4. MELHORAMENTO DE MICRORGANISMOS CELULOLÍTICOS

Nos últimos anos, muitos laboratórios direcionaram suas pesquisas para a obtenção de mutantes. Os objetivos da mutação são aumentar a produtividade enzimática e/ou as propriedades intrínsecas das enzimas, como por exemplo: aumento da taxa da síntese enzimática e sua secreção, remoção da repressão catabólica, isolamento de mutantes produtores de enzimas com alta especificidade e aumento da estabilidade das enzimas.

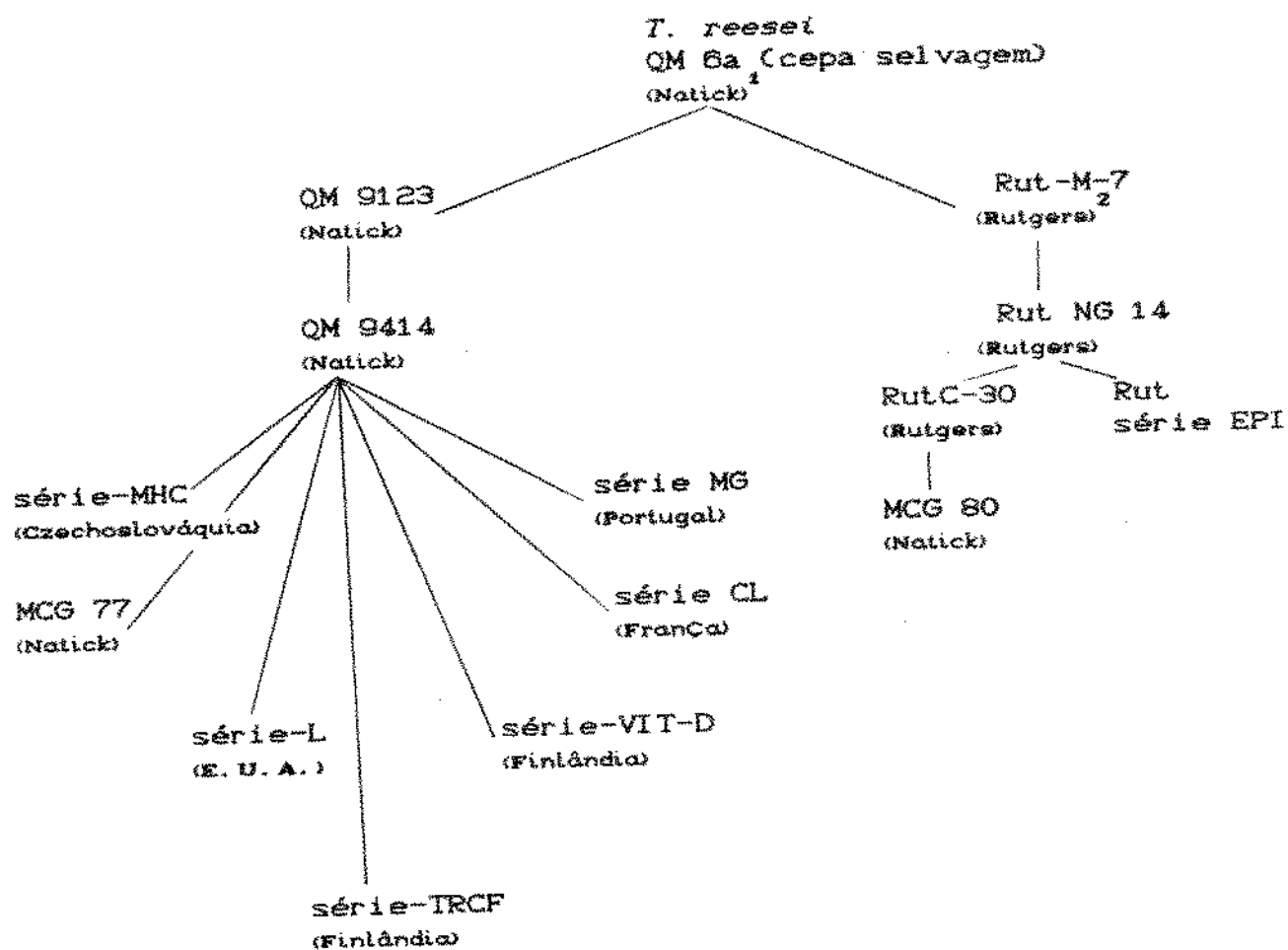
A maioria dos mutantes foram obtidos pelo uso de técnicas convencionais da genética clássica, (MANDELS et al., 1971; DURAND, 1988). Estas técnicas incluem, tratamento com agentes mutagênicos (n-metil-n-nitro-N'-nitrosoguanidina), radiação ultra-violeta, raios gama e acelerador linear. Porém, por estes métodos, são obtidos mais mutantes "negativos" (que diminuem ou cessam a produção enzimática) do que "positivos".

O aparecimento recente das técnicas de genética molecular oferece novas possibilidades para o melhoramento das cepas como, a introdução de uma função codificada por um gene de outro microrganismo. Porém, não pode-se afirmar que a genética molecular, a partir de uma cepa selvagem, poderá produzir melhoramentos comparáveis aos obtidos pela seleção de mutantes, devido à complexidade do sistema regulatório celulolítico (DURAND, et al., 1988).

Foram desenvolvidos muitos programas de mutação no mundo todo, principalmente para a seleção e isolamento de mutantes da cepa selvagem do *Trichoderma reesei* QM 6a (Figura 7).

Também foram realizados muitos trabalhos de melhoramento com a cepa QM 9414, e um dos mais bem sucedidos, na Universidade de Rutgers, onde, após tratamento com radiação U.V. e nitrosoguanidina foram conseguidas duas cepas, RUT C30 e RUT NG14 (Figura 7). A cepa RUT C30 é considerada completamente resistente a repressão catabólica sendo que, sua taxa de síntese de proteína e secreção também são altas (CUSKEY, 1981).

FIGURA 7: PROGRAMAS DE SELEÇÃO DE MUTANTES PARA CEPAS DE *T. reesei*



¹ "Natick U.S. Army Research and Development Laboratory"
Natick - M.A. - E.U.A.

² "University of Rutgers" - Rutgers - E.U.A.

FONTE: CUSKEY et al., 1981.

Foram isolados mutantes com alta produtividade de celulase, a partir dos termofílicos, *Termomonospora curvata*, *Thermoascus aurantiacus* o qual não tem sua regulação ligada a repressão catabólica (FELDMAN *et al.*, 1988).

Mutantes de *Aspergillus fumigatus* (WASE & VAID, 1983), *Penicillium pinophilum* (BROWN *et al.*, 1987), *Aspergillus niger* (GOKHALE *et al.*, 1988), *Neurospora crassa* (YAZDI *et al.*, 1990) e muitos outros microrganismos também foram obtidos.

O mutante *Talaromyces emersoni* CBS 814.70, produz grande quantidade de β -glicosidase em meio contendo lactose, porém, secreta baixas concentrações de endoglicanase. MORRISON *et al.* (1987) obtiveram um mutante do *T. emersonii* CBS 814.70, denominado de U.V. 7, o qual produz alta concentração de endoglicanase em meio de mesma composição.

Para isolamento dos mutantes, são utilizados métodos de seleção ("screening"), que geralmente baseiam-se na habilidade dos microrganismos clarearem a celulose tratada com ácido fosfórico ("Walsyth cellulose") incorporada ao meio em placas de petri (MONTENECOURT & EVELEIGH^a, 1977; MURAO *et al.*, 1979).

A estes meios, podem ser adicionados repressores catabólicos como glicose ou glicerol, quando se deseja obter mutantes resistentes à repressão desses catabólitos (CUSKEY

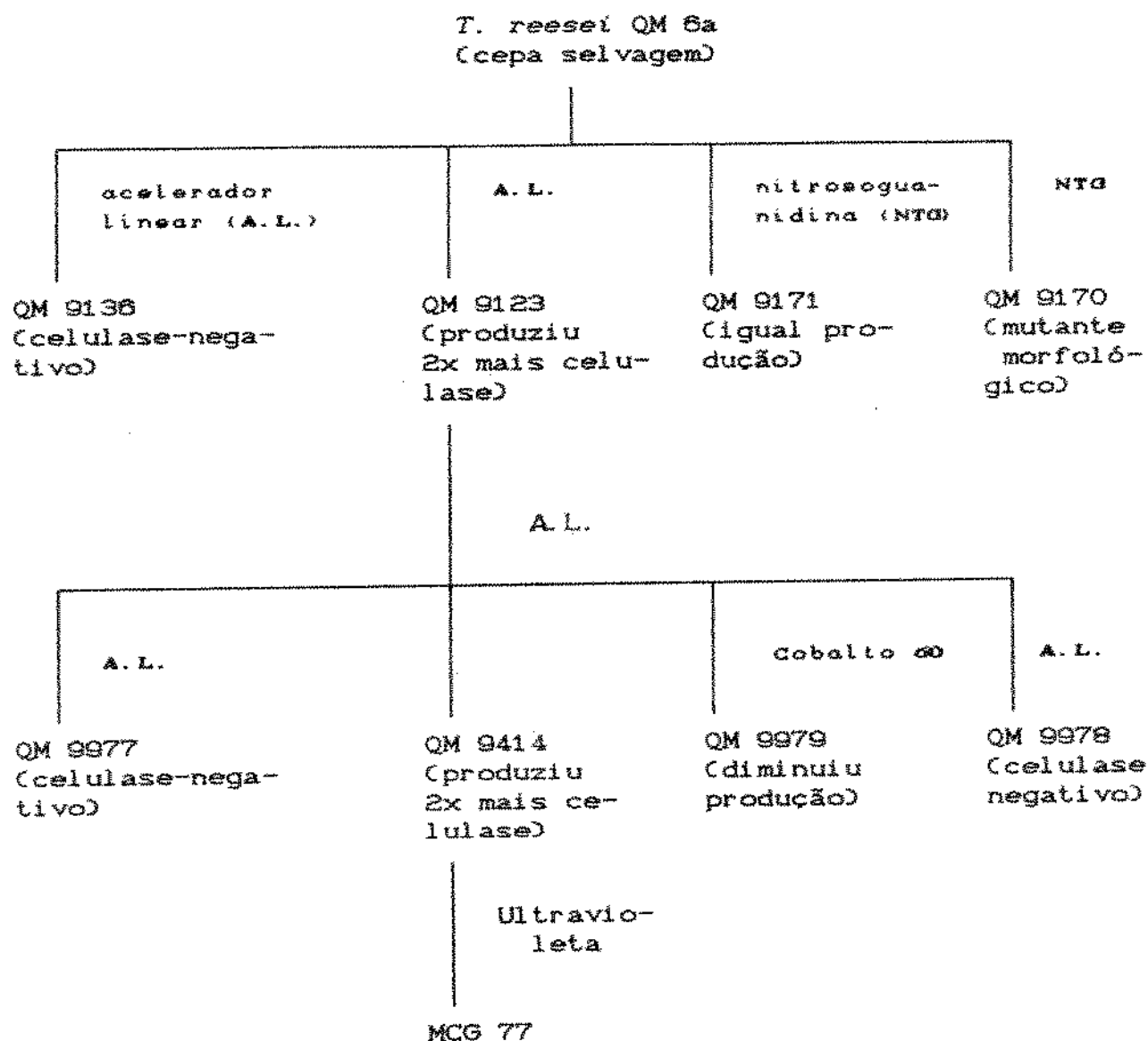
et al., 1981; KAWAMORI *et al.*, 1985). KAWAMORI e colaboradores em 1985, selecionaram mutantes do *T. reesei* plaqueando os esporos previamente expostos a radiação U.V. em meios contendo de 1 a 5% de glicose ou glicerol.

2.4.1. GENÉTICA CLÁSSICA

O programa de melhoramento mais importante realizado foi no "Natick U.S. Army Research and Development Laboratory" (Figura 8), onde foram conseguidas cepas importantes do *T. reesei*, usadas posteriormente por outros laboratórios em programas de mutação, (Figura 7).

A cepa QM 9123 foi obtida a partir da QM 8a após aceleração linear, produzindo duas vezes mais celulasas que a original. Da mesma forma o *T. reesei* QM 9414 teve sua atividade duplicada em relação ao original QM 9123. Mais tarde (1977), sob tratamento com irradiação U.V. e Kanabicina, o QM 9414 originou o MCG 77. As cepas QM 9136, QM 9977, QM 9978, QM 9979, QM 9170 (mutante com esporos brancos) e QM 9171 não produtor do pigmento solúvel amarelo característico são mutantes "negativos", isto é, diminuíram ou cessaram sua produção de celulasas (Figura 8).

FIGURA 8: PROGRAMA DE SELEÇÃO DE MUTANTES REALIZADA PELO "NATICK
U.S. ARMY LABORATORY"



FONTE: REESE & MANDELS, 1984.

MONTENECOURT & EVELEIGH (1977) testaram oxgal e Phosfon D, e a combinação dos dois compostos, sendo que a última alternativa mostrou-se mais efetiva no retardo do crescimento das hifas e na visualização do halo de hidrólise da celulose.

Rosa de bengala (di-sódio 4,5,6,7-tetracloro-2,4,5,7-tetraiodofluoresceína) é muito usado como restritor de crescimento de fungos e tem atividade inibitória sobre actinomicetos em concentrações acima de 670 mg/l (OTTOW, 1972).

Em 1990, YAWANOBE e colaboradores utilizaram um meio para seleccionar mutantes contendo Rosa de Bengala, sorbose e Triton X-100 como inibidores de crescimento das colônias (YAWANOBE *et al.*, 1990).

Outro método de genética clássica que está sendo utilizado mais recentemente, é a fusão de protoplastos. O primeiro trabalho foi realizado por TOYAMA e colaboradores em 1984, utilizando *T. reesei* QM 9414 e QM 9136 (mutante não produtor de celulasas), onde foi obtido um microrganismo que produziu duas vezes mais endoglicanase que o QM 9414 (TOYAMA *et al.*, 1984).

SIVAN *et al.* (1990) realizaram uma fusão de protoplastos com o *T. harzianum*, onde núcleos do microrganismo foram inseridos em protoplastos da mesma cepa e cepas diferentes.

As cepas resultantes foram caracterizadas quanto as suas características genéticas porém, não foram determinadas suas atividades enzimáticas.

2.4.2. GENÉTICA MOLECULAR

Embora os estudos de genética clássica apresentem mutantes com alta atividade celulolítica, a produtividade ainda é baixa em fungos e o tempo de fermentação necessário para a produção das enzimas, muito prolongado. Talvez, estes problemas possam ser solucionados pela clonagem dos gens das celulasas em bactérias as quais se dividem rapidamente (MONTENECOURT, 1983; DURAND et al., 1988).

A maioria dos gens das celulasas já foi clonado em *Escherichia coli* e em *Saccharomyces cerevisiae*. Um dos problemas é que a *E. coli* não glicosila as proteínas e a maior parte das celulasas fúngicas são glicoproteínas (MERIVUORI, 1985).

A levedura parece ser um hospedeiro mais acessível para genes clonados pois, sendo eucarioto presumivelmente não tem problemas com a glicosilação protéica. Em 1984, Sacco, Millet & Aubert clonaram um gen de *Clostridium thermocellum*, cel A, codificando para endoglicanase, em *Saccharomyces cerevisiae*. Entretanto, no microrganismo original toda a enzima era extracelular enquanto que, na levedura resultante foi encontrada no citoplasma (COUGHLAN^a, 1985).

DURAND *et al.* (1988), implantaram o gen SUC2, de *S. cerevisiae*, produtor de invertase no mutante CL 847 de *T. reesei*. O objetivo era que o CL 847 pudesse utilizar melaço e sacarose para produção de celulases, porém, o gen não se expressou em *T. reesei*.

Outra tentativa de aumentar a produção enzimática foi feita por HARKKI *et al.* (1991), os quais modificaram a proporção das celulases secretadas pelo *T. reesei* utilizando técnicas de engenharia genética. O gen que codifica para celobiohidrolase foi inativado reforçando assim, a expressão do gen que codifica endoglicanase.

2.5. APLICAÇÃO DAS CELULASES

A celulose representa 40 a 60% dos resíduos sólidos municipais, também é abundante nos resíduos agrícolas e em indústrias de processamento de frutas e vegetais. Por esta razão, a principal aplicação das celulases é na reciclagem desses materiais a produtos utilizáveis, sendo útil também no tratamento da poluição ambiental.

2.5.1. HIDRÓLISE DA CELULOSE

A conversão da celulose presente nos resíduos, à glicose, pela ação das celulases de *T. reesei*, tem sido muito estudada, mas não é economicamente viável até o momento. A

inviabilidade é devido principalmente a grande quantidade de enzima necessária para o processo e seu alto custo (MANDELS, 1985).

A conversão enzimática obtida por celulase de *T. reesei* é em torno de 25 a 40%, porém, esta porcentagem aumenta quando β -glicosidase é adicionada à solução enzimática (MANDELS, et al., 1981; KNAPPERT et al., 1981; STOCKTON et al., 1991).

O xarope de glicose produzido, pode servir de substrato para a produção de biomassa microbiana, etanol e outros químicos e para produção de biomassa protéica (MANDELS et al., 1974; GOLDSTEIN, 1976). Geralmente, leveduras do gênero *Saccharomyces* ou bactérias, tal como, *Zymomonas mobilis* são capazes de utilizar glicose e produzir altas concentrações de etanol (WOODWARD, 1987). Alguns microrganismos fermentam diretamente a celulose, isto é, a hidrólise e a fermentação ocorrem em uma única operação. Um exemplo deste tipo de microrganismo é a bactéria termofílica *C. thermocellum* e o fungo *Fusarium oxysporum*. O problema da fermentação direta é seu baixo rendimento e a sensibilidade do microrganismo ao produto formado (WOODWARD, 1987; CHRISTAKOPOULOS et al., 1989 e 1991).

A biomassa protéica pode ser obtida de duas maneiras: pelo crescimento direto do microrganismo no material celulósico, geralmente utilizando-se fungos e leveduras ou pelo crescimento do microrganismo (especialmente levedura) no xarope de

glicose obtido pela hidrólise enzimática do material lignocelulósico (TANAKA & MATSUNO, 1985).

O maior problema na otimização da sacarificação dos resíduos celulósicos é a presença de lignina e a cristalinidade da celulose (MILLET *et al.*, 1976; TANAKA & MATSUNO, 1985), os quais não inibem quimicamente a ação das celulases mas dificultam o acesso da enzima ao substrato. Este fato pode ser explicado pelo mecanismo de adsorção das enzimas celulolíticas em lignina e celulose microcristalina (STEINER *et al.*, 1988; CHERNOGLAZOV *et al.*, 1991).

Para aumentar a susceptibilidade dos materiais lignocelulósicos à hidrólise enzimática, podem ser utilizados pré-tratamentos físicos e ou químicos que visam aumentar a eficiência total do processo hidrolítico.

a) Pré-tratamentos físicos

Os tratamentos físicos mais utilizados são, a trituração em moinho de bola ou de rolo, por não produzirem subprodutos indesejáveis.

A moagem reduz a cristalinidade da celulose, aumentando sua área de superfície, e reduz também o teor de lignina ligada a celulose, tornando-a mais susceptível ao ataque enzimático. Papel jornal moído (200 mesh) em moinho de bola

resultou numa conversão de 84% do carboidrato contra 25% do jornal sem sofrer nenhum tratamento (WOODWARD, 1987).

Um aumento no grau de conversão da celulose pode ser obtido, combinando-se o tratamento físico com um tratamento químico. Amostras de farelo de trigo foram deslignificadas quimicamente com NaOH 5%, aumentando a conversão da celulose à glicose de 25 para 38%. Após a moagem da amostra, o rendimento de glicose passou para 67% (MILLET et al., 1976).

A explosão a vapor, onde o material é aquecido a alta temperatura de vapor, seguida de um rápido decréscimo na pressão, foi o método utilizado por ERIKSSON citado por WOODWARD, (1987) para deslignificar farelo de trigo.

A irradiação gama também pode ser utilizada, porém há o inconveniente do alto custo do investimento no processo (TANAKA & MATSUNO, 1985).

b) Pré-tratamentos químicos

O termo "celulose amorfa" é utilizado para descrever a celulose com alto grau de desordem estrutural após tratamento químico, podendo ser denominada de celulose II, III ou IV na terminologia de difração de raios X (MILLET et al. 1976).

Os principais tipos de pré-tratamentos químicos dos materiais lignocelulósicos serão descritos a seguir:

. Tratamento com álcali e/ou amônia: hidróxido de sódio e amônia são bons exemplos de agentes que causam alterações definidas na estrutura da celulose. A amônia, líquida ou gasosa, causa alteração na estrutura da celulose, que passa da forma I para a forma III.

Tanto a amônia, quanto o hidróxido de sódio pode ser utilizado, a baixas concentrações, para aumentar o valor nutritivo (digestibilidade) de forragens e resíduos agrícolas para a sua utilização por animais ruminantes (MILLET *et al.*, 1976).

HAN & CALLIHAN (1974) utilizaram casca de arroz e bagaço de cana tratados com NaOH 4% à 100°C por 15 minutos, e, os mesmos substratos, tratados como amônia à 130°C e 10 atmosferas de pressão. Os tratamentos aumentaram a conversão pela bactéria *Cellulomonas* de 29 para 53 e 73% para os substratos tratados com amônia e NaOH respectivamente.

. Tratamento com ácido: o pré-tratamento com ácido diluído (0,1 a 1% de concentração) é utilizado para extrair hemiceluloses e lignina na indústria de papel.

TANAKA *et al.* (1979) relacionaram o grau de cristalinidade da celulose com sua conversão a glicose. Para tal,

foi utilizada celulose cristalina tratada com ácido fosfórico a várias concentrações. Para cada celulose tratada foi medido o seu grau de hidrólise por celulasas de *Pellicularia filamentosa*. O maior grau de hidrólise foi obtido para a celulose tratada com ácido fosfórico 76% (v/v), em que praticamente não existiam mais regiões cristalinas.

Trabalho semelhante foi realizado por KNAPPERT et al. (1981) onde polpa de madeira tratada com ácido sulfúrico diluído (0 a 1,5%) a temperaturas entre 162 e 222°C, foi utilizada como substrato para celulasas de *T. reesei*. O maior rendimento de glicose foi obtido com polpa tratada acima de 180°C e 1,5% de ácido.

Tratamento com sulfito: apesar do tratamento ácido apresentar bons resultados na redução da cristalinidade, não é efetivo na deslignificação dos resíduos.

O tratamento de resíduos lignocelulósicos com SO₂ gasoso parece apresentar vantagens pela remoção seletiva da lignina sem danos a outros constituintes. O material é colocado em contato com sulfito gasoso sob pressão a 120°C por duas a três horas. Os resíduos lignocelulósicos tratados por este método produzem 40% mais glicose que os não tratados (WOODWARD, 1987).

2.5.2. OUTRAS APLICAÇÕES

Além da produção de glicose, as celulases têm sido utilizadas na indústria de alimentos, principalmente na indústria de processamento de frutas e vegetais. As celulases atuam na remoção da parede celular ou de fibras vegetais liberando proteínas, enzimas, pigmentos, aromas, polissacarídeos, óleos essenciais e outras substâncias. Os protoplastos utilizados em pesquisas genéticas, também podem ser obtidos pela ação das celulases (MANDELS, 1985). A Tabela 3 resume as principais aplicações das celulases.

SHARMA & JOSEPH (1983), utilizaram preparações enzimáticas de *Aspergillus terreus* e *Neurospora crassa* ricas em xilanase, pectinase e celulases para aumentar a extração de óleo essencial de casca de laranja.

Para macerar cenoura, SREENATH *et al.* (1984) utilizaram celulase e pectinase, obtendo uma degradação de 60% do substrato. Com o mesmo objetivo, Koba & Ishizaki (1990) utilizaram celulases de *T. reesei* em polpa de palmito deslignificada e obtiveram uma digestão de 90% dos carboidratos presentes na polpa.

TABELA 3 : APLICAÇÕES DAS CELULASES

Objetivo da aplicação enzimática	Resultados obtidos
Remoção da parede celular e fibra bruta.	. liberação do conteúdo celular, "flavours", enzimas, polissacarídeos (ágar) . aumento da digestibilidade de rações ricas em fibras . produção de protoplastos
Produção de glicose e açúcares solúveis.	. aumento do valor nutritivo, aumentando o teor de açúcar de rações . produção de proteína unicelular por leveduras . produção de álcoois e outros químicos . produção de matéria-prima para a indústria de fermentação (antibióticos ácido cítrico)
Produção de lignina	. para produção de adesivos resinas, matéria-prima para químicos
Aplicações em alimentos	. adição da proteína extracelular e micelial . remoção de fibra bruta . conversão de fibra a açúcar

FONTE: MANDELS, 1985.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE MICRORGANISMOS

3.1.1. COLETA DE AMOSTRAS

Foram coletadas amostras de material celulósico em decomposição e de solo obtidas de diferentes regiões do Brasil. As amostras foram acondicionadas em sacos plásticos para transporte ao laboratório.

3.1.2. ISOLAMENTO DE MICRORGANISMOS

As amostras foram colocadas em erlenmeyers, contendo água destilada esterilizada, em volume suficiente para que ficassem submersas. Após 24 horas, uma alíquota de cada amostra foi retirada com alça de platina sendo plaqueada em meio de isolamento (ver Apêndice, item 1). As placas foram incubadas a 30°C até o aparecimento de colônias, sendo em seguida transferidas para 45°C por 16 horas. As colônias que apresentaram halo transparente ao seu redor foram isoladas.

3.1.3. SELEÇÃO DE MICRORGANISMOS

As colônias isoladas, conforme descrito acima, foram testadas quanto a sua habilidade de degradação de papel de filtro. Para tal, foi usado meio líquido, em tubo de ensaio,

suficiente para cobrir 2/3 de uma fita (10x1cm) de papel de filtro Whatman N°1. Este meio continha a mesma composição de sais do meio de isolamento, variando-se o pH e as fontes de nitrogênio conforme o microrganismo testado (fungo, bactéria ou levedura) e está descrito no Apêndice, item 2.

Os microrganismos capazes de degradar a fita de papel de filtro em menos de 14 dias, foram selecionados. Entre estes, foi selecionado o microrganismo que apresentou maior atividade enzimática sobre celulose microcristalina (conforme item 3.7.2), após cultivo em meio sólido contendo farelo de trigo e água (1:1), por 5 dias a 30°C.

3.2. MANUTENÇÃO DOS MICRORGANISMOS

Os fungos foram mantidos em tubos de ensaio contendo ágar-batata (Biobrás) inclinado. As bactérias mantidas em meio ágar-nutriente (Biobrás) inclinado e as leveduras em ágar malte (SIGMA).

Após o crescimento dos microrganismos, foi acrescentado aos tubos, vaselina líquida estéril em quantidade suficiente para cobrir o ágar. Estes foram mantidos a 4°C, com repicagens a intervalos de 4 a 5 meses.

3.3. MICRORGANISMOS UTILIZADOS

Foram utilizados os seguintes microrganismos: linhagem selvagem (fungo) isolada de material celulósico em decomposição conforme descrito no item 3.1., e uma linhagem mutante, obtida por exposição a luz U.V. conforme descrito no item 3.4., os quais foram denominados de Blu 6.5. e m_{38} respectivamente.

Como padrão utilizou-se o *Trichoderma reesei* QM 6a (MANDELS & REESE, 1957) e o *Trichoderma reesei* QM 9414 (MANDELS, 1982) os quais foram doados pela Dra. Mary Mandels do "Natick U.S. Army Research and Development Laboratory", Natick-M.A. USA.

3.4. MUTAÇÃO

A oito tubos contendo a linhagem selvagem Blu 6.5 previamente crescida foi adicionada água destilada estéril, em quantidade suficiente para um volume final total de 50 ml. A superfície de cada ágar foi raspada com uma alça estéril para facilitar a remoção dos esporos. A suspensão de esporos foi filtrada em lã de vidro por duas vezes para a obtenção de monoesporos, os quais foram contados utilizando-se uma Câmara de Newbauer. Cinco mililitros desta suspensão foram colocados em placas de Petri estéreis, sendo a seguir expostos à radiação ultravioleta por diferentes períodos de tempo. Para a irradiação usou-se lâmpada de 15 watts e comprimento de onda de 300 nm a uma

distância de 18 cm das placas contendo a suspensão de esporos. Os tempos de exposição usados foram: 5, 10, 15, 20 e 25 minutos.

Após a irradiação, foi adicionado 10 ml de água destilada estéril em cada placa, as quais foram homogeneizadas e 0,1 ml de cada solução foi inoculada por esgotamento em placas contendo meio de isolamento (Apêndice, item 1). Estas placas foram incubadas a 30°C até o crescimento de colônias. Após este período, as placas foram colocadas a 45°C e as colônias que produziram halo ao seu redor foram contadas, isoladas e transferidas para tubos contendo ágar-batata inclinado, os quais foram incubados novamente a 30°C para crescimento. A partir da diferença entre o número inicial e final de esporos (após irradiação) foi obtido o número de sobreviventes. Relacionando o logaritmo do número de sobreviventes com o tempo de irradiação foi obtida a curva de sobrevivência. O tempo de irradiação em que obteve-se 1% de sobreviventes foi escolhido para proceder as demais mutações.

3.4.1. SELEÇÃO DAS COLONIAS MUTADAS

Para verificar o resultado do tratamento com luz U.V., as colônias isoladas após a exposição (item 3.4.) foram testadas quanto a atividade enzimática sobre papel filtro e celulose microcristalina, conforme descrito nos itens 3.7.2. e 3.7.3., após cultivo em meio sólido, contendo farelo de trigo e água (1:1), por 5 dias a 30°C.

3.5. PRODUÇÃO DE ENZIMAS CELULOLÍTICAS

Um estudo da produção das enzimas celulolíticas pelas linhagens Blu 6.5, m_{38} , *T. reesei* QM 6a e QM 9414, foi realizado em meio líquido com agitação e em meio sólido utilizando-se diversas fontes de carbono. Em meio líquido foram estudadas também a influência do tempo de cultivo e do tamanho do inóculo na produção de celulases.

3.5.1. PRODUÇÃO DE CELULASES EM MEIO LÍQUIDO

As enzimas foram produzidas por fermentação em erlenmeyers de 250 ml contendo 50 ml de meio líquido base (Apêndice, item 3) mais as fontes de carbono estudadas, inoculado com aproximadamente 1×10^5 esporos/ml. Os erlenmeyers foram incubados em câmara de agitação (Fanen) a 30°C e 150 rpm por 6 dias.

3.5.1.1. Influência da Fonte de Carbono

As seguintes fontes de celulose puras foram utilizadas em concentração de 5g/l de meio: celulose microcristalina (MERK), carboximetilcelulose (BDH), Solka-Flok Bw 40 e Bw 200 (James Riever Corporation) e lactose (Ecibra); e os seguintes resíduos agroindustriais (concentração de 10 g/l de meio líquido base): casca de arroz, serragem, farelo de trigo, farinha de babaçu, raspa de mandioca e bagaço de cana foram utilizados como fonte de carbono.

3.5.1.2. Influência de Inóculo

Foram inoculados de 1×10^2 a 1×10^5 esporos/ml em frasco erlenmeyer de 250 ml contendo 50 ml de meio líquido base (Apêndice, item 3) e celulose microcristalina como fonte de carbono. Os esporos foram contados em câmara de Newbaver e após o crescimento por 6 dias em câmara de agitação determinou-se as atividades enzimáticas de PFase e avicelase conforme descrito em 3.7.3 e 3.7.2.

3.5.1.3. Influência do Tempo de Cultivo

Os frascos erlenmeyers de 250 ml, contendo 50 ml de meio base (Apêndice, item 3) e Solka-Floc BW 200 como fonte de carbono, foram inoculados com aproximadamente 10^5 esporos/ml e as atividades de celulasas foram determinadas entre o primeiro e o décimo terceiro dia de incubação, a 30°C e 150 rpm, conforme descrito no item 3.7..

3.5.2. PRODUÇÃO DE CELULASES EM MEIO SÓLIDO

O meio sólido foi constituído de uma parte dos resíduos agrícolas (citados no item 3.5.1.1.), para uma parte de água ou solução de sais (descrita no Apêndice, item 1). Para casca de arroz e bagaço de cana a proporção resíduo/água ou solução de sais foi de 1:2.

3.6. OBTENÇÃO DAS ENZIMAS

As enzimas produzidas em meio líquido foram obtidas filtrando-se o meio em lã de vidro, onde o micélio do fungo fica retido e o filtrado obtido corresponde ao extrato enzimático bruto.

As enzimas produzidas em meio sólido foram obtidas acrescentando-se água destilada em volume 10 vezes maior que a quantidade de meio (P/V), seguida por homogenização e repouso de 60 minutos. O extrato obtido foi filtrado em lã de vidro e mantido em gelo (ou freezer) até a determinação das atividades enzimáticas.

3.7. DETERMINAÇÕES DAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS

Todas as determinações das atividades enzimáticas foram realizadas em duplicata e acompanhadas do branco da enzima e do branco do substrato. Para o branco da enzima, o substrato foi substituído pelo tampão usado na reação, enquanto que, para o branco do substrato, a enzima foi substituída pelo tampão.

Nas determinações de carboximetilcelulase, avicelase, e de hidrólise de papel de filtro, a glicose (Ecibra) foi utilizada como padrão e para xilanase e β -glicosidase foi utilizada xilose (Riedel De Haen AG) e paranitrofenol (BDH) respectivamente.

A unidade de enzima foi expressa como a liberação de 1 micromol de açúcar redutor (glicose ou xilose) ou paranitrofenol por minuto por ml de enzima, nas condições do ensaio. E a atividade específica foi expressa como unidade de enzima por miligrama de proteína

3.7.1. ATIVIDADE DE CARBOXIMETILCELULASE (CMCase)

O extrato enzimático (0,25 ml) foi adicionado à 0,5ml de solução 1% de carboximetilcelulose (baixa viscosidade-marca Sigma) em tampão acetato 0,05 M, pH 5,0, previamente incubado à 50°C, misturado e deixado reagir por 60 minutos. Os açúcares redutores liberados foram determinados pelo método do ácido-3,5-dinitrosalicílico (DNS) conforme MILLER (1959), descrito no item 3.9.3.

3.7.2. ATIVIDADE DE AVICELASE

Foi realizado da mesma maneira que para CMCase, apenas substituindo-se a solução de carboximetilcelulose (CMC) pela suspensão 1% de celulose microcristalina (MERCK) também denominada de Avicel, em tampão acetato 0,05 M pH 5,0. A incubação do sistema (substrato-enzima) foi feita por 60 minutos a 50°C com agitações periódicas com a finalidade de manter a celulose em suspensão.

3.7.3. ATIVIDADE DE HIDRÓLISE DE PAPEL DE FILTRO (PFase)

A determinação foi feita de acordo com MANDELS *et al.* (1976). A uma tira de papel de filtro Whatman N°1, 3,0x0,5 (cm) foi adicionado, 0,5 ml de tampão acetato 0,05 M pH 5,0 os quais foram previamente incubados a 50°C por 10 minutos. A seguir adicionou-se 0,25 ml de extrato enzimático e deixou-se reagir por 60 minutos. Os açúcares redutores liberados foram determinados pelo método do DNS.

3.7.4. ATIVIDADE DE XILANASE

Foi realizado da mesma forma como para CMCase, substituindo a solução de CMC por solução de xilana 1% ("Xylan from oat spelts" - SIGMA). A reação foi realizada à 50°C durante 30 minutos, medindo-se os açúcares redutores liberados pelo método do DNS ao final da reação

3.7.5. ATIVIDADE DA β -GLICOSIDASE

A atividade da β -glicosidase, ou mais especificamente aril- β -D-glicosidase foi determinada de acordo com JAFELICE *et al.* (1990), incubando-se o substrato, p-nitrofenil- β -D-glicosídeo 0,05 M em tampão acetato 0,05 M pH 5,0, com a enzima, por 15 minutos. A reação foi interrompida pela adição de 2,0 ml de bicarbonato de sódio 1,0 M e a absorbância medida a 410 nm.

3.8. MODO DE AÇÃO DAS ENZIMAS CELULOLÍTICAS

Foi verificado o modo de ação do complexo celulolítico sobre três substratos diferentes: celulose microcristalina (MERCK); celulose tratada com H_3PO_4 e carboximetilcelulose (BDH).

Os substratos foram incubados em tubos de ensaio a $50^{\circ}C$ por 10 minutos e após foi adicionada a enzima. Foram retiradas amostras de cada mistura de reação nos seguintes tempos: 0, 3, 5, 10, 20, 30, 40, 50 e 60 minutos. A degradação da celulose foi verificada pela formação de açúcares redutores, determinados pelo método do DNS, e pela formação de glicose determinada pelo método glicose-oxidase (WERNER, 1970) utilizando-se para comparação duas curvas padrões, de glicose e por cromatografia em papel conforme item 3.9.4.

3.9. DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS

3.9.1. DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS

As proteínas foram determinadas pelo método de LOWRY (1951), usando soro albumina bovina (BDH) como padrão. Uma amostra de 1,0 ml contendo entre 25 e 500 ug de proteína foi adicionada a 1,0 ml de um reagente A (contendo 1 ml de solução $CuSO_4$ 2% + 1 ml solução tartarato Na e K 4% + 2 ml de água sendo que, a 1 ml desta solução foi adicionado 10 ml Na_2CO_3 a 10% em

NaOH 0,5 N). A mistura da amostra e o reagente A foi deixada em repouso por 10 minutos e em seguida adicionado 3,0 ml do reagente de Folin diluído (1:1). Após 30 minutos, foi feita a leitura da reação a 660 nm.

Para concentrações mais elevadas de proteína (1-10 mg/ml) foi utilizado o método de Biureto (LAYNE, 1957). Um mililitro da amostra foi adicionado a 4 ml do reagente de Biureto (1,5 g de sulfato cúprico + 6 g de tartarato de Na e K + 500 ml de água + 300 ml de solução NaOH 10%, e o volume foi completado para 1 litro com água destilada). Após 30 minutos de repouso da mistura, a leitura foi realizada a 540 nm.

Durante a etapa de purificação e determinação de peso molecular, as proteínas foram determinadas pela leitura de absorbância de cada fração em luz ultra violeta a 280 nm.

3.9.2. DETERMINAÇÃO DO pH

A determinação do pH do meio foi realizada utilizando-se o potenciômetro (Digimed) previamente calibrado com soluções padrões a pH 4,0 e pH 7,0.

3.9.3. DETERMINAÇÃO DE AÇÚCARES

As determinações de açúcares redutores foram realizadas pelo método do ácido-3,5-dinitrosalicílico (DNS)

descrito por MILLER (1959), e utilizando uma curva padrão de glicose para comparação. A mistura contendo os açúcares (0,75 ml) foi adicionada a mesma quantidade de reagente de DNS, agitada e colocada em banho maria em ebulição por 5 minutos. A reação foi retirada da ebulição e colocada em banho de gelo, e após resfriada foi adicionado 16 ml de solução de tartarato de Na e K (1,5%). Em seguida foi realizada a leitura em espectrofotômetro a 540 nm.

Quando desejava-se medir apenas glicose, o método utilizado era o da glicose-oxidase (WERNER, 1970). Foi utilizado o Kit de reação da Boeringer-Mannheim-GmbH-Diagnostica. Cinco mililitros de um reagente contendo a enzima glicose-oxidase foi adicionado a 0,1 ml de amostra. Após 20 minutos em local escuro, foi realizada a leitura da reação a 620 nm.

3.9.4. CROMATOGRAFIA EM PAPEL PARA DETECÇÃO DE AÇÚCARES REDUTORES

A detecção de açúcares redutores por cromatografia em papel foi realizada de acordo com o método de TREVELYAN *et al.* (1950).

Em papel de filtro Whatmann N°1 (17x50 cm) foram aplicados 4 µl das amostras com tubo capilar, a 7 cm do início do papel de filtro. O sistema de eluição utilizado foi ácido acético, butanol e água (6:3:1) por 20 horas. Após este período, os cromatogramas foram secos e revelados com nitrato de prata em

acetona, sendo o excesso retirado com água e hidróxido de sódio 0,5 M em álcool etílico, esperou-se secar e em seguida lavou-se com tiosulfato de sódio (10%).

3.10. CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO ENZIMÁTICO BRUTO

O extrato enzimático produzido em meio líquido contendo Solka-Floc Bw 200 como fonte de carbono foi caracterizado quanto ao seu pH e temperatura ótima e de estabilidade. Para tal, foi utilizada a atividade de hidrólise de papel de filtro (PFase) descrita no item 3.7.3.. A constante de Michaelis-Menten (K_m) e velocidade máxima (V_m) foram determinadas para β -glicosidase.

3.10.1. EFEITO DO pH NA ATIVIDADE E ESTABILIDADE DA ENZIMA

A influência do pH na atividade de hidrólise de papel de filtro (determinada conforme descrito no item 3.7.3.), foi verificada utilizando-se tampão acetato 0,05 M na faixa de pH de 3,4 a 5,4 e tampão borato 0,05 M na faixa entre pH 6,0 e 8,0.

A estabilidade da enzima, em função do pH, foi determinada pela atividade residual de hidrólise de papel de filtro, após incubação do extrato enzimático por 1, 6, 8 e 24 horas em solução tampão na faixa de pH de 3,4 a 8,0.

3.10.2. EFEITO DA TEMPERATURA NA ATIVIDADE E ESTABILIDADE DA ENZIMA

O efeito da temperatura sobre a atividade PFase foi verificado determinando-se a atividade enzimática em temperaturas entre 25 e 60°C.

A termoestabilidade foi determinada incubando-se o extrato enzimático em temperaturas na faixa de 25 a 60°C, em períodos de tempo entre 10 minutos e 24 horas. Após a incubação, foi determinada a atividade residual de hidrólise de papel de filtro, conforme descrito no item 3.7.3.

3.10.3. EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE SUBSTRATO NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA β -GLICOSIDASE

O efeito da concentração do substrato na velocidade de reação foi estudado, sob condições ótimas de pH e temperatura, numa faixa de 0,2 a 4 mM de o-nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo (ONPG).

A constante de Michaelis (K_m) e a velocidade máxima (V_{max}) foram calculadas, mediante distribuição dos dados em gráfico de velocidade de reação versus concentração de substrato, de acordo com o método de LINEWEAVER & BURK (1934).

3.11. APLICAÇÃO DO EXTRATO ENZIMÁTICO NA DEGRADAÇÃO DE MATERIAL CELULÓSICO

Foi verificada a ação do extrato enzimático bruto, obtido conforme item 3.6, na degradação de papel jornal e bagaço de cana. Para tal, os substratos foram colocados em erlenmeyers de 500 ml, em concentrações de 5, 10 e 15% em relação ao extrato bruto, o qual foi acrescentado em seguida. Este sistema foi incubado a 55°C. Os açúcares redutores formados foram determinados pelo método do DNS no período de 0 a 24 horas.

Considerando-se a concentração de substrato em relação a enzima que mais produziu açúcares redutores, foi realizado outro ensaio utilizando-se esta concentração por um período de 40 horas.

3.12. PURIFICAÇÃO DA ENZIMA

Foram realizadas duas etapas de purificação, uma cromatografia de troca iônica e uma de filtração em gel. As operações foram realizadas em câmara fria, a 4°C e as frações coletadas com auxílio de um coletor LKB-BROMA.

O fluxo foi de 3,4 ml a cada 10 minutos (quantidade coletada por tubo) para todos os ensaios.

3.12.1. FRACIONAMENTO COM SULFATO DE AMÔNIO

O extrato bruto da enzima (1600 ml), foi saturado a 65%, pela adição lenta de sulfato de amônio (561g/1000 ml) sob agitação constante em banho de gelo. A mistura foi deixada em repouso por 18 horas a 4°C. Após este período, a amostra foi centrifugada a 10000 rpm por 30 minutos, sob refrigeração. O precipitado obtido foi dissolvido em 26 ml de tampão acetato de sódio 0,05M pH 4,8. O sulfato de amônio (Ecibra) utilizado na precipitação da enzima foi retirado desta preparação enzimática por passagem em ultrafiltro AMICON (PM 10).

3.12.2. CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA EM COLUNA DEAE SEPHADEX A-50

A preparação obtida no item anterior foi aplicada (5,0 ml) em coluna DEAE Sephadex A-50 (SIGMA), medindo 2,6x40 cm e previamente equilibrada com tampão acetato de sódio 0,05 M pH 4,8. O complexo enzimático foi eluído com gradiente de NaCl de 0 a 0,2 M. A presença de proteína foi detectada por leitura de cada fração em espectrofotômetro (VARIAN) a 280 nm. As atividades enzimáticas das frações contendo proteína, foram determinadas conforme item 3.7.

3.12.3. DETERMINAÇÃO DO PESO MOLECULAR

As frações componentes dos picos de proteínas obtidos no item anterior foram reunidas e concentradas pela saturação a 65% com sulfato de amônio. O gel Sephadex G100 foi preparado e equilibrado em tampão acetato 0,05 M pH 5,8 em coluna medindo 2,6x56 cm. Foram utilizados os seguintes padrões (SIGMA) com pesos moleculares conhecidos: "blue dextran" (2000 kDa), soroalbumina bovina (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa), quimotripsina (12 kDa) e ribonuclease (15kDa).

A eluição foi realizada com o mesmo tampão utilizado para equilibrar a coluna. Os picos contendo proteína (leitura a 280nm), foram analisados quanto às suas atividades enzimáticas. Os pesos moleculares destas enzimas foram determinados por extrapolação em um gráfico contendo logaritmo dos pesos moleculares dos padrões contra seus K_{av} .

$$K_{av} = \frac{V_e - V_o}{V_t - V_o}$$

Sendo que: K_{av} = fração da fase estacionária que está disponível para a dispersão do soluto.

V_e = volume de eluição para uma dada molécula.

V_o = volume de eluição para o padrão "blue dextran".

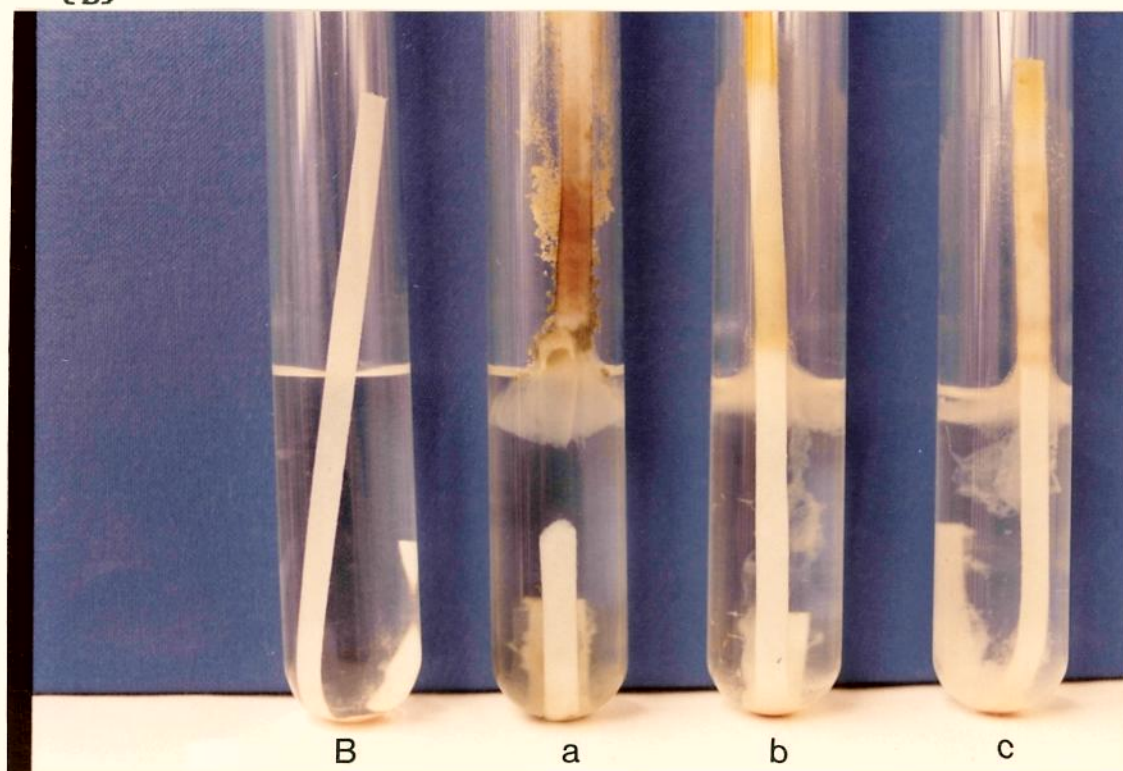
V_t = volume total da coluna.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. ISOLAMENTO E SELEÇÃO DOS MICRORGANISMOS

Foram isolados 626 microrganismos sendo, 254 fungos, 297 bactérias e 75 leveduras. Destes, 70 fungos romperam a fita de papel de filtro em menos de 14 dias (Figura 9). Suas atividades celulolíticas foram testadas após crescimento em meio sólido (farelo de trigo + água 1:1) e foi escolhido o microrganismo que apresentou maior atividade enzimática sobre papel de filtro. O microrganismo escolhido foi denominado de Blu 6.5, e foi isolado de material celulósico em decomposição (folhas, madeiras) na região de Blumenau, Santa Catarina.

FIGURA 9: MICRORGANISMOS Blu 6.5 (a) QM 6A (b) e QM 9414 (c) APÓS 7 DIAS DE CRESCIMENTO EM MEIO SELETIVO, CONTENDO FITA DE PAPEL DE FILTRO, COMPARADOS COM UM MEIO SEM INÓCULO (B)



4.1.1. IDENTIFICAÇÃO DO MICRORGANISMO

O microrganismo escolhido para o trabalho foi identificado no departamento de Botânica da "Universidad de la República - Facultad de Ciencias" Uruguai, como, *Trichoderma longibrachiatum*, conforme RIFAI, 1969.

4.2. MUTAÇÃO

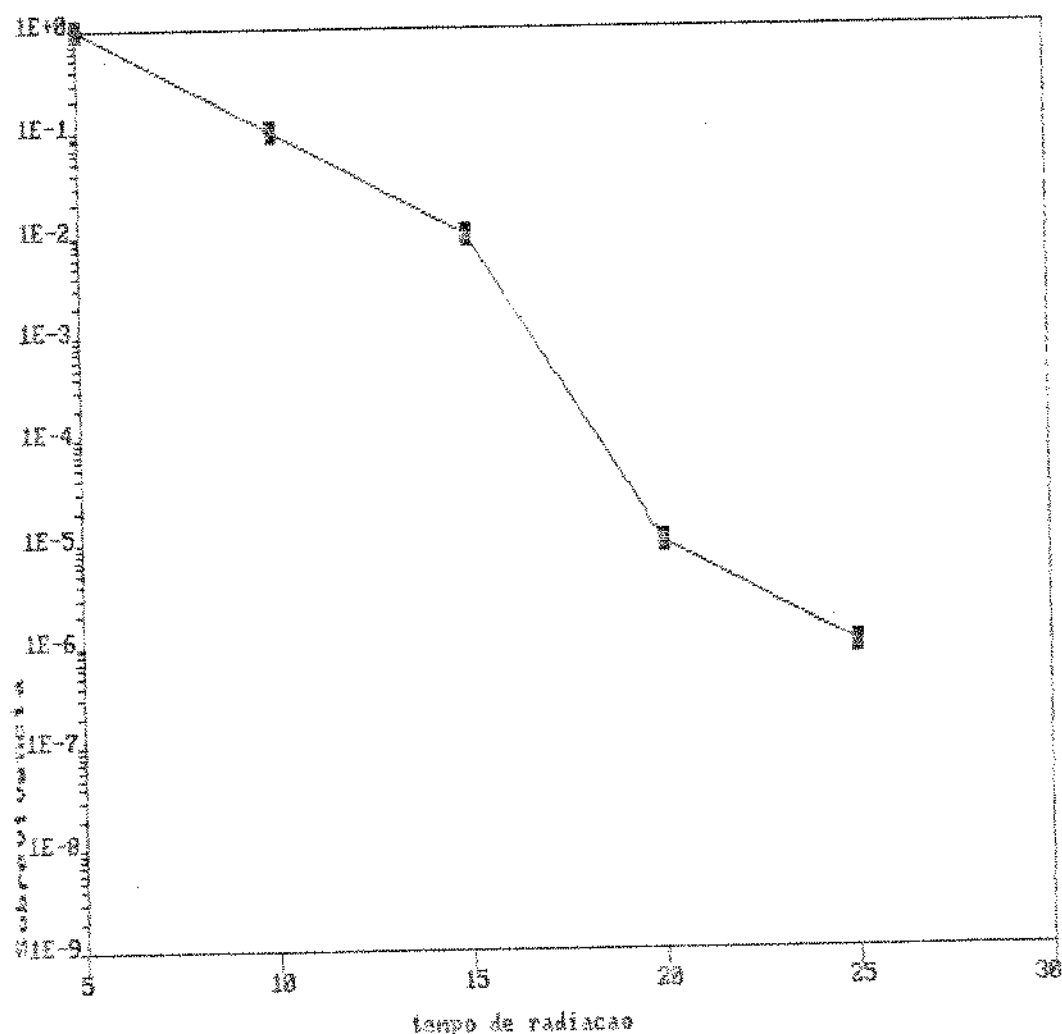
A curva de sobrevivência do microrganismo *T. longibrachiatum* Blu 6.5, onde 10^8 esporos/ml foram expostos a diversos tempos de irradiação por luz ultravioleta, encontra-se representada na Figura 10.

A partir da curva de sobreviventes foi escolhido o tempo de irradiação para os ensaios de mutação, o qual foi de 20 minutos, pois neste intervalo obteve-se uma taxa de sobrevivência de aproximadamente 1% dos microrganismos. Esta taxa de 1%, aumenta a chance de ocorrer alterações a nível de DNA nuclear, ou seja, formação de dímeros de pirimidina entre as bases pirimídicas dos sobreviventes (KAWAMORI *et al.* 1985).

Foram isoladas 558 cepas, as quais apresentaram halo transparente ao seu redor, quando crescidas em meio de isolamento. Após o crescimento destas colônias em farelo de trigo e água (1:1), foram determinadas suas atividades de hidrólise de papel de filtro e avicelase, sendo que a grande maioria das cepas não tiveram suas atividades enzimáticas alteradas

significativamente, nem suas características morfológicas. Duas cepas, denominadas de m_{30} e $m_{45.5}$, apresentaram diferenças morfológicas em relação a cepa selvagem Blu 6.5, principalmente quanto a coloração e consistência dos esporos. Os mutantes apresentaram esporos cinza-claro, muito soltos e finos (similar a pó), enquanto que a cepa selvagem possui esporos de coloração verde-escuro e muito unidos, formando grumos.

FIGURA 10: RELAÇÃO ENTRE A DOSE DE RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA E SOBREVIVÊNCIA DAS COLÔNIAS DE *T. longibrachiatum* (Blu 6.5.)



As atividades enzimáticas obtidas após o crescimento dos mutantes m_{38} e $m_{45.5}$ em farelo de trigo estão descritas na Tabela 4.

TABELA 4 : PRODUÇÃO DE ENZIMAS CELULOLÍTICAS POR MUTANTES DERIVADOS DO *T. longibrachiatum* Blu 6.5

Cepa	Atividade específica (U/mg proteína)	
	PFase	Avicelase
Blu 6.5	0,08	0,06
$m_{45.5}$	0,06	0,03
m_{38}	0,07	0,03

Apesar das enzimas celulolíticas produzidas pelos mutantes, apresentarem atividades enzimáticas mais baixas que a cepa selvagem, os estudos referentes a produção de celulasas pela cepa m_{38} prosseguiram. Quando crescido em meio de isolamento, o mutante m_{38} apresentou um halo grande e transparente ao seu redor indicando sua capacidade de produzir algum tipo de enzima celulolítica. Uma cepa "celulase negativa", isto é, que produz menores quantidades de enzima, pode ser importante em estudos de genética clássica e molecular, para o reconhecimento de um gene que determina a síntese de um determinado tipo de celulase (DURAND et al., 1988).

Durante o programa de mutação do *T. reesei* QM 6a, desenvolvido pelo "Natick U.S. Army Research and Development

Laboratory", foram obtidos alguns mutantes "celulase-negativos" como por exemplo o QM 9136, QM 9977, QM 9979 e QM 9978 (CUSKEY et al., 1981). Estes mutantes foram úteis em estudos posteriores, como é o caso da fusão de protoplastos realizada por TOYAMA e colaboradores onde foram fundidos protoplastos derivados de *T. reesei* QM 9414 e QM 9136, originando um microrganismo que produziu duas vezes mais endoglicanase que o QM 9414 (TOYAMA et al., 1984).

A maior parte dos estudos sobre mutação de microrganismos celulolíticos está relacionada com a repressão catabólica que estas enzimas podem sofrer. Assim, meios seletivos tem sido utilizados contendo repressores catabólicos, tais como glicose e glicerol. MONTENECOURT e EVELEIGH^a (1977), isolaram um mutante do *T. reesei* QM 9414 denominado de NG-14 em meio sólido contendo 5% de glicerol. Este mutante apresentou desrepressão parcial do seu complexo.

4.3. PRODUÇÃO DE CELULASES EM MEIO LÍQUIDO

A produção de celulases em meio líquido foi realizada em meio base contendo fontes de carbono puras ou resíduos celulósicos por 6 dias a 30°C e 150 rpm, conforme descrito no item 3.5.1.

4.3.1. INFLUÊNCIA DA FONTE DE CARBONO

As Tabelas de 5 a 9 mostram os resultados obtidos quando os microrganismos *T. longibrachiatum* (Blu 6.5), seu mutante,

m_{38} , *T. reesei* QM 6a e QM 9414 cresceram em diferentes fontes de carbono puras em meio líquido base (Apêndice, item 3), para a produção de celulases.

As atividades enzimáticas obtidas, não serão comparadas com outros valores da literatura devido a dificuldade nestas comparações. Isto pode ser atribuído aos diferentes tipos de substratos utilizados, sua solubilização, diferentes maneiras de exprimir a atividade enzimática, e a diferença entre os equipamentos utilizados pelos laboratórios, entre muitos outros fatores (MANDELS *et al.* 1976, ENARI & PAAVOLA, 1987).

TABELA 5: ATIVIDADES ENZIMÁTICAS DOS MICRORGANISMOS Blu 6.5, m_{38} , *T. reesei* QM 6a e QM 9414, UTILIZANDO CELULOSE MICROCRISTALINA EM MEIO LÍQUIDO APÓS 6 DIAS DE CRESCIMENTO A 30°C E 150 RPM.

microrganismo	Atividade Enzimática (μ mol produto/ml/min)					Proteína (mg/ml)
	PFase	Avicelase	CMCase	Xilanase	β -gli.	
Blu 6.5	0,37	0,14	0,37	0,60	0,65	1,36
m_{38}	0,09	0,02	0,20	0,39	0,66	0,49
QM 6a	0,16	0,09	0,24	0,56	0,58	0,93
QM 9414	0,35	0,23	0,62	0,66	0,66	1,67

Comparando-se os microrganismos QM 9414 e o Blu 6.5 pode-se observar que os valores das atividades são semelhantes, exceto para CMCase e avicelase, as quais foram superiores para o QM 9414. Em relação ao QM 6a, o microrganismo Blu 6.5 apresentou níveis mais elevados de atividades celulolíticas.

TABELA 6: ATIVIDADES ENZIMÁTICAS DOS MICRORGANISMOS Blu 6.5, m_{98} , *T. reesei* QM 6a E QM 9414, UTILIZANDO CARBOXIMETILCELULOSE EM MEIO LÍQUIDO APÓS 6 DIAS DE CRESCIMENTO A 30°C E 150 RPM

microrganismo	Atividade Enzimática (umol produto/ml/min)					Proteína (mg/ml)
	PFase	Avicelase	CMCase	Xilanase	β -gli.	
Blu 6.5	0,13	0,10	0,33	0,47	0,65	0,62
m_{98}	0,03	0,02	0,17	0,13	0,68	0,43
QM 6a	0,05	0,06	0,10	0,27	0,44	0,12
QM 9414	0,11	0,10	0,20	0,47	0,58	0,18

Observando-se os valores das atividades enzimáticas apresentadas na Tabela 6 podemos observar que considerando a proteína produzida pelo microrganismo QM 9414, suas atividades específicas são superiores as obtidas pelo Blu 6.5. Os microrganismos Blu 6.5 e seu mutante m_{98} , produziram quantidade elevada de proteína após crescimento em carboximetilcelulose,

quando comparados com QM 9414 e QM 6a. Porém, as atividades enzimáticas específicas destes microrganismos foram inferiores.

TABELA 7: ATIVIDADES ENZIMÁTICAS DOS MICRORGANISMOS Blu 6.5, m_{38} , T. reesei QM 6a E QM 9414, UTILIZANDO SOLKA-FLOC BW 200 EM MEIO LÍQUIDO APÓS 6 DIAS DE CRESCIMENTO A 30°C E 150 RPM

microrganismo	Atividade Enzimática (μ mol produto/ml/min)					Proteína (mg/ml)
	PFase	Avicelase	CMCase	Xilanase	β -gli.	
Blu 6.5	0,36	0,15	0,38	1,74	0,65	0,93
m_{38}	0,06	0,04	0,22	0,70	0,58	0,43
QM 6a	0,17	0,06	0,20	0,57	0,58	0,25
QM 9414	0,44	0,18	0,39	0,88	0,60	0,62

As atividades obtidas para o microrganismo Blu 6.5 após crescimento em Solka-Floc BW 200 foram comparáveis as obtidas para o QM 9414 nas mesmas condições de cultivo. Entretanto, a atividade de xilanase foi bem superior para o Blu 6.5.

O microrganismo QM 6a produziu baixo teor de proteína, apresentando assim atividades específicas elevadas.

TABELA 8 : ATIVIDADES ENZIMÁTICAS DOS MICRORGANISMOS Blu 6.5, m_{98} ,
T. reesei QM 6a E QM 9414, UTILIZANDO
 SOLKA-FLOC BW 40 EM MEIO LÍQUIDO APÓS 6 DIAS DE
 CRESCIMENTO A 30°C E 150 RPM

microrganismo	Atividade Enzimática (μ mol produto/ml/min)					Proteína (mg/ml)
	PFase	Avicelase	CMCase	Xilanase	β -gli.	
Blu 6.5	0,33	0,14	0,38	0,64	0,65	0,62
m_{98}	0,08	0,05	0,28	0,91	0,76	0,56
QM 6a	0,21	0,07	0,25	0,71	0,72	0,31
QM 9414	0,52	0,24	0,66	0,64	0,64	0,62

As atividades de xilanase e β -glicosidase foram semelhantes para os microrganismos Blu 6.5 e QM 9414. Estas mesmas atividades foram superiores para o mutante m_{98} , porém, considerando-se as atividades específicas, foram mais elevadas para o microrganismo QM 6a.

TABELA 9: ATIVIDADES ENZIMÁTICAS DOS MICRORGANISMOS Blu 6.5, m_{38} ,
T. reesei QM 6a E QM 9414, UTILIZANDO
 LACTOSE EM MEIO LÍQUIDO APÓS 8 DIAS DE CRESCIMENTO
 A 30°C E 150 RPM

microrganismo	Atividade Enzimática (μ mol produto/ml/min)					Proteína (mg/ml)
	PFase	Avicelase	CMCase	Xilanase	β -gli.	
Blu 6.5	0,20	0,08	0,18	0,60	0,55	1,18
m_{38}	0,02	0,00	0,02	0,84	0,60	0,31
QM 6a	0,04	0,04	0,05	0,48	0,57	0,25
QM 9414	0,13	0,06	0,08	0,31	0,31	0,25

Como pode ser observado na Tabela acima a maioria das atividades enzimáticas determinadas foram superiores para o microrganismo Blu 6.5.. Porém, a quantidade de proteína produzida por este microrganismo foi muito elevada, diminuindo suas atividades específicas. Em termos de atividade específica, o QM 9414 apresentou-se melhor, devido ao baixo teor de proteína produzida por este microrganismo, quando cultivado em meio contendo lactose.

A lactose não demonstrou ser uma boa fonte de carbono para a produção de enzimas com atividade de celulasas, pelos microrganismos utilizados. Porém, a maior atividade de

xilanase foi obtida quando o microrganismo m_{98} utilizou lactose como única fonte de carbono. A cepa selvagem, Blu 6.5 não produziu alta atividade de xilanase quando crescida em lactose. ROYER & NAKAS (1990), os principais estudiosos do *T. longibrachiatum* como produtor de xilanas, obtiveram baixas atividades de xilanase e celulasas quando este microrganismo cresceu em lactose como única fonte de carbono. Entretanto, 0,8% de lactose e 0,2% de xilana, resultou num aumento significativo das atividades de xilanase e celulasas, fato este atribuído a provável indução pela presença de xilana.

A lactose é considerada como um indutor da produção de celulasas por *T. reesei* e portanto, não apresenta bons resultados quando é utilizada como única fonte de carbono, mas sim, quando utilizada em combinação com celulose (ANDREOTTI *et al.* 1980, MANDELS 1982).

Visando aumentar a produção enzimática pela cepa isolada, Blu 6.5, foi utilizado um meio de cultura para produção de celulasas contendo, 0,5% de lactose e 0,5% de Solka-Floc BW 40, e os resultados obtidos estão mostrados na Tabela a seguir.

TABELA 10: ATIVIDADES CELULOLÍTICAS DAS ENZIMAS PRODUZIDAS PELO
MICRORGANISMO Blu 6.5 EM MEIO CONTENDO 0,5% DE LACTOSE
E 0,5% DE SOLKA-FLOC BW 40

Fonte de Carbono	Atividades Específicas (U/mg proteína)				
	PFase	Avicelase	CMCase	Xilanase	β -gli.
lactose + Solka-Floc BW 40	0,15	0,10	0,15	0,96	0,70
Solka-Floc BW 40	0,17	0,07	0,15	0,51	0,47

Os resultados que se encontram na Tabela acima, indicam que a lactose, nesta concentração, não atuou como indutor de celulases para este microrganismo, porém, as atividades de β -glicosidase e xilanase aumentaram significativamente.

Tendo em vista o ótimo crescimento do microrganismo em lactose, utilizou-se soro de leite em pó (74% lactose) como fonte de lactose.

Para se determinar a melhor concentração de soro para produção de celulases pelo microrganismo Blu 6.5, foram utilizadas diversas concentrações de soro no meio, em relação ao seu teor de lactose.

**TABELA 11 : ATIVIDADES ENZIMÁTICAS DO MICRORGANISMO Blu 6.5 EM MEIO
CONTENDO SORO DE LEITE EM PÓ COMO FONTE DE CARBONO APÓS
6 DIAS DE CRESCIMENTO A 30°C E 150 RPM**

Concentra- ção de lac- tose no meio con- tendo soro de leite (%)	Atividade Enzimática (μ mol produto/ml/min)								Proteína (mg/ml)	
	PFase		Avicelase		CMCase		β -glic.			
	a	b	a	b	a	b	a	b		
0,05	0,14	0,19	0,15	0,21	0,11	0,14	0,63	0,85	0,74	
0,10	0,14	0,19	0,15	0,21	0,12	0,16	0,63	0,85	0,74	
0,25	0,29	0,39	0,15	0,21	0,43	0,59	0,67	0,90	0,74	
0,5	0,30	0,41	0,17	0,24	0,45	0,61	0,70	0,94	0,74	
1,0	0,30	0,26	0,17	0,15	0,44	0,39	0,68	0,61	1,12	
1,5	0,23	0,15	0,11	0,08	0,23	0,16	0,60	0,40	1,49	
2,0	0,17	0,07	0,13	0,06	0,19	0,08	0,60	0,25	2,35	
2,5	0,12	0,04	0,09	0,03	0,20	0,06	0,61	0,19	3,12	
3,0	0,17	0,04	0,13	0,03	0,23	0,06	0,70	0,18	3,92	
3,5	0,17	0,04	0,13	0,03	0,23	0,06	0,70	0,18	3,96	
4,0	0,28	0,07	0,20	0,05	0,35	0,09	0,71	0,18	3,96	
4,5	0,28	0,06	0,20	0,04	0,35	0,07	0,71	0,15	4,83	
5,0	0,30	0,04	0,20	0,02	0,46	0,06	0,70	0,09	7,93	
6,0	0,33	0,04	0,19	0,02	0,48	0,05	0,71	0,08	8,67	
10,0	0,33	0,03	0,20	0,02	0,68	0,06	0,71	0,07	10,8	

a: atividade não específica (μ mol produto./ml/min)

b: atividade específica (μ mol produto./min/mg proteína)

Como pode ser observado na Tabela 11, a concentração de lactose (presente no soro) que produziu maiores atividades específicas foi de 0,5%. As atividades foram maiores do que quando as enzimas foram produzidas em lactose pura como fonte

de carbono, e, comparáveis quando utilizou-se Solka-Floc BW 40 para a produção enzimática (Tabela 8).

As atividades específicas e não específicas aumentaram até 0,5% de lactose e diminuíram na faixa de 1,0 a 3,5%, sendo que, as atividades específicas continuaram a diminuir, pois a concentração de proteína aumentou. As atividades não específicas, as quais independem da concentração de proteína, voltaram a aumentar, a partir de 4,0%.

Devido aos altos teores de proteínas, açúcares e sais presentes no soro de leite, o microrganismo Blu 6.5 cresceu muito bem neste meio, aumentando ainda mais o conteúdo protéico do soro. Isto sugere que a proteína produzida pelo microrganismo crescido no soro de leite, poderia ser utilizada como suplemento para alimentação animal, ou mesmo como uma proteína comestível substitutiva para proteína de soja (MANDELS & REESE, 1984).

Com o objetivo de se encontrar uma fonte de carbono, para produção de enzima com alta atividade celulolítica, foram utilizados resíduos celulósicos em meio líquido.

As Tabelas de 12 a 17 mostram os resultados obtidos quando estas fontes alternativas de celulose foram utilizadas pelos microrganismos estudados.

TABELA 12: ATIVIDADES ENZIMÁTICAS DOS MICRORGANISMOS Blu 6.5, m_{38} , *T. reesei* QM 6a e QM 9414, QUANDO CULTIVADOS EM MEIO LÍQUIDO CONTENDO CASCA DE ARROZ COMO FONTE DE CARBONO, POR 6 DIAS A 30°C e 150 RPM

microrganismo	Atividade Enzimática (μ mol produto/ml/min)					Proteína (mg/ml)
	PFase	Avicelase	CMCase	Xilanase	β -gli.	
Blu 6.5	0,05	0,05	0,15	1,05	0,44	0,74
m_{38}	0,04	0,02	0,12	0,72	0,36	0,62
QM 6a	0,04	0,05	0,14	0,77	0,37	0,68
QM 9414	0,06	0,02	0,18	0,95	0,21	0,43

Como pode ser observado na Tabela 12, quando os microrganismos cresceram em casca de arroz para produção de celulasas, as maiores atividades obtidas foram de xilanase, devido provavelmente à presença de hemicelulose (xilana) estar "induzindo" esta atividade. ROYER & NAKAS (1990), observaram a indução de xilanase produzida por *T. longibrachiatum* em presença de xilana ("oat spelts") e oligômeros de xilose. As baixas atividades das celulasas, em geral, produzidas neste resíduo, pode ser devido a presença de lignina (10%) (SHAMALA & SREEKANTIAH, 1987). Uma alternativa para se aumentar a produção de celulasas seria através de um pré-tratamento da casca de arroz para a remoção total ou

parcial da lignina. TANAKA et al. (1979), trataram casca de arroz com NaOH 1% (p/p) para deslignificar o substrato e aumentar sua solubilidade, tornando-o assim, mais suscetível ao microrganismo.

TABELA 13: ATIVIDADES ENZIMÁTICAS DOS MICRORGANISMOS Blu 6.5, m_{38} , *T. reesei* QM 6a E QM 9414, QUANDO CULTIVADOS EM MEIO LÍQUIDO CONTENDO FARELO DE TRIGO COMO FONTE DE CARBONO, POR 6 DIAS A 30°C e 150 RPM

microrganismo	Atividades Enzimática (μ mol produto/ml/min)					Proteína (mg/ml)
	PFase	Avicelase	CMCase	Xilanase	β -gli.	
Blu 6.5	0,04	0,03	0,11	1,23	0,55	0,49
m_{38}	0,05	0,02	0,10	0,90	0,68	0,74
QM 6a	0,02	0,04	0,05	0,44	0,33	0,31
QM 9414	0,06	0,08	0,16	2,36	0,55	0,62

O farelo de trigo apresenta menos lignina (6,0%) que a casca de arroz (SHAMALA & SREEKANTIAH, 1987), o que não promoveu atividades celulolíticas significativamente maiores.

Xilanase apresentou boa atividade pelos microrganismos *T. reesei* QM 9414 e *T. longibrachiatum* (Blu 6.5) quando crescidos neste resíduo.

TABELA 14: ATIVIDADES ENZIMÁTICAS DOS MICRORGANISMOS Blu 6.5, m_{38} , *T.reesei* QM 6a e QM 9414, QUANDO CULTIVADOS EM MEIO LÍQUIDO CONTENDO CASCA DE MANDIOCA COMO FONTE DE CARBONO POR 6 DIAS A 30°C e 150 RPM

microrganismo	Atividade Enzimática (umol produto/ml/min)					Proteína (mg/ml)
	PFase	Avicelase	CMCase	Xilanase	β -gli.	
Blu 6.5	0,09	0,06	0,22	1,33	0,56	0,68
m_{38}	0,09	0,04	0,13	1,12	0,56	0,93
QM 6a	0,07	0,09	0,20	1,44	0,57	0,87
QM 9414	0,21	0,13	0,25	0,97	0,62	0,87

A casca de mandioca foi um bom substrato para produção de celulasas em meio líquido, quando comparado com os outros resíduos utilizados. O microrganismo Blu 6.5, crescido neste meio, apresentou as maiores atividades específicas de xilanase e β -glicosidase, enquanto que, sem considerar o teor de proteína, o QM6a apresentou maior atividade não específica de xilanase e o QM 9414 maior atividade não específica de β -glicosidase.

TABELA 15: ATIVIDADES ENZIMÁTICAS DOS MICRORGANISMOS Blu 6.5, m_{38} , *T. reesei* QM 6a e QM 9414, QUANDO CULTIVADOS EM MEIO LÍQUIDO CONTENDO BAGAÇO DE CANA COMO FONTE DE CARBONO, POR 6 DIAS A 30°C e 150 RPM

microrganismo	Atividade Enzimática (μ mol produto/ml/min)					Proteína (mg/ml)
	PFase	Avicelase	CMCase	Xilanase	β -gli.	
Blu 6.5	0,07	0,04	0,20	1,46	0,58	0,37
m_{38}	0,07	0,03	0,13	0,83	0,58	0,31
QM 6a	0,06	0,03	0,22	0,44	0,57	0,31
QM 9414	0,14	0,07	0,25	1,36	0,56	0,31

Quando os microrganismos utilizados foram cultivados em meio líquido, contendo bagaço de cana como fonte de carbono, as concentrações de proteínas foram baixas, aumentando assim, as atividades enzimáticas específicas.

Os microrganismos Blu 6.5 e QM 9414, apresentaram altas atividades de xilanase quando cultivados neste meio.

RAO *et al.* (1989), utilizaram bagaço de cana tratado com NaOH 16% (p/v) e aquecido a 85°C por uma hora. Este tratamento, aumentou a solubilidade do bagaço em meio líquido e

consequentemente, a produção de enzimas celulolíticas. Isto indica que, a realização de um pré-tratamento no bagaço de cana com o objetivo de diminuir suas regiões cristalinas, poderia aumentar a produção de celulases.

TABELA 16: ATIVIDADES ENZIMÁTICAS DOS MICRORGANISMOS Blu 6.5, m_{38} , *T. reesei* QM 6a e QM 9414, QUANDO CULTIVADOS EM MEIO LÍQUIDO CONTENDO FARINHA DE BABACU COMO FONTE DE CARBONO POR 6 DIAS A 30°C e 150 RPM

microrganismo	Atividade Enzimática (μ mol produto/ml/min)					Proteína (mg/ml)
	PFase	Avicelase	CMCase	Xilanase	β -gli.	
Blu 6.5	0,07	0,07	0,18	1,36	0,60	1,05
m_{38}	0,06	0,06	0,13	0,80	0,58	0,25
QM 6a	0,05	0,03	0,16	1,12	0,57	0,93
QM 9414	0,19	0,10	0,26	1,41	0,60	0,37

A atividade específica de β -glicosidase, apresentada pelo mutante m_{38} , quando cultivado em meio líquido contendo farinha de babaçu como fonte de carbono, foi a mais elevada do que quando qualquer outro resíduo celulósico, foi utilizado em meio sob as mesmas condições. O microrganismo QM 9414 apresentou as demais atividades determinadas superiores aos outros microrganismos.

TABELA 17: ATIVIDADES ENZIMÁTICAS DOS MICRORGANISMOS Blu 6.5, m_{38} , *T. reesei* QM 6a e QM 9414, QUANDO CULTIVADOS EM MEIO LÍQUIDO CONTENDO SERRAGEM COMO FONTE DE CARBONO, POR 6 DIAS A 30°C e 150 RPM

microrganismo	Atividade Enzimática (μ mol produto/ml/min)					Proteína (mg/ml)
	PFase	Avicelase	CMCase	Xilanase	β -gli.	
Blu 6.5	0,05	0,03	0,15	1,28	0,55	0,80
m_{38}	0,04	0,04	0,11	0,90	0,56	1,24
QM 6a	0,02	0,03	0,07	0,94	0,55	1,00
QM 9414	0,05	0,05	0,18	1,12	0,57	0,93

A serragem não apresentou-se como um bom substrato para a produção de celulasas pelos microrganismos estudados, exceto para produção de xilanase pelos microrganismos Blu 6.5 e QM 9414, onde, tanto a atividade específica quanto a não específica foi superior para o microrganismo Blu 6.5.. Deve-se considerar, que nenhum tipo de pré-tratamento foi realizado neste substrato. Existem tratamentos químicos e/ou físicos, discutidos no item 2.5.1., que poderiam facilitar o crescimento dos microrganismos em material lignocelulósico (KNAPPERT *et al.*, 1981).

4.3.2. INFLUÊNCIA DO INÓCULO

A influência do tamanho do inóculo na produção de celulasas pelos microrganismos *Blu 6.5* e *T.reesei* QM 9414 em meio líquido, contendo celulose microcristalina (0,5%) como fonte de carbono, foi verificada na faixa de 10^2 a 10^5 esporos/ml de meio (conforme descrito no item 3.5.1.2) e os resultados podem ser observados na Tabela 18.

TABELA 18: INFLUÊNCIA DO INÓCULO NA PRODUÇÃO DE CELULASES EM MEIO LÍQUIDO CONTENDO CELULOSE MICROCRISTALINA COMO FONTE DE CARBONO POR 6 DIAS A 30°C e 150 RPM

microrganismos	inóculo (esporos/ ml de meio)	Atividades específicas (U/mg proteína)	
		PFase	Avicelase
Blu 6.5	1×10^2	0,11	0,06
	1×10^3	0,10	0,07
	1×10^4	0,14	0,08
	1×10^5	0,16	0,07
QM 9414	1×10^2	0,10	0,07
	1×10^3	0,15	0,10
	1×10^4	0,17	0,10
	1×10^5	0,20	0,13

A maior parte dos estudos encontrados na literatura, sobre produção de celulasas por *T.reesei*, foram realizados utilizando a faixa de inóculo entre 1×10^5 e 4×10^6 (MANDELS & REESE, 1957; UMILE & KUBICEK, 1986; SUH *et al.* 1987).

Como pode ser observado na Tabela 18, a melhor concentração de esporos utilizada nas condições do experimento foi de 1×10^5 esporos/ml de meio, tanto para o QM 9414 quanto para o Blu 6.5.

ROYER & NAKAS (1989) realizaram um estudo da produção de celulases e xilanase pelo *T. longibrachiatum* e constataram que 10^5 esporos/ml foi o melhor inóculo para um meio contendo 1% de Solka-Floc BW 40 como fonte de carbono. O inóculo de 10^7 esporos/ml apresentou um efeito negativo sobre a produção das enzimas, independente da concentração de substrato utilizada. Estes mesmos autores observaram que as diferenças entre as atividades enzimáticas obtidas com inóculo de 10^4 , 10^5 e 10^6 esporos/ml (a 1% de substrato) não foram significativas.

4.3.3. INFLUÊNCIA DO TEMPO DE CULTIVO

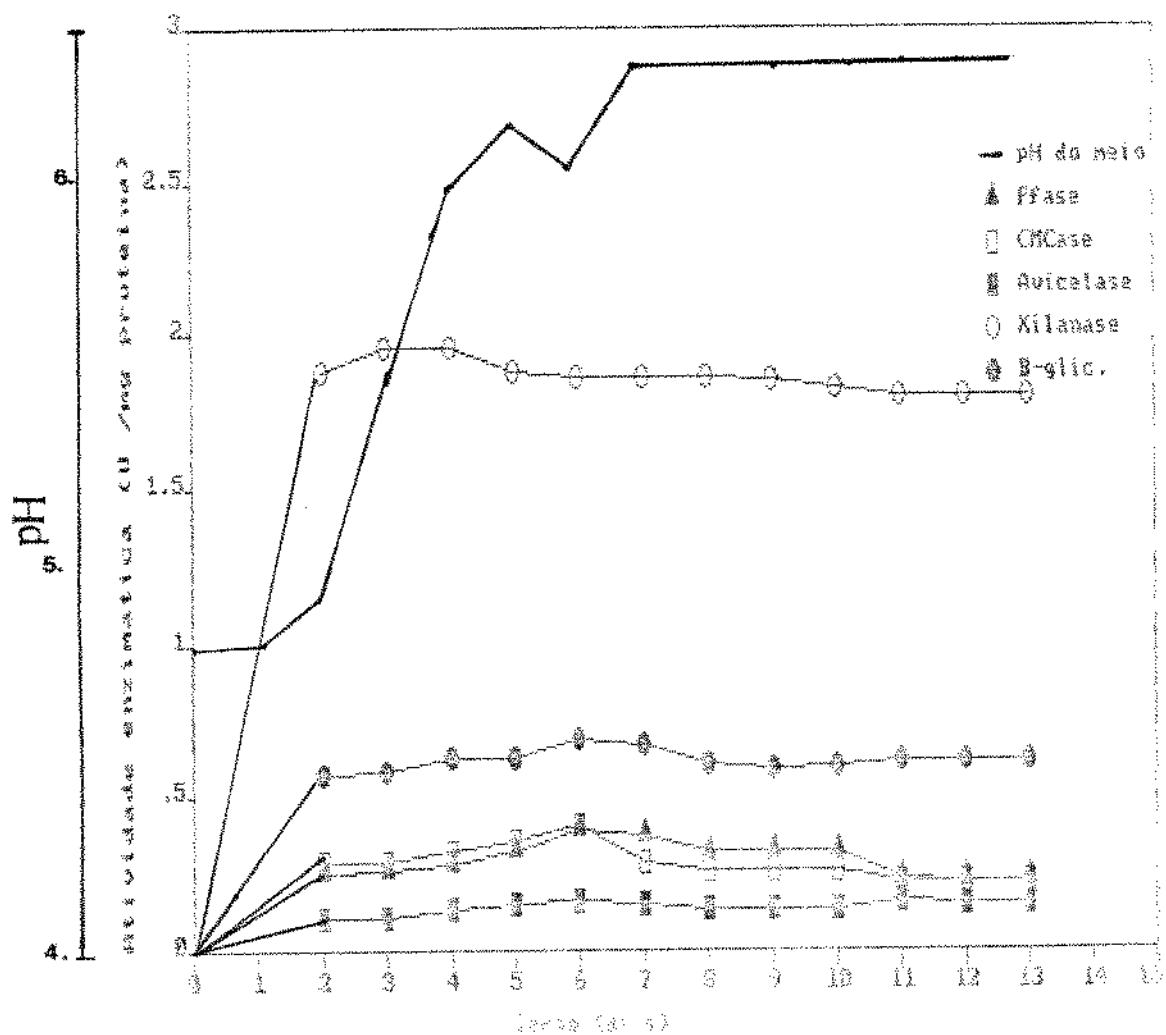
A Figura 11 mostra a relação entre o tempo de cultivo do microrganismo Blu 6.5 em meio líquido, utilizando Solka-Floc BW 200 como fonte de carbono, o pH do meio e as atividades enzimáticas do microrganismo durante o período de zero a 13 dias.

O pH do meio aumentou até o 5º dia de crescimento (de 4,8 para 6,18), decresceu um pouco no 6º dia (6,07) e permaneceu praticamente constante (6,3) após o 7º dia de crescimento. Este comportamento difere do *T. reesei* quando crescido em meio líquido, onde, o pH inicial do meio é, em torno de 5,7 (MANDELS & ANDREOTTI, 1978) e durante o consumo de celulose, o

pH decresce de 5,7 para 3,0, pH no qual a produção enzimática é máxima.

A maior parte dos fungos celulolíticos apresentam comportamento semelhante ao *T. reesei* durante o crescimento, isto é, produzem diminuição do pH do meio. Porém, SOUNDAR & CHANDRA (1988) estudaram a produção de celulases por *Humicola grisea* onde o pH do meio aumentou de 5,0 para 6,9 nas primeiras 100 horas de crescimento, e as maiores atividades celulolíticas, foram obtidas no quarto dia de fermentação, quando o pH do meio estava em torno de 6,9.

FIGURA 11: INFLUÊNCIA DO TEMPO DE CULTIVO DO *T. longibrachiatum* (Blu 6.5) NAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS



Utilizando *T. longibrachiatum*, ROYER & NAKAS (1989), observaram o efeito do pH inicial do meio na produção de celulases e xilanase. Quando o pH inicial esteve entre 4,5 e 6,5, o crescimento do microrganismo resultou num aumento do pH entre 0,5 e 1,2 unidades. Entretanto, não foram observadas alterações significativas no pH durante o crescimento, quando o pH inicial do meio foi acima de 6,5. Porém, a produção enzimática aumentou consideravelmente quando o pH inicial do meio foi modificado para 7,7.

Observando a Figura 11 pode-se verificar que o pH inicial do meio de 4,8, aumentou 1,38 unidades, até o pH máximo obtido, no 5º dia de crescimento do microrganismo Blu 6.5. Segundo ROYER & NAKAS (1989), se o pH inicial do meio fosse aumentado, provavelmente seriam produzidas atividades enzimáticas mais elevadas. As atividades enzimáticas específicas de PFase, CMCase, avicelase e β -glicosidase mais elevadas foram obtidas no 6º dia de fermentação e a de xilanase no 3º e 4º dias. Entretanto, as atividades de avicelase e β -glicosidase tiveram uma pequena queda do 7º ao 10º dia, retornando a aumentar até o 13º dia. Estas oscilações nas atividades enzimáticas durante o crescimento do microrganismo podem ser devido a diversos fatores, tais como:

1) a modificação do pH pode causar inativação de algumas enzimas e estimular a secreção de outras; 2) algumas formas de enzimas podem sofrer a ação proteolítica de outras enzimas preexistentes (proteases); 3) durante o crescimento do microrganismo, estas enzimas podem ser adsorvidas pelos substratos insolúveis e ser

liberadas apenas após a exaustão da celulose (LABUDOVA & FARKAS, 1983).

4.4. PRODUÇÃO DE CELULASES EM MEIO SÓLIDO

Os resíduos celulósicos utilizados no item 4.3.1. para a fermentação líquida foram utilizados para fermentação sólida (conforme item 3.5.2. de Materiais e Métodos) e as atividades das enzimas produzidas foram determinadas sobre papel de filtro e celulose microcristalina como pode ser observado na Tabela 19.

A Tabela 19 mostra que o farelo de trigo: água (1:1) apresentou-se como o melhor substrato para a produção de celulases em meio sólido. A adição de solução de sais a este substrato não foi benéfica com relação a produção enzimática, pois as atividades enzimáticas, de hidrólise de papel de filtro e avicelase, foram reduzidas praticamente pela metade quando foi adicionado solução de sais em vez de água a este substrato.

MADAMWAR et al. (1989) obtiveram um aumento de 30 a 80% na produção de celulases por *A. niger* em meio sólido com relação a produção em meio líquido, utilizando resíduos celulósicos como substrato. Comparando-se as atividades enzimáticas específicas obtidas em meio líquido contendo farelo de trigo como fonte de carbono (Tabela 13), com as obtidas quando as

TABELA 19: ATIVIDADES ENZIMÁTICAS ESPECÍFICAS DOS MICRORGANISMOS CULTIVADOS RESÍDUOS CELULÓSICOS E ÁGUA OU SAIS, COM 5 DIAS DE CRESCIMENTO A 30°C

Meio de Cultura	microorga- nismos	Atividades específicas (U/mg proteína)			
		a		b	
Sólido		PFase	Avicelase	PFase	Avicelase
Farelo de trigo + água ou + solução de sais (1:1)	1	0,50	0,32	0,16	0,16
	2	0,69	0,38	0,32	0,16
	3	0,55	0,32	0,23	0,16
	4	0,94	0,66	0,32	0,24
Casca de man- dioca + água ou + solução (1:1)	1	0,04	0,00	0,13	0,00
	2	0,03	0,00	0,03	0,00
	3	0,04	0,02	0,05	0,02
	4	0,00	0,00	0,03	0,00
Bagaço de cana + água ou + solu- ção de sais (1:2)	1	0,04	0,00	0,06	0,03
	2	0,04	0,00	0,06	0,00
	3	0,04	0,00	0,07	0,00
	4	0,04	0,00	0,05	0,04
Farinha de babaçu + água ou + solução de sais (1:1)	1	0,04	0,04	0,03	0,03
	2	0,04	0,04	0,03	0,02
	3	0,08	0,04	0,05	0,05
	4	0,08	0,05	0,06	0,03
Serragem + água ou + solução de sais (1:2)	1	0,04	0,03	0,06	0,11
	2	nc	nc	0,04	0,06
	3	0,04	0,03	0,05	0,02
	4	nc	nc	nc	nc

. microrganismos 1) *T. longibrachiatum* Blu 8.5.; 2) mutante m₉₈
3) *T. reesei* QM 6a; 4) *T. reesei* QM 9414

. a resíduo celulósico + água
. b resíduo celulósico + sais

. nc = não houve crescimento

. Observação: os microrganismos não cresceram em casca de arroz e água. Quando foi adicionada solução de sais em lugar de água, os microrganismos cresceram pouco e praticamente não apresentaram atividades celulolíticas.

enzimas foram produzidas em meio sólido contendo a mesma fonte de carbono, pode-se observar que a enzima produzida em meio sólido apresentou atividades muito superiores que as enzimas produzidas pelo microrganismo Blu 8.5. em meio líquido. Porém, os demais resíduos celulósicos (casca de mandioca, bagaço de cana, farinha de babaçu e serragem) foram melhor utilizados como substrato para produção enzimática, quando em meio líquido .

O microrganismo *T.reesei* QM 9414 não produziu PFase e avicelase quando crescido em casca de mandioca o que não era esperado uma vez que este mesmo microrganismo é utilizado na sacarificação da mandioca (MENEZES et al., 1978). Entretanto, a casca da mandioca pode apresentar alguma substância que tenha dificultado o crescimento do microrganismo *T.reesei* QM 9414.

Quando os microrganismos foram inoculados em bagaço de cana ou serragem:água (1:1), não houve crescimento, por este motivo a quantidade de água e solução de sais foi duplicada (1:2) em relação ao substrato, o que não promoveu aumento significativo na produção enzimática.

Em serragem, o microrganismo *T.reesei* QM 9414 não cresceu quando água ou solução de sais foi adicionada. O mutante m_{38} também não apresentou crescimento em serragem:água (1:2) e, as atividades enzimáticas de todos os microrganismos utilizados foram baixas quando crescidos neste substrato.

As baixas atividades enzimáticas obtidas pelo crescimentos dos microrganismos em resíduos celulósicos pode ser devido a presença de lignina nestes materiais. A realização de um tratamento químico e/ou físico dos materiais celulósicos, como por exemplo, utilização de bases (NaOH 5M ou Ca(OH)_2 2%) ou trituração em moinho poderiam ser úteis na deslignificação, aumentando assim, a susceptibilidade dos substratos aos microrganismos (MADAMWAR *et al.* 1989).

4.5. APLICAÇÃO DO EXTRATO ENZIMÁTICO BRUTO NA DEGRADAÇÃO DE MATERIAL CELULÓSICO

Com o objetivo de se determinar a melhor concentração de substrato para a aplicação do extrato enzimático bruto foi realizado um ensaio preliminar a 55°C , onde foram utilizadas concentrações de 5, 10 e 15% de papel jornal ou bagaço de cana em relação ao extrato enzimático. A concentração de açúcares redutores foi determinada em diversos períodos de tempo (entre 0 e 24 horas), e os resultados podem ser verificados na Tabela 20.

A maior produção de açúcares redutores, foi obtida com a concentração de 10% de substrato em relação ao extrato enzimático bruto. Esta concentração foi então utilizada em um ensaio pelo período de 40 horas a 55°C . A concentração de açúcares

TABELA 20: CONCENTRAÇÃO DE AÇÚCARES REDUTORES (g/l) PRODUZIDOS PELA
AÇÃO DO EXTRATO ENZIMÁTICO BRUTO EM BAGAÇO DE CANA E
PAPEL JORNAL EM CONCENTRAÇÕES DE 5, 10 E 15%

tempo (horas)	bagaço de cana %			papel jornal %		
	5	10	15	5	10	15
Concentração de açúcares redutores (g/l)						
0	0,04	0,04	0,05	0,08	0,08	0,08
2	0,45	0,69	0,69	0,98	1,40	1,52
4	0,69	1,07	1,07	1,52	2,43	2,33
8	0,69	1,60	1,07	3,13	4,37	4,16
10	0,40	1,19	0,49	4,04	5,36	4,45
12	0,30	0,94	0,30	4,04	5,37	4,66
24	0,20	0,28	0,22	4,71	6,36	4,72

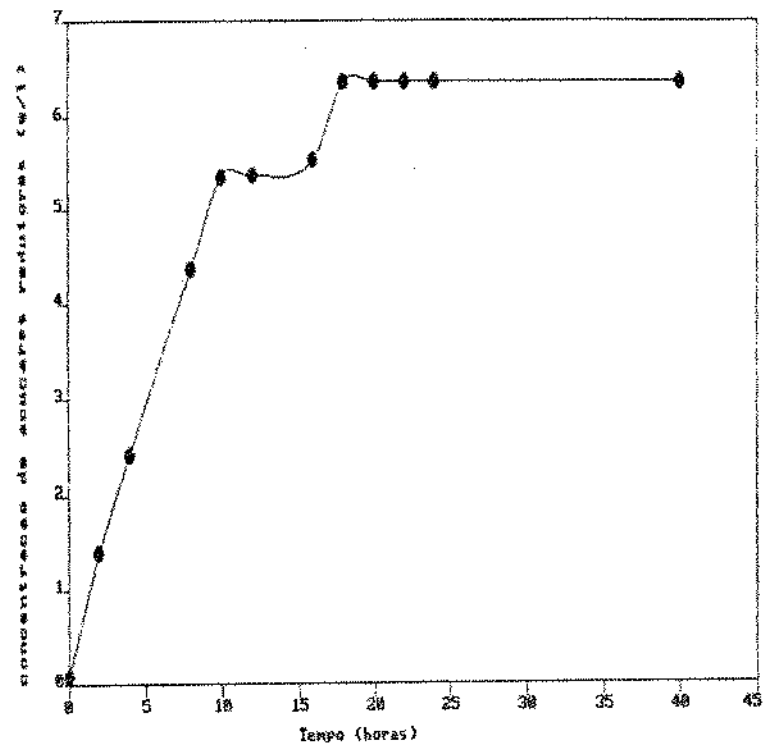
redutores produzidos foi determinada durante este intervalo e pode ser observada na Figura 12 (a e b).

Os estudos relacionados com celulasas, em sua maior parte, objetivam a sua utilização na conversão de resíduos celulósicos à açúcares fermentáveis, os quais podem ser utilizados para gerar fontes energéticas alternativas.

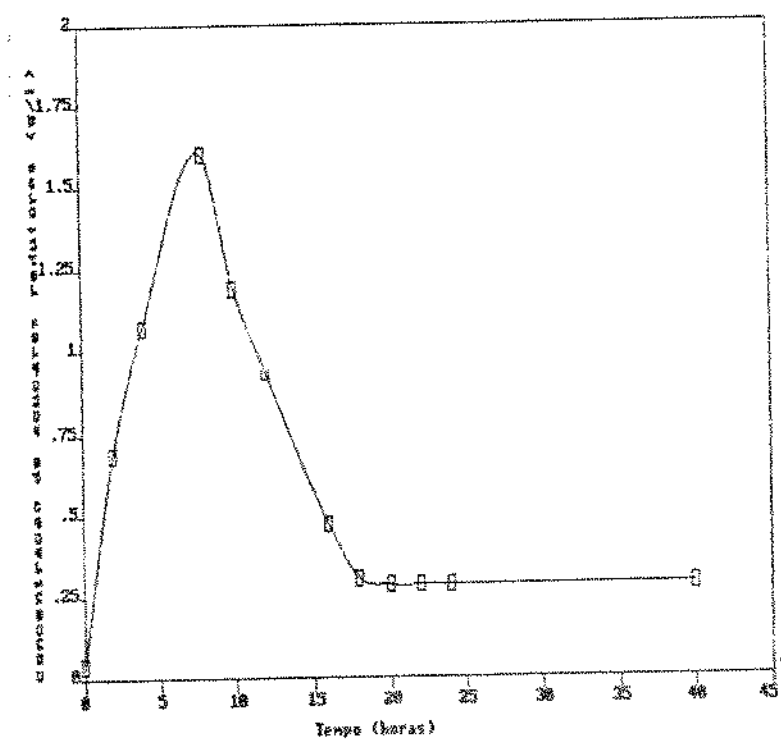
Nos Estados Unidos existem programas que visam a utilização de lixos municipais para produção de álcoois, via microrganismos (BARRIER, 1991). No Brasil, seria interessante o aproveitamento de resíduos agroindustriais para produção de açúcares, principalmente a partir de bagaço de cana, devido a

FIGURA 12: CONCENTRAÇÃO DE AÇÚCARES REDUTORES (g/l) PRODUZIDOS PELA
AÇÃO DO EXTRATO ENZIMÁTICO BRUTO EM CONCENTRAÇÃO DE 10%
EM PAPEL JORNAL (a) E BAGAÇO DE CANA (b)

a) Papel Jornal



b) Bagaço de cana



grande quantidade deste resíduo produzido pelas indústrias de açúcar e álcool. O papel jornal, não pode ser considerado como resíduo agroindustrial, mas representa uma parte significativa dos lixos municipais e portanto também pode ser aproveitado na produção de açúcares fermentáveis.

No experimento realizado, conforme Figura 12, a produção de açúcares redutores foi maior quando utilizou-se papel jornal do que quando bagaço de cana foi utilizado como substrato. A relativa facilidade da enzima em degradar papel jornal pode ser explicada pela celulose do papel jornal estar mais acessível ao ataque enzimático do que a celulose do bagaço de cana. A acessibilidade pode ser devido ao tratamento do papel jornal durante sua manufatura, alterando a barreira de lignina e tornando a celulose mais acessível ao ataque enzimático.

A concentração de açúcares redutores mais elevada, 6,36 g/l, foi observada com 18 horas de reação enzimática sobre o papel jornal, a qual permaneceu constante até 40 horas de reação.

A máxima concentração de açúcares redutores obtida através da ação enzimática sobre o bagaço de cana foi 1,60 g/l em 8 horas de reação. Após este período, a concentração de açúcares diminuiu para 0,28 g/l em 20 horas de reação, permanecendo constante até o término do ensaio. Esta redução na concentração de açúcares redutores, após 8 horas de ação enzimática sobre o bagaço de cana pode ser observado na Figura 12 (b) e poderia ser

explicada pela presença de lignina e por reações de transglicosilação. A lignina e a celulose na forma cristalina, presentes no bagaço de cana, podem adsorver as celulasas impedindo-as de atuarem sobre o substrato (CHERNOGLAZOV *et al.*, 1988, STEINER *et al.*, 1988), enquanto que, a β -glicosidase, presente no extrato enzimático bruto, transfere unidades de glicose para outros açúcares (MANDELS, 1982) formando açúcares não redutores que não são detectados pelo método de D.N.S.

MANDELS *et al.* (1981), observaram a importância da estabilidade e a inibição enzimática pelo produto formado na utilização de enzimas celulolíticas. A aplicação do extrato enzimático bruto sobre os resíduos celulósicos para produção de açúcares foi realizada a 55°C, temperatura ótima para a atividade enzimática. Entretanto, após um período de 24 horas, sob esta temperatura, a enzima perdeu 56% de sua atividade, conforme foi observado no item 4.6. Outro fator importante, é que a glicose formada pode ter inibido a ação da β -glicosidase, enquanto que a celobiose pode inibir tanto a ação da endo quanto da exoglicanase (MANDELS, 1982). Assim, a produção de açúcares redutores, a partir de bagaço de cana e papel jornal, pode ter sido prejudicada pela perda da estabilidade enzimática, após longos períodos a 55°C, e, pela inibição pelos produtos formados.

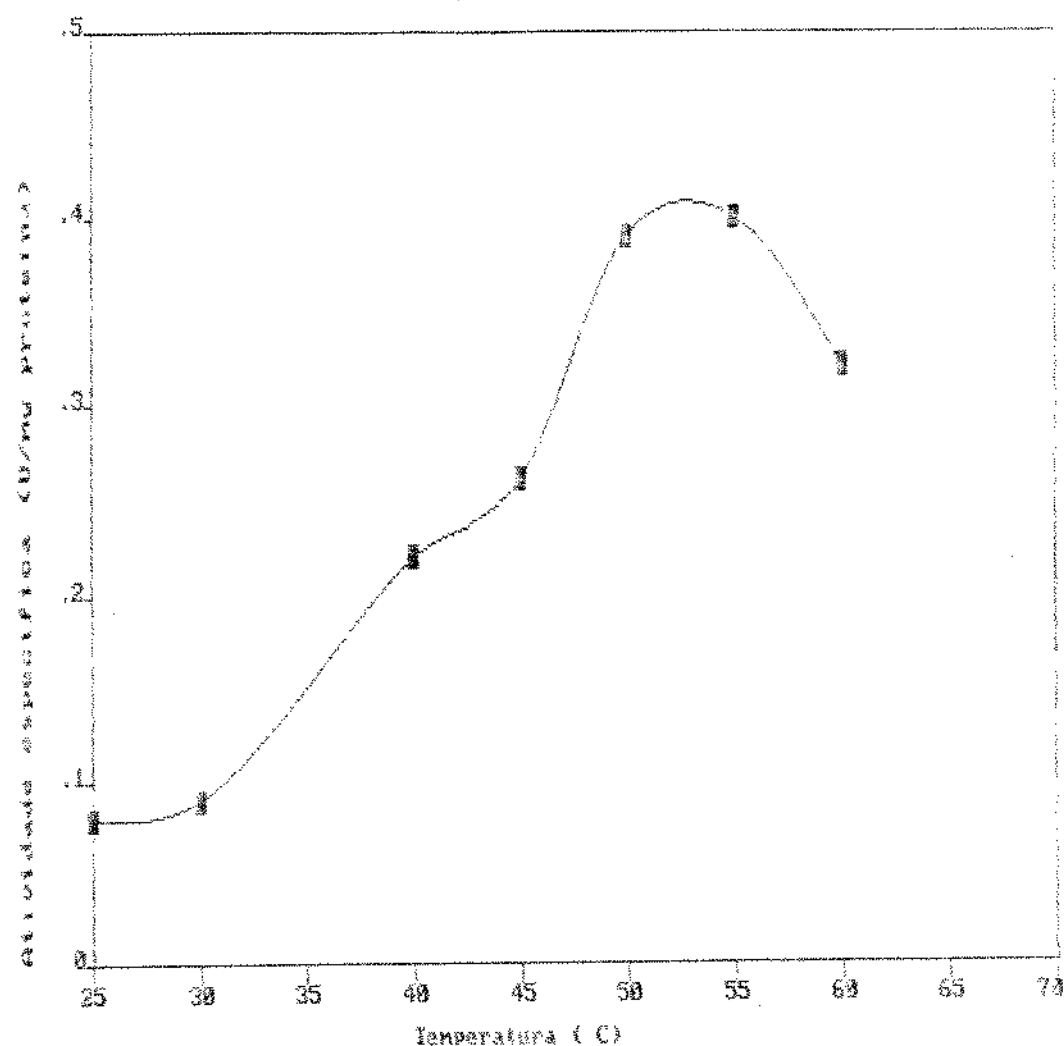
4.6. EFEITO DA TEMPERATURA NA ATIVIDADE E ESTABILIDADE DA ENZIMA

O efeito da temperatura sobre a atividade e estabilidade enzimática é muito importante quando se considera a utilização desta enzima. A temperatura ótima e de estabilidade varia de acordo com o microrganismo que produz a enzima, e suas, condições de cultivo.

A Figura 13, indica a temperatura ótima de atividade das celulasas produzidas pelo microrganismo isolado, *T. longibrachiatum* (Blu 6.5.), representada pela atividade de hidrólise de papel de filtro. Assim, a temperatura onde obteve-se a atividade máxima foi 55°C, a qual mostrou-se um pouco superior a temperatura ótima de atividade das celulasas de *T. reesei* que é 50°C (MANDELS, 1981).

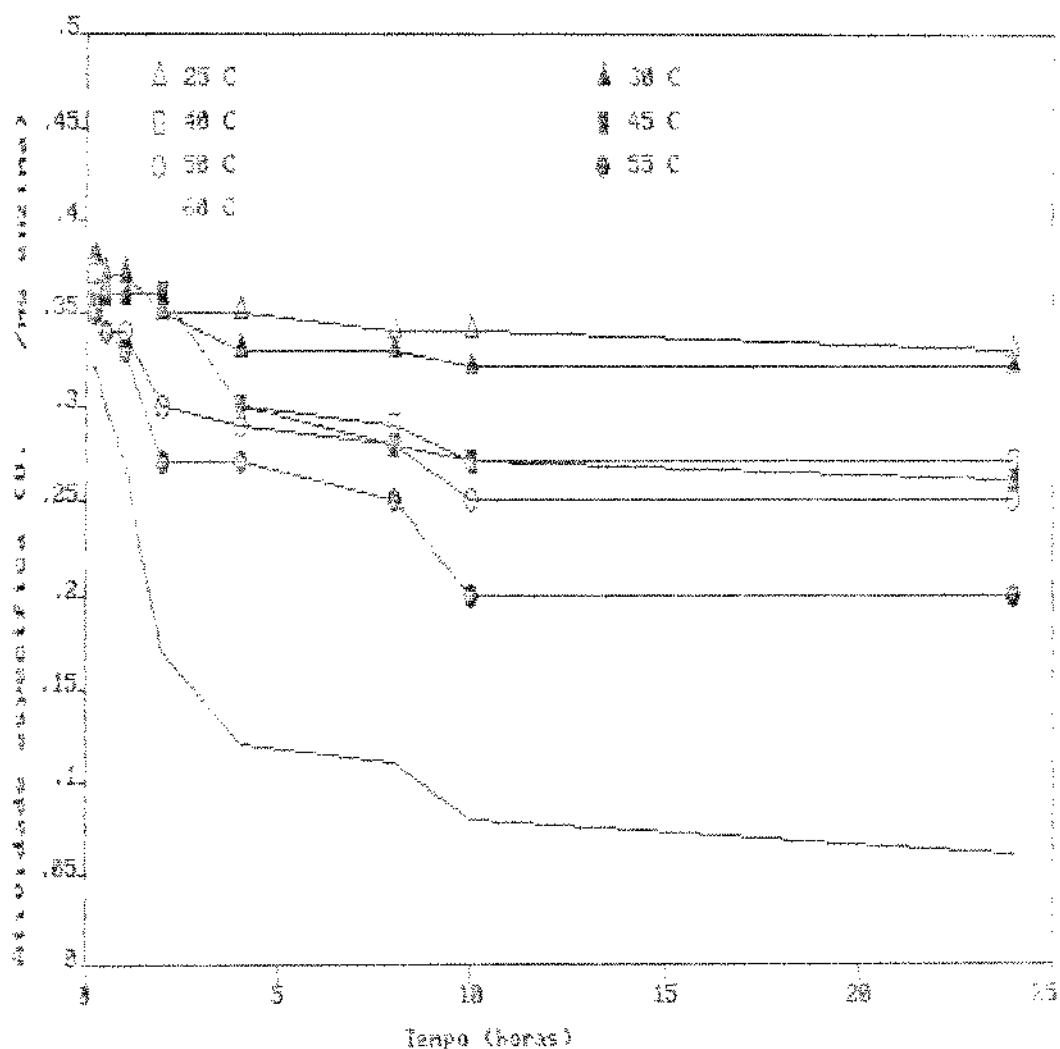
Existem celulasas que possuem atividade máxima a temperaturas elevadas, como é o caso de uma carboximetilcelulase e uma avicelase da bactéria *C. stercorarium*, para as quais, a temperatura ótima é em torno de 90°C (BRONNENMEIER & STAUDENBAUER 1990). Em estudos de caracterização de celulasas de *Eupenicillium javanicum* a temperatura ótima obtida foi de 55°C (TANAKA et al., 1981).

FIGURA 13: DETERMINAÇÃO DA TEMPERATURA ÓTIMA PARA ATIVIDADE DAS CELULASES DE *T. longibrachiatum* (Blu 6.5.)



A Figura 14 mostra a termoestabilidade do extrato enzimático produzido pelo *T. longibrachiatum* isolado. A atividade de hidrólise de papel de filtro foi determinada após incubação da enzima a temperaturas na faixa de 25 a 60°C, por períodos de 10 minutos a 24 horas.

FIGURA 14: EFEITO DA TEMPERATURA SOBRE A ESTABILIDADE DAS CELULASES DE *T. longibrachiatum* (Blu 6.5).



A atividade celulolítica permaneceu praticamente constante quando a enzima foi submetida às temperaturas de 25 e 30°C por 1 hora, porém, pelo período de 24 horas a estas mesmas temperaturas a enzima diminuiu sua atividade de hidrólise de papel de filtro em 17,2%.

Não houve diferença significativa entre a estabilidade da enzima às temperaturas de 40 e 45°C, sendo que a enzima perdeu 10,8% de sua atividade após uma hora de incubação, e 33% após 24 horas de incubação a estas temperaturas.

Aumentando-se a temperatura, a estabilidade da enzima diminuiu, sendo que, após incubação por 10 minutos a 60°C, sua atividade foi reduzida em 17,8%, e, em 24 horas de incubação a esta mesma temperatura, a enzima perdeu 84,7% de sua atividade de hidrólise de papel de filtro.

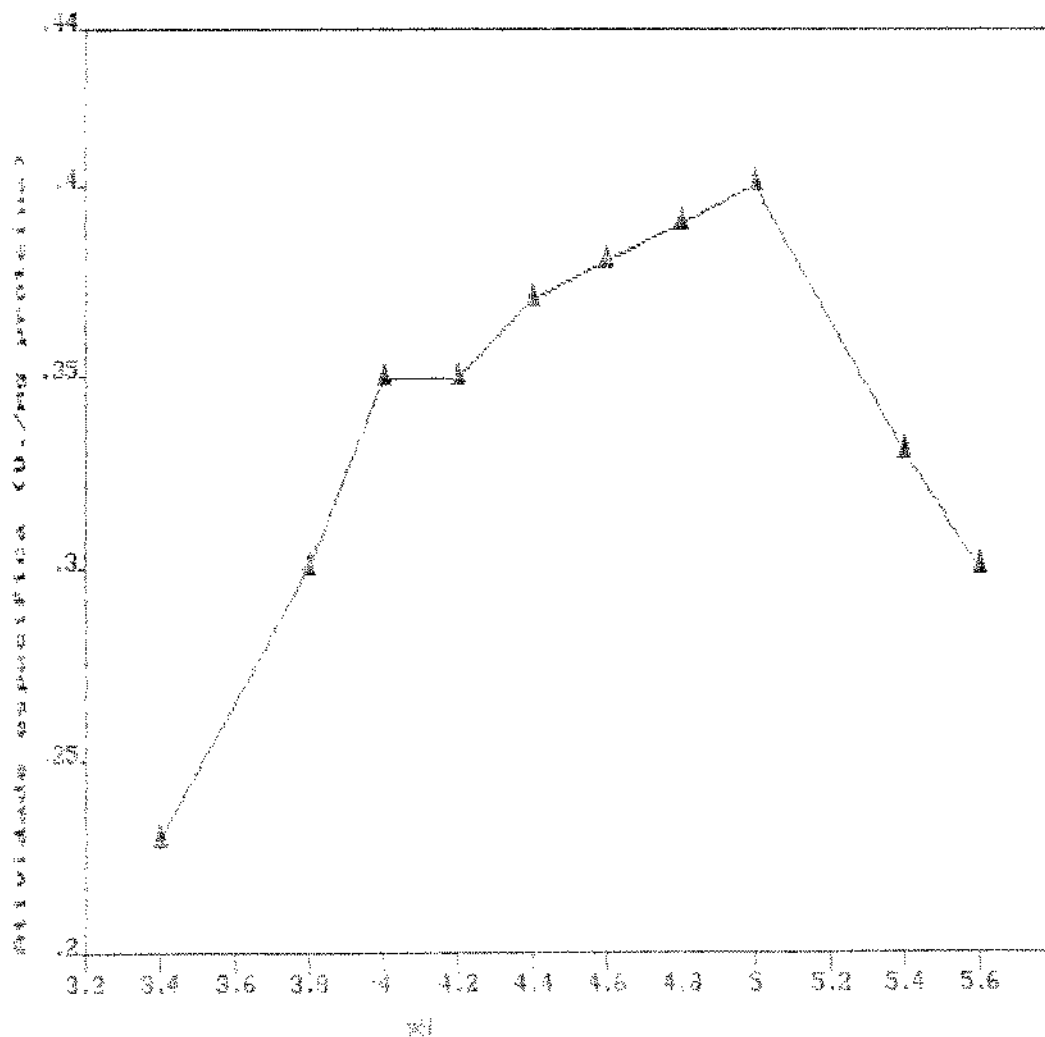
A estabilidade da enzima ao calor por longos períodos é muito importante quando se deseja aplicá-la em processos industriais a altas temperaturas, como por exemplo, em processos de sacarificação do material celulósico.

Neste sentido, foram estudadas duas avicelases de *A. aculeatus* que mostraram-se estáveis por 10 minutos acima de 50°C (ARAI et al. 1987), enquanto que, uma avicelase de *C. stercorarium* mostrou-se estável por vários dias a 60°C (BRONNENMEIER & STAUDENBAUER, 1990).

4.7. EFEITO DO pH NA ATIVIDADE E ESTABILIDADE DA ENZIMA

Na Figura 15 está representado o pH ótimo para a atividade de hidrólise de papel de filtro. A atividade máxima foi encontrada quando a reação enzimática foi realizada numa faixa de pH entre 4,6 e 5,0. Porém, quando o pH da reação foi elevado para 5,4 e 5,6, a atividade enzimática diminuiu 17,5 e 25,0% respectivamente, em relação ao valor da atividade a pH 5,0.

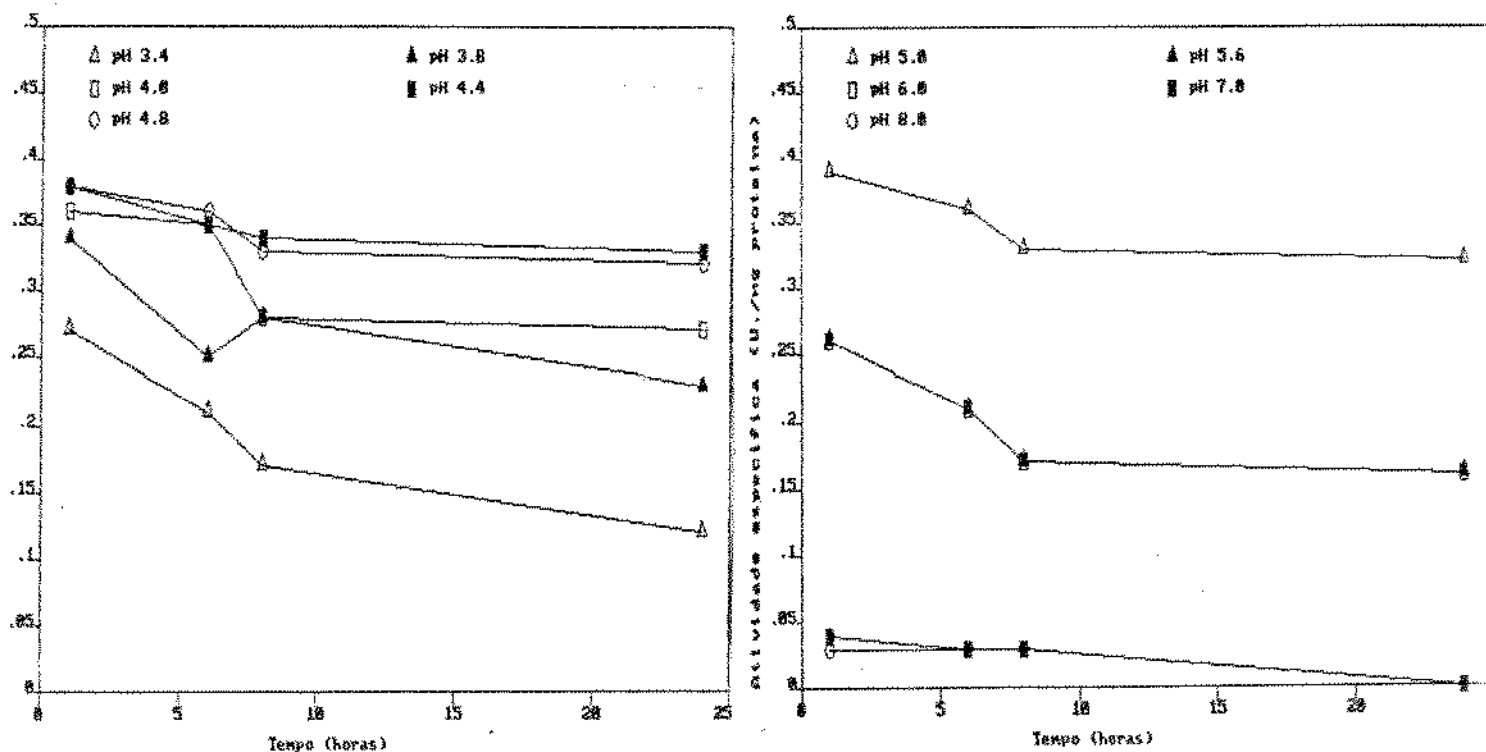
FIGURA 15: EFEITO DO pH NA ATIVIDADE DAS CELULASES DE *T. longibrachiatum* (Blu 6.5)



A Figura 16, representa o efeito do pH na estabilidade da enzima. O extrato enzimático bruto foi submetido a variações de pH entre 3,4 e 8,0 e, as atividades de hidrólise de papel de filtro determinadas periodicamente, entre 1 e 24 horas. De acordo com os resultados obtidos, as celulasas presentes no extrato enzimático são mais estáveis na faixa de pH entre 4,4 e 5,0, onde, após 24 horas de incubação conservaram aproximadamente 87% de sua atividade inicial. As celulasas mostraram-se mais estáveis quando incubadas em valores de pH abaixo de 5,0, do que quando entre pH 5,6 e 8,0. Quando o extrato enzimático foi incubado por 1 hora a pH 5,6 e 6,0 sua atividade enzimática foi 31,6% mais baixa em relação a atividade da enzima incubada a pH 5,0 pelo mesmo período de tempo. Aumentando-se a faixa de pH para 7,0 e 8,0 a enzima apresentou-se totalmente instável, praticamente não exibindo atividade após 1 hora de incubação neste intervalo de pH.

Relacionando-se os resultados obtidos, do efeito do pH sobre a atividade e estabilidade enzimática, com a literatura, pode-se observar que as celulasas fúngicas, principalmente as produzidas pelo *T. reesei* possuem o pH ótimo entre 4,8 e 5,0 (MANDELS, 1981). A atividade máxima de hidrólise de celulose microcristalina por celulase de *S. thermophile* foi obtida entre pH 4,0 e 5,0 (FRACHEBOUD & CANEVASCINI, 1989) enquanto que, para celulase de *E. javanicum* o pH ótimo de hidrólise foi entre 5,0 e 5,5 (TANAKA *et al.* 1981).

FIGURA 16: EFEITO DO pH NA ESTABILIDADE DAS CELULASES DE *T. longibrachiatum* (Blu 6.5)



Existem casos específicos, onde as celulases produzidas por alguns microrganismos apresentam valores extremos de pH ótimo e pH de estabilidade. ARAI et al., (1987), caracterizaram uma avicelase de *A. aculeatus* a qual apresentou pH ótimo de 2,4 e estabilidade em pH ácido por 24 horas. Por outro lado, SHIKATA et al. (1990) isolaram uma cepa de *Bacillus* alcalofílico capaz de produzir celulases com pH ótimo entre 8,5 e 9,5 as quais podem ser utilizadas como aditivo para aumentar a eficiência de produtos detergentes.

4.8. EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DO SUBSTRATO NA ATIVIDADE DE β -GLICOSIDASE

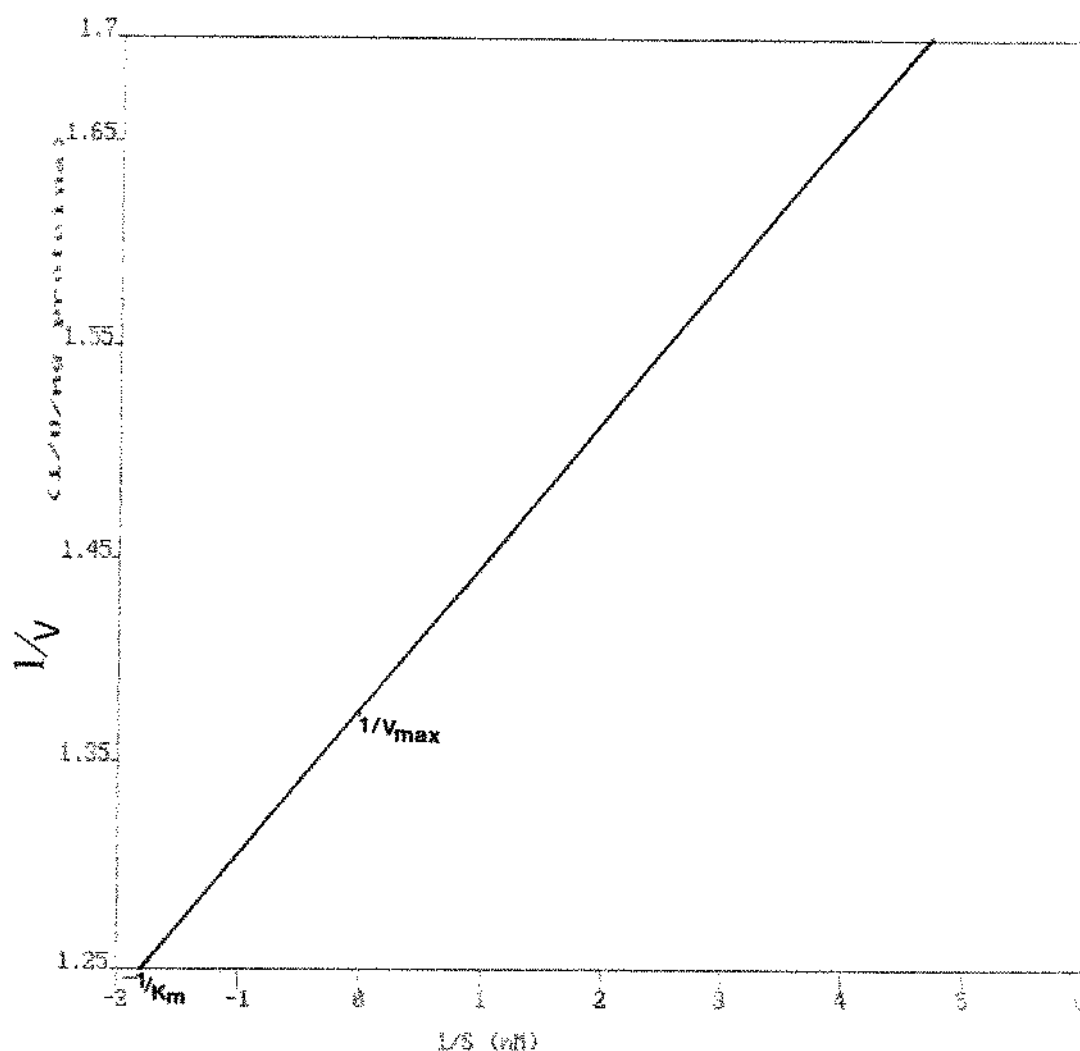
O efeito da concentração do substrato, o-nitrofenil- β -D-glicosídeo (ONPG), determinado de acordo com as condições descritas no item 3.10.3., está ilustrado na Figura 17.

A constante de Michaelis-Menten (K_m) e a velocidade máxima (V_{max}) foram determinados de acordo com o sistema gráfico de Lineweaver-Burk.

Os valores obtidos para K_m e V_{max} segundo a Figura 17 foram $0,52 \times 10^{-3}$ M e $0,73$ μ mol açúcar redutor/min/mg de proteína.

WILSON & NIEDERPRUEM (1967) obtiveram um K_m de $0,33 \times 10^{-3}$ M para β -glicosidase de *Schizophyllum commune*, utilizando ONPG como substrato. O K_m para a β -glicosidase intracelular de *T. reesei* está em torno de $0,9$ a $3,3 \times 10^{-3}$ M e para a extracelular é de $1,5$ a $2,6 \times 10^{-3}$ M quando celobiose foi utilizada como substrato (MANDELS, 1982).

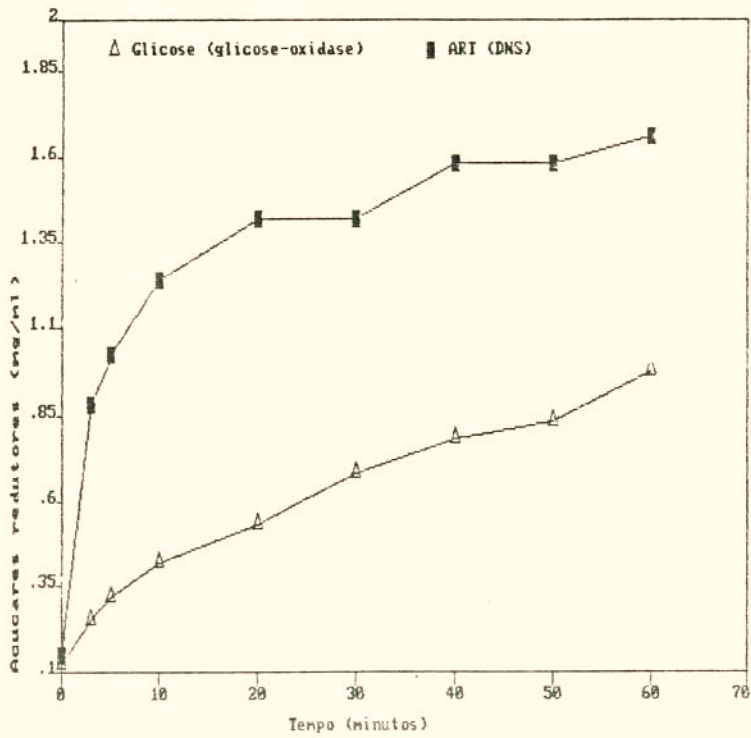
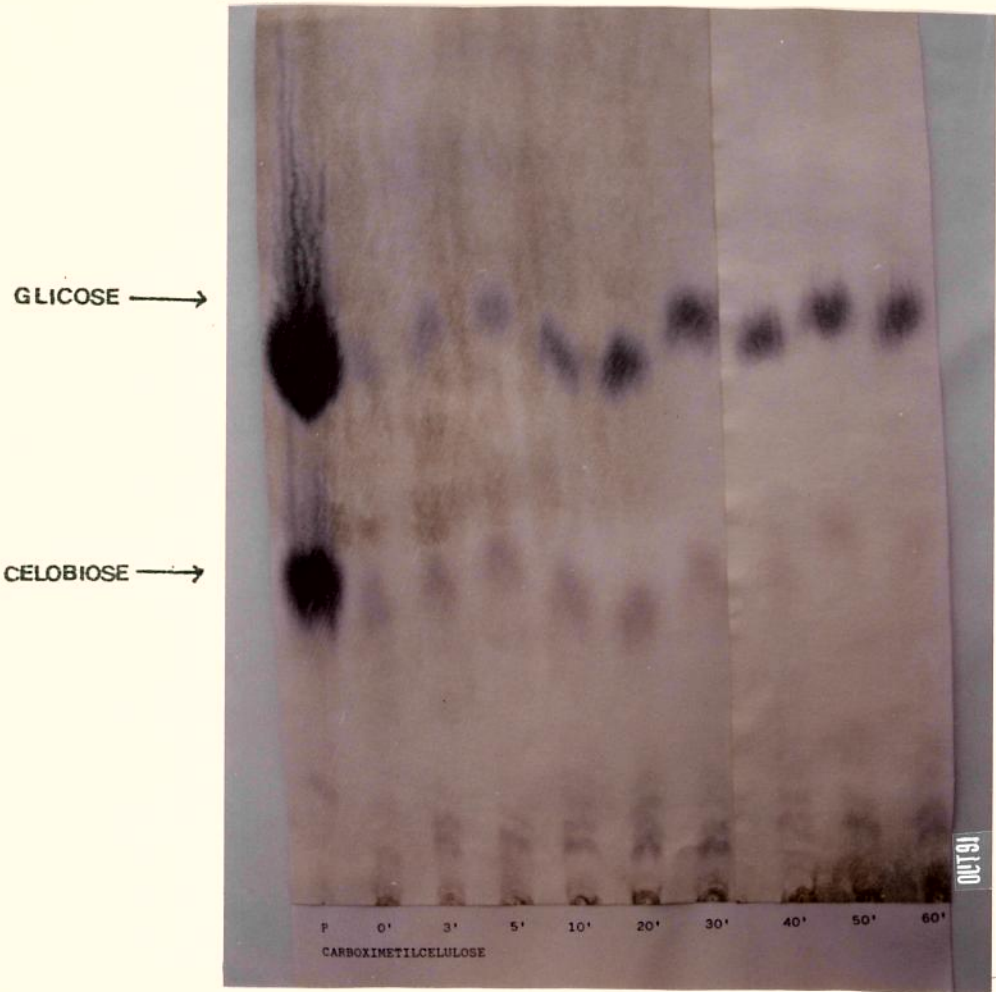
FIGURA 17: EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE O-NITRO- β -D-GLICOSÍDEO NA ATIVIDADE DE β -GLICOSIDASE



4.9. MODO DE AÇÃO DAS ENZIMAS CELULOLÍTICAS

Este ensaio foi realizado com o objetivo de verificar o modo de ação do extrato enzimático bruto sobre dois substratos celulósicos: carboximetilcelulose e celulose microcristalina. Para tal, foram utilizados dois métodos de determinação de açúcares, o do D.N.S. o qual determina açúcares redutores totais e o método da glicose-oxidase, específico para glicose.

FIGURA 18: AÇÃO DO EXTRATO ENZIMÁTICO BRUTO SOBRE CARBOXI METILCELULOSE

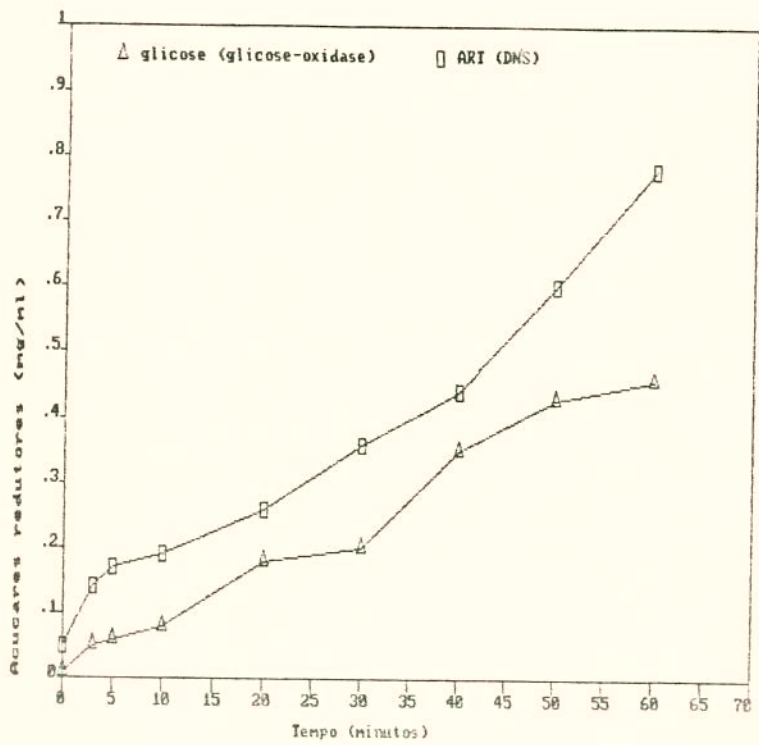
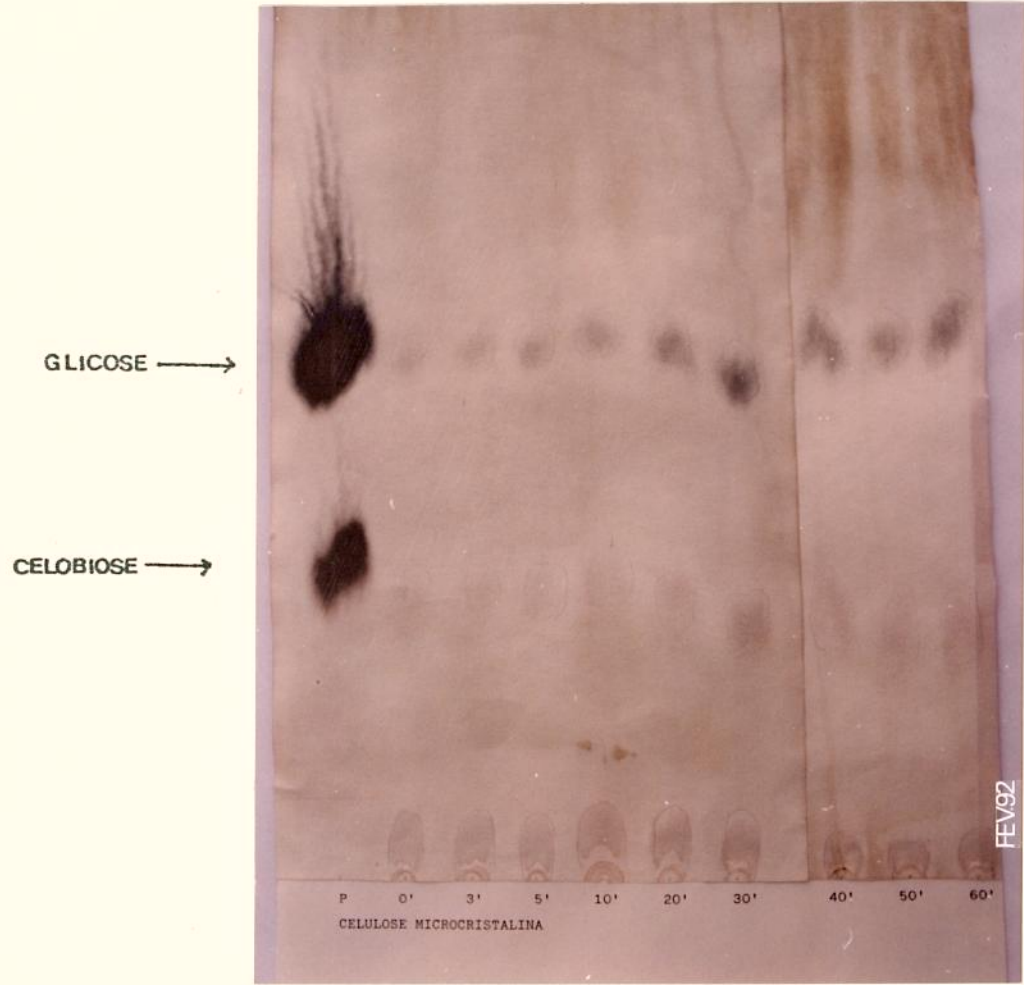


Conforme a Figura 18, a formação de açúcares redutores totais (glicose, celobiose e celooligossacarídeos) aconteceu rapidamente quando o extrato enzimático atuou sobre CMC.

Aproximadamente após 20 minutos de reação, a glicose formada (glicose oxidase), representava em torno de 35% dos açúcares redutores totais (A.R.T.), determinados pelo método do DNS, e ao final da reação (60 minutos), a glicose representou 60% dos açúcares redutores formados. Assim, a ação do extrato enzimático bruto sobre a CMC, formando elevada concentração de A.R.T., pode ser devido ao alto grau de regiões amorfas que este substrato apresenta facilitando a ação da endoglicanase e consequentemente das demais enzimas do complexo celulolítico.

A ação do extrato enzimático sobre a celulose microcristalina está representada na Figura 19, onde pode-se observar a ação mais lenta da enzima sobre este substrato, indicando que a complexidade do substrato, pela presença de regiões cristalinas, deve dificultar a hidrólise enzimática. Após 20 minutos de reação pode-se verificar uma formação ainda lenta de glicose e após 60 minutos aproximadamente, 50 % dos açúcares redutores totais formados é glicose.

FIGURA 19: AÇÃO DO EXTRATO ENZIMÁTICO BRUTO SOBRE CELULOSE MICROCRISTALINA



4.10. PURIFICAÇÃO DO EXTRATO ENZIMÁTICO BRUTO

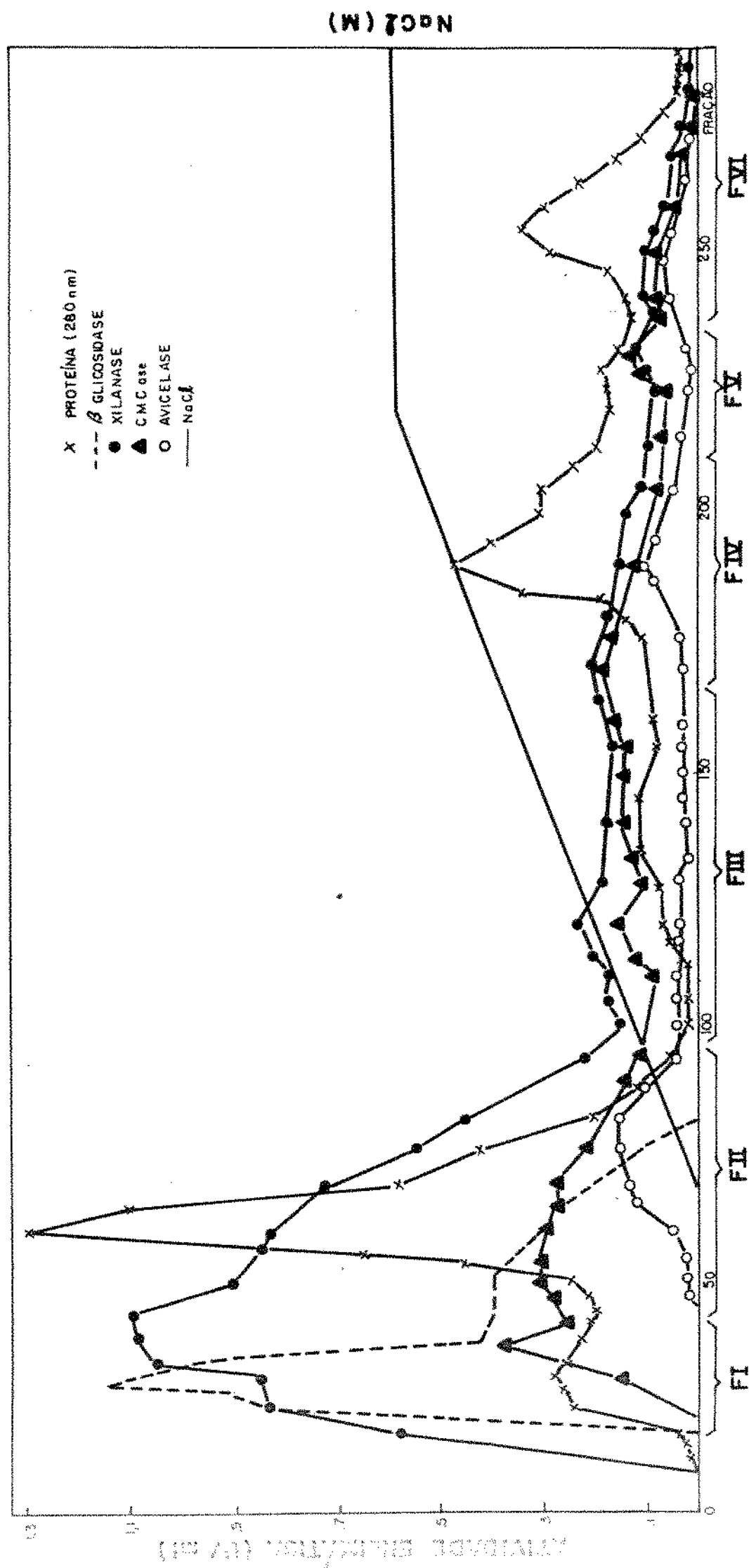
O fungo Blu 6.5 foi cultivado em meio base contendo Solka-Floc-BW 40 como fonte de carbono, conforme descrito no item 3.5.1.

Após o cultivo, obteve-se o extrato enzimático bruto (1800 ml), filtrando-se o meio em lã de vidro. As proteínas do filtrado foram precipitadas por saturação com sulfato de amônio a 65%, obtendo-se ao final 12,52g de precipitado, o qual foi ressuspenso em tampão acetato. Para a remoção do sal foi realizada uma ultracentrifugação chegando-se a um volume de 20 ml. Este extrato bruto concentrado foi utilizado na etapa de cromatografia de troca iônica.

4.10.1. CROMATOGRAFIA EM COLUNA DE DEAE SEPHADEX A-50

O extrato enzimático concentrado, conforme descrito no item anterior, foi aplicado (5ml) sobre a coluna de troca iônica. Durante a eluição das enzimas foi realizado um gradiente de NaCl de 0,05 a 0,2M e foram obtidas 6 frações protéicas, as quais foram determinadas suas atividades enzimáticas conforme está demonstrado na Figura 20.

FIGURA 20: CROMATOGRAFIA DO EXTRATO ENZIMÁTICO BRUTO EM COLUNA DE TROCA IÔNICA DEAE SEPHADEX A-50



A fração I apresentou maior atividade de β -glicosidase, sendo sua atividade específica total de 7,1 U/mg proteína (Tabela 21). Esta mesma fração apresentou atividades sobre os substratos, CMC, xilana e papel de filtro. Segundo MANDELS *et al.* (1974), a atividade de hidrólise de papel de filtro ocorre na presença de endo, ou de endo e exoglicanase, por isso esta atividade é muito utilizada para representar a atividade do sistema celulolítico.

Como pode ser observado na Figura 20, o maior pico de proteína (leitura a 280 nm) foi obtido na fração II. Nesta fração foram encontradas atividades de CMCase, xilanase, avicelase, hidrólise de papel de filtro e pouca β -glicosidase. A ação das enzimas sobre os substratos CMC, xilana e celulose microcristalina não representa necessariamente a presença de endoglicanase, xilanase e avicelase respectivamente. Conforme descrito no item 2.2.2. os substratos utilizados na determinação de atividades enzimáticas celulolíticas, na sua maioria, não são específicos, sendo que, uma endoglicanase é capaz de atuar sobre CMC, xilana e Avicel, pois todos estes substratos apresentam na sua estrutura, ligações β -1,4 glicosídicas. ROYER & NAKAS (1989) relataram que a presença de atividade de xilanase sobre substratos celulósicos pode ser devido a atividade de celulasas não específicas e alertaram para o fato de que a carboximetilcelulose pode estar contaminada com traços de xilana. Assim, a presença de atividade de xilanase pode também ser devido ao fato da carboximetilcelulose conter resíduos de xilana.

A fração III apresentou atividade de CMCase, xilanase, PFase, o que provavelmente também é devido a ausência de especificidade das enzimas pelos substratos.

A última fração protéica foi a fração VI, a qual apresentou atividades de CMCase e avicelase e baixas atividades de xilanase e hidrólise de papel de filtro.

A cromatografia de troca iônica foi repetida por três vezes afim de se obter um resultado repetitivo. Os valores das atividades enzimáticas desta etapa de purificação encontram-se na Tabela 21.

4.10.2. FRACIONAMENTO EM GEL SEPHADEX G-100

Ao final da etapa de cromatografia de troca iônica foram obtidas 6 frações as quais foram concentradas por precipitação com sulfato de amônio 65% e aplicadas em gel Sephadex G-100 para separar as enzimas e determinar seus pesos moleculares.

As atividades enzimáticas das frações de I a VI após filtração em gel e seus teores protéicos estão listados na Tabela 22.

TABELA 21: PURIFICAÇÃO DO EXTRATO ENZIMÁTICO BRUTO EM COLUNA DEAE SEPHADEX A-50

Etapa	Volume Total (ml)	Atividade Total(umol produto/ml/min)				Proteína Total (mg)	Atividade Específica(U/mg proteína)				
		PFase	CMCase	Av.	Xil		βgli	PFase	CMCase	Av.	Xil
Extrato bruto	1600	272	112	240	816	752	0,10	0,04	0,09	0,31	0,28
Precipitação (NH ₄) ₂ SO ₄ a 65% de saturação	26	865,8	592,8	384,8	1757,6	1167,4	0,39	0,27	0,17	0,79	0,53
DEAE-Sephadex A-50											
Fração I	123	30,75	27,06	0,00	111,93	95,94	2,27	2,00	0,00	8,27	7,10
Fração II	153	18,36	36,72	6,12	105,57	30,60	0,80	1,60	0,27	4,60	1,33
Fração III	213	4,26	27,69	6,39	34,08	0,00	0,40	2,60	0,60	3,20	0,00
Fração IV	129	10,32	20,64	5,16	34,83	0,00	0,94	1,88	0,47	3,18	0,00
Fração V	63	1,89	6,3	0,63	7,56	0,00	0,43	1,43	0,14	1,71	0,00
Fração VI	144	2,88	8,64	5,76	12,96	0,00	0,22	0,65	0,43	0,97	0,00

TABELA 22: FRACIONAMENTO EM GEL SEPHADEX G-100

Etapa	Volume Total (mg)	Atividade Total(umol produto/ml/min)					Proteína Total (mg)	Atividade Específica(U/mg proteína)				
		PFase	CMCase	Av.	Xil	βgl1		PFase	CMCase	Av.	Xil	βgl1
Sephadex G-100												
Fração I	84	0,00	2,52	0,00	19,32	32,76	1,75	0,00	1,44	0,00	11,04	18,72
Fração II	336	3,36	26,88	6,72	50,40	0,00	5,12	0,66	5,25	1,31	9,84	0,00
Fração III	24	0,00	1,20	0,24	2,64	0,00	1,27	0,00	0,94	0,19	2,10	0,00
Fração IV	61	0,00	3,05	2,44	0,00	0,00	2,02	0,00	1,51	1,21	0,00	0,00
Fração V	60	0,00	3,00	1,80	7,80	0,00	1,52	0,00	1,97	1,18	5,13	0,00
Fração VI	78	2,34	6,24	0,78	13,26	0,00	1,83	1,28	3,41	0,43	7,25	0,00

Após filtração em gel, a fração I apresentou as maiores atividades específicas de xilanase e β -glicosidase, (Tabela 22) indicando a presença destas enzimas na fração.

A fração II apresentou alta atividade específica de xilanase e CMCase e uma atividade específica menor para avicelase e PFase. A presença destas atividades nesta fração sugere a ação de uma endoglicanase sobre estes substratos, e talvez de uma xilanase, devido a sua alta atividade específica nesta fração. A fração III, apresentou as mesmas atividades que a fração II, exceto hidrólise de papel de filtro, sendo que suas atividades específicas foram bem menores, indicando talvez traços das enzimas da fração II ou perda do sinergismo entre endo e exoglicanase pela separação destas duas enzimas.

A ausência de atividade de PFase e xilanase na fração IV e o aumento na atividade específica de avicelase em relação a fração III, sugere que a enzima presente nesta fração deve ser exoglicanase.

A atividade específica sobre xilana na fração V pode indicar, provavelmente, a presença de uma xilanase ou CMCase, sendo que, as atividades de avicelase presente nesta fração pode indicar a presença da enzima da fração anterior.

O aumento da atividade específica de CMCase e xilanase na fração VI em relação a fração V, e, a presença de

atividades de PFase e avicelase sugerem que a enzima presente na fração VI possa ser uma endoglicanase. Esta enzima além de atuar sobre CMC possui a capacidade de agir sobre o substrato papel de filtro e xilana, e, em menor proporção, sobre celulose microcristalina.

4.11. DETERMINAÇÃO DO PESO MOLECULAR

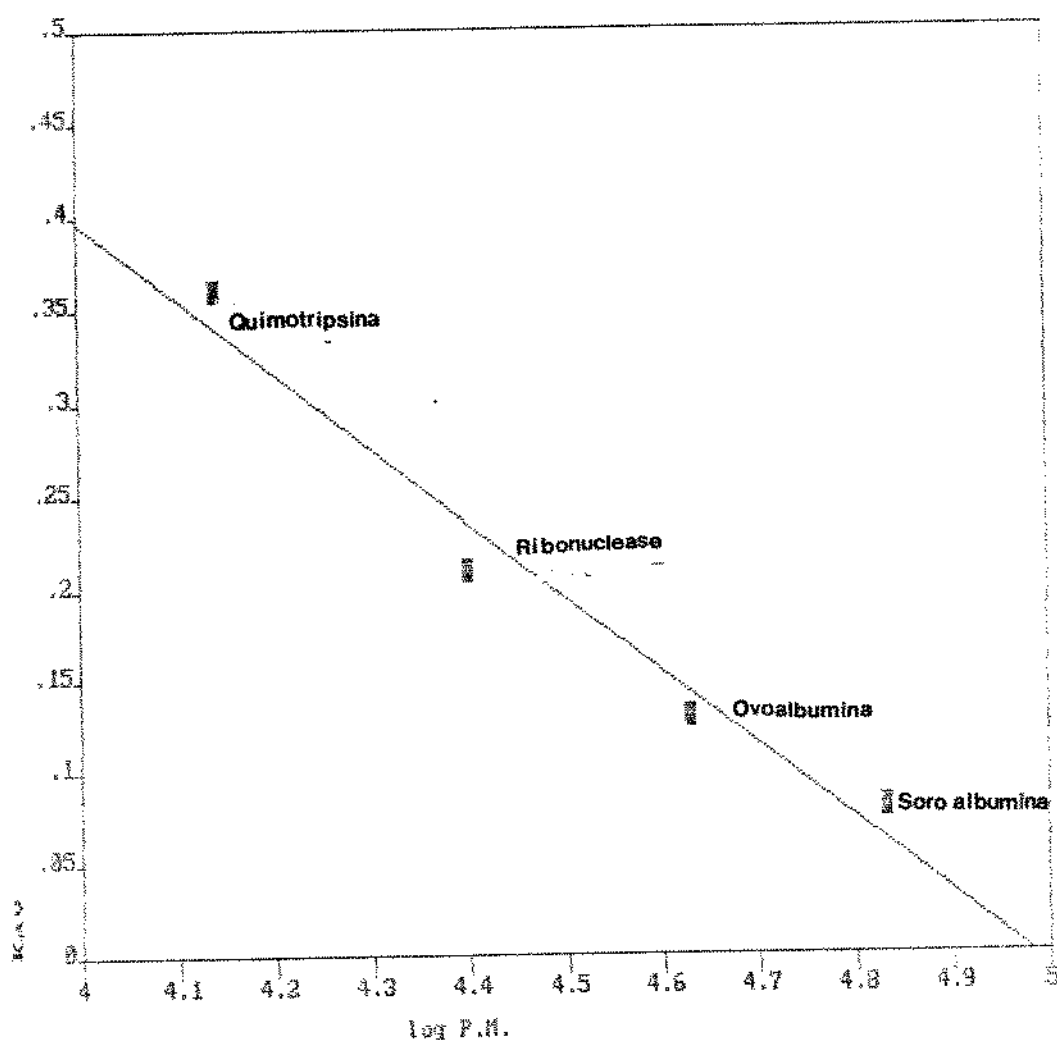
A coluna de gel Sephadex G-100 que foi utilizada para separação das frações enzimáticas, foi calibrada com compostos de pesos moleculares conhecidos conforme descrito no item 3.12.3., obtendo-se uma curva de calibração (Figura 21), que relaciona o logaritmo dos pesos moleculares com K_{av} .

Foram realizadas a determinação dos pesos moleculares das enzimas presentes nas frações I, II e IV.

A fração I apresentou alta atividade específica de xilanase e β -glicosidase após filtração em gel, sendo que, seus K_{av} s foram determinados e extrapolando-se o valor obtido na curva de calibração (Figura 21) foram obtidos os pesos moleculares destas enzimas. A β -glicosidase apresentou um peso molecular de aproximadamente 44.000 kDa e a xilanase em torno de 14.000 kDa. Estes valores são comparáveis aos encontrados na literatura, os quais variam conforme o microrganismo produtor da enzima. A β -glicosidase de *T. viride* possui peso molecular de 47.700 kDa e de *T. koningii* 39.800 kDa, entretanto, existem β -glicosidasas de *S. pulverulentum* que chegam a possuir 182.000 kDa (CENARI &

PAAVOLA, 1987). As xilanases, em geral parecem apresentar um peso molecular um pouco inferior aos da β -glicosidase, sendo que, as xilanases encontradas no *T. reesei* possuem um peso molecular que varia de 8500 a 40.700 Da (DEKKER, 1985).

FIGURA 21: CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA DETERMINAÇÃO DO PESO MOLECULAR



Na fração II foram encontradas duas atividades específicas altas; de endoglicanase (CMCase) e de xilanase e, quando seus pesos moleculares foram determinados, encontrou-se valores de 26.000 e 16.000 kDa respectivamente. Os pesos

moleculares das endoglinases encontrados na literatura variam com o microrganismo produtor, assim, as seis endoglicanases do *T. reesei* estudadas possuem valores que variam na faixa de 20.000 a 67.000 Da (ENARI & PAAVOLA, 1987).

A provável exoglicanase encontrada na fração IV apresentou peso molecular em torno de 60.000 kDa, sendo que os pesos moleculares das celobiohidrolases de espécies de *Trichoderma* estudadas coincidem com este valor (entre 44.000 e 64.000 Da) (ENARI & PAAVOLA, 1987).

5. CONCLUSÕES

- Os dois métodos utilizados para isolamento e seleção dos microrganismos, foram complementares para a detecção de enzimas celulolíticas. O método de formação de halo em placas, contendo ágar-celulose-rosa de bengala, indica apenas a presença ou não de enzimas celulolíticas, ou seja, o tamanho do halo formado, não corresponde a quantidade de enzimas produzidas pelo microrganismo. Por sua vez, o método de rompimento de fita, nos permite comparar quantitativamente a produção enzimática entre microrganismos de acordo com o tempo necessário para romper a fita. Dos 254 fungos isolados devido a formação de halo, apenas 70 romperam a fita no intervalo de 14 dias, nas condições de estudo. Os fungos restantes provavelmente produzem uma menor quantidade de celulasas, necessitando de um tempo mais prolongado ou de outras condições de cultivo, como por exemplo, temperatura mais elevada. Apesar das bactérias isoladas produzirem halo, não foram capazes de degradar a fita de papel de filtro, indicando que as enzimas celulolíticas produzidas devem ser intracelulares ou podem estar ligadas a parede celular, fato este já observado por muitos pesquisadores.

- O mutante m_{38} apesar de apresentar um grande halo transparente ao seu redor não foi capaz de romper a fita no período de 14 dias, indicando uma diminuição na produção de celulasas, fato este comprovado após a determinação de suas atividades celulolíticas.

A produção de proteínas pelo mutante foi inferior a do

microrganismo selvagem indicando que a mutação pode ter alterado o seu sistema secretório.

- De uma forma geral, as maiores atividades de hidrólise de papel de filtro, CMCase e avicelase foram obtidas quando Solka-Floc foi utilizada como fonte de carbono pelos microrganismos Blu 6.5, m₃₈ e QM 9414.

- Os resíduos agrícolas apresentaram-se como uma ótima opção para a produção de xilanase em meio líquido sob agitação, uma vez que, os melhores resultados foram obtidos quando estas fontes de carbono foram utilizadas.

- O microrganismo Blu 6.5 apresentou maior produção de xilanase quando cultivado em bagaço de cana. O melhor resultado de atividade de xilanase para o mutante m₃₈ foi obtido após seu crescimento em casca de mandioca. A alta produção de xilanase em resíduos agrícolas pelos microrganismos utilizados deve ser provavelmente devido à presença de hemicelulose (xilana) nestes materiais.

- As melhores atividades de β -glicosidase para o microrganismo Blu 6.5. foram obtidas quando utilizou-se bagaço de cana ou farinha de babaçu em meio líquido, sendo que, a maior atividade de β -glicosidase foi obtida quando o mutante m₃₈ cresceu em meio contendo farelo de trigo. De uma maneira geral, a produção de β -glicosidase em celulose pura, pelos microrganismos estudados,

foi comparável àquela obtida em resíduo agrícola.

- A cepa de *T. longibrachiatum* isolada (Blu 6.5), apresentou maior produção de celulases que a cepa selvagem *T. reesei* QM 6a e comparável a do mutante *T. reesei* QM 9414. Apesar do mutante obtido (m₃₈) não ter apresentado melhores níveis de celulases, a cepa selvagem é promissora para estudos de mutação, devido a sua capacidade de produção de enzimas celulolíticas com boas atividades. Provavelmente o uso de outros agentes mutagênicos, como por exemplo, N-nitro-N-nitroso-guanidina, possa gerar mutantes mais eficientes.

- A melhor produção das celulases em geral, e de β -glicosidase foi no 6º dia de incubação, sendo que, a atividade mais elevada de xilanase foi obtida no 3º dia e 4º dias de incubação do microrganismo Blu 6.5 em meio líquido contendo Solka-Floc BW 200.

- O papel jornal foi hidrolisado com mais eficiência do que o bagaço de cana pelo extrato enzimático bruto, provavelmente pela maior presença de lignina no bagaço não tratado, o que dificulta fisicamente o acesso enzimático.

- A temperatura ótima para atividade das celulases produzidas pelo microrganismo isolado é 55°C, sendo estáveis por uma hora a 25 e 30°C. A faixa de pH ótimo para ação das celulases produzidas é entre 4,6 e 5,0, sendo mais estáveis entre

pH 4,4 e 5,0.

- A constante de Michaelis Menten para β -glicosidase é $0,52 \times 10^{-3}$ M e a velocidade máxima 0,73 umol de açúcar redutor/ml/min/mg de proteína.

- A produção de açúcares redutores totais pela ação do extrato enzimático sobre carboximetilcelulose foi elevada provavelmente pela ação de endoglicanase em regiões amorfas, permitindo a ação da exoglicanase a qual libera celobiose e/ou glicose. A celobiose fica disponível para a β -glicosidase, aumentando ainda mais a quantidade de glicose. A ação do extrato enzimático sobre celulose microcristalina resultou em uma menor formação de açúcares redutores totais demonstrando a dificuldade da endoglicanase atuar neste substrato para liberar finais não redutores, permitindo a ação de exoglicanase e posterior ação de β -glicosidase.

- O extrato enzimático bruto foi parcialmente purificado pela utilização dos métodos de cromatografia de troca iônica e filtração em gel. Provavelmente, as frações obtidas devem conter mais de uma enzima em sua composição, demonstrando a necessidade de utilização de substratos mais específicos para a detecção destas enzimas. Técnicas avançadas para purificação, como por exemplo, cromatografia de afinidade e isoeletrofocalização, poderiam, ser utilizadas para obtenção de enzimas mais puras. Na

prática, o isolamento das enzimas componentes do complexo celulolítico não é interessante, uma vez que apresentam sinergismo entre si, tendo suas atividades reduzidas quando separadas.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDREOTTI, R.E.; MEDEIROS, T.E.; ROCHE, C.; MANDELS, M. Effects of strain and substrate on production of cellulases by *T. reesei* mutants. Biochem. Eng. Symp., 1: 353-372, 1980.
- ARAI, M.; SAKAMOTO, R.; MURAO, S. Different action by two avicelases from *Aspergillus aculeatus*. Agric. Biol. Chem., 53 (5): 1411-1412, 1989.
- AUGUSTINE, N.R. Technology transfer from military requirements to public need. Biotechnol. Bioeng. Symp., 1: 1-8, 1976.
- BARICHIEVICH, E.M.; CALZA, R.E. Media carbon induction of extracellular cellulase activities in *Neocallimastix frontalis* Isolate EB 188. Current Microbiol., 20: 265-271, 1990.
- BARRIER, J.W. Fuels and chemicals from municipal solid waste. IN: National Fertilizer & Environmental Research Center. Muscle Shoals, AL, 1991.
- BORCHERT, A.; BUCHHOLZ, K. Enzymatic hydrolysis of cellulosic materials. Process. Biochem., 173-180, 1987.
- BORGIA, P.; SYPHERD, P.S. Control of β -glucosidase synthesis in *Mucor racemosus*. J. Bacteriol., 130(2): 812-817, 1977.

- BRONNENMEIER, K.; STAUDENBAUR, W.L. Cellulose hidrolisis by a highly thermostable endo-1,4- β -glicanase (avicelase I) from *Clostridium stercorarium*. Enzyme Microb. Technol., 12: 431-436, 1990.
- BROWN, A.J.; FALCOMER, D.J.; WOOD, T.M. Isolation and properties of mutants of the fungus *Penicillium pinophilum* with enhanced cellulase and β -glucosidase production. Enzyme Microb. Technol., 9: 169-175, 1987.
- CANEVASCINI, G.; MEYER, H.P. β -glucosidase in the cellulolytic fungus *Sporotrichum thermophile* Apinis. Exper. Mycol., 3: 203-214, 1979.
- CHERNOGLAZOV, V.M.; ERMOLOVA, O.V.; KLYOSOV, A.A. Adsorption of high-purity endo-1,4- β -glicanases from *T. reesei* on components of lignocellulosic materials: Cellulose, lignin, and xylan. Enzyme Microb. Technol., 13: 272-274, 1991.
- CHRISTAKOPOULOS, P.; MACRIS, B.J.; KEKOS, D. Direct fermentation of cellulose to ethanol by *Fusarium oxysporum*. Enzyme Microb. Technol., 11: 236-239, 1989.
- CHRISTAKOPOULOS, P.; KOULLAS, D.P.; KEKOS, D.; KOUKIOS, E.G.; MACRIS, B.J. Direct conversion of straw to ethanol by *Fusarium oxysporum*: Effect of cellulose cristallinity. Enzyme Microb. Technol., 13: 272-274, 1991.

COCHET, N. Cellulases of *Trichoderma reesei*: Influence of culture conditions upon the enzymatic profile. Enzyme Microb. Technol., 13: 104-109, 1991.

COUGHLAN, M. P.^a The properties of fungal and bacterial cellulases with comment on their production and application. IN: RUSSEL, E.G. ed. Biotechnology & Genetic Engineering Reviews, vol.3, Intercept Portland Limited, NewCastle, 1985. p.39-109.

COUGHLAN, M.P.^b Cellulases: Production, properties and applications. Biochem. Soc. Trans., 13: 405-406, 1985.

COWLING, E. B.; KIRK, T. K. Properties of cellulose and lignocelulosic materials as substrate for enzymatic conversion process. Biotech. Bioeng. Symp., 1: 95-123, 1976.

CUSKEY, S.M.; MONTENECOURT, B.S.; EVELEIGH, D.E. Screening for cellulolytic mutants. IN: WISE, D.L. ed., Liquid and Fuel Development, CRC Press Inc. Florida, 1981. p.31-64.

DEKKER, R.R.H. Biodegradation of the hemicellulases. IN: Byosynthesis and Biodegradation of Wood Components, ch-18, Academic Press Inc., 1985. p. 505-533.

DESCHAMPS, F.; HUET, M.C. β -Glucosidase production on by *Aspergillus phoenicis* in solid state fermentation. Biotechnol. Lett., 6(1): 55-60, 1984.

DURAND, H.; BARON, M.; CALMELS, T.; TIRABY, G. Classical and molecular genetics applied to *Trichoderma reesei* for the selection of improved cellulolytic industrial strains. Biochem. Gen. Cellul. Degradation, 135-151, 1988.

ENARI, T.; PAAVOLA, M. Enzymatic hidrolysis of cellulose: is the current theory of the mechanisms of hydrolisis valid? CRC Critical Rev. in Biotech., 5: 67-87, 1987.

ERIKSSON, K.E.; HAMP, S.G. Regulation of endo-1,4- β -glucanase production in *Sporotrichum pulverulentum*, Eur. J. Biochem., 90: 183-190, 1978.

ERIKSSON, K.E.; WOOD, T.M. Biodegradation of cellulose. IN: Biosynthesis and Biodegradation of Wood Components, Ch. 5. Academic Press Inc. 1985. p.469-491.

EVELEIGH, D.E. Cellulase: a perspective. Phil. Trans. R. Soc. Lond., 321: 435-447, 1987.

FELDMAN, K.A.; LOVETT, J.S.; TSAO, G.T. Isolation of the cellulase enzymes from the thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus* and regulation of enzyme production. Enzyme Microb. Technol., 10: 262-272, 1988.

FRACHEBOUD, D.; CANEVASCINI, G. Isolation, purification, and properties of the exocellulase from *Sporotrichum*

(*Chrysosporium*) *thermophile*. Enzyme Microb. Technol., 11: 220-229, 1989.

GOKHALE, D.V.; PUNTAMBEKAR, U.S.; DEOBAGKAR, D.N.; PEBERDY, J. F. Production of cellulolytic enzymes by mutants of *A. niger* NCIM 1207. Enzyme Microb. Techn., 10: 442-445, 1988.

GOLDSTEIN, I.S. Chemicals from lignocellulose. Biotechnol. Bioeng. Symp., 1: 293-301, 1976.

GRITZALI, M.; BROWN, R.D. The cellulase system of *Trichoderma*. Relationships between purified extracellular enzymes from induced or cellulose-grown cells. Advances in Chemistry Series, 181: 237-260, 1979.

GUILIANO, C.; ASTHER, M.; KHAN, A.W. Comparative degradation of cellulose and sugar formation by three newly isolated mesophilic anaerobes and *Clostridium thermocellum*. Biotechnol. Lett., 5(6): 395-398, 1983.

HAN, N.W.; CALLIHAN, L. Cellulose Fermentation: Effect of substrate pretratment on microbial growth. Appl. Microbiol., 27(1): 159-165, 1974.

HARKKI, A.; MANTYLA, A.; PENTTILA, M.; MUTTILAINEN, S.; BUHLER, R.; SUOMINEN, P.; KNOWLES, J.; NEVALAINEN, H. Genetic engineering of *Trichoderma* to produce strains with novel

- cellulase profile. Enzyme Microb. Technol., 13: 227-233, 1991.
- HERIBAN, T.P.; CLAEYSSSENS, M. Adsorption of two cellobiohydrolases from *T. reesei* to avicel: Evidence for "Exo-Exo" synergism and possible "loose complex" formation. Biotechnol. Lett. 12 (7): 525-530, 1990.
- HENRISSAT, B.; DRIGUEZ, H.; VIET, C.; SCHULEIN, M. Synergism of cellulases from *Trichoderma reesei* in the degradation of cellulose. Biotechnology, 3: 722-726, 1985.
- HUANG, L.; FORSBERG, C.W. Cellulose digestion and cellulase regulation and distribution in *Fibrobacter succinogenes* subsp. *succinogenes* S85. Appl. Environ. Microbiol., 56(5): 1221-1228, 1990.
- ITO, S.; SHIKATA, S.; OZAKI, K.; KAWAY, S.; OKAMOTO, K.; INOVE, S.; TAKEY, A.; OHTA, Y.; SATOH, T. Alkaline cellulase for laundry detergents: production by *Bacillus* sp. KSM-635 and enzymatic properties. Agric. Biol. Chem. 53(5): 1275-1281, 1989.
- JAFELICE, L.R.S.; WISEMAN, A.; GOLDFARB, P. Exocellular and intracellular β -glucosidase produced in ligninolytic culture of *Phanerochaete chrysosporium*. Biochem. Soc. Trans., 13: 644-645, 1990.

JOHNSON, K.G.; HARRISON, B.A.; SCHNEIDER, H.; Mc KENZIE, C.R.;
FONTANA, J.D. Xylan-hydrolysing enzymes from *Streptomyces* spp.
Enzyme Microb. Technol., 10: 403-409, 1988.

JOHNSON, E.; MADIA, A.; DEMAIN, A.L. Chemically defined minimal
medium for growth of the anaerobic cellulolytic thermophile
Clostridium thermocellum. Appl. Environ. Microbiol., 41(4):
1060-1062, 1981.

KAWAMORI, M.; MORIKAWA, Y.; SHINSHA, Y.; TAKAYAMA, K.; TAKASAWA,
S. Preparation of mutants resistant to catabolite repression of
Trichoderma reesei. Agric. Biol. Chem., 49(10): 2875-2879,
1985.

KAWAMORI, M.; TAKAYAMA, K.; TAKASAWA, S. Production of cellulases
by a thermophilic fungus, *Thermoascus aurantiacus* A-131.
Agric. Biol. Chem. 51(3): 647-654, 1987.

KHOWALA, S.; MUKHERJEE, M.; SENGUPTA, S. Carboxymethyl xylan-a
specific substrate directly differentiating backbone-hydroly-
sing and side chain-reacting β -D-1,4-xylanases of the mushroom
Termitomyces clypeatus. Enzyme Microb. Technol., 10: 563-567,
1988.

KNAPP, J.S. Biodegradation of celluloses and lignins. In:
MOO-YOUNG, M. ed. Comprehensive Biotechnology, vol. 3,
Pergamon Press Inc., N.Y., 1985. p.835-846.

- KNAPPERT, D.; GRETHLEIN, H.; CONVERSE, A. Partial acid hydrolysis of poplar wood as a pretreatment for enzymatic hydrolysis. Biotech. Bioeng. Symp., 11: 67-77, 1981.
- KOBA, Y.; ISHIZAKI, A. Chemical composition of palm fiber and its feasibility as cellulosic raw material for sugar production. Agric. Biol. Chem., 54(5): 1183-1187, 1990.
- KOENIGS, J.W. Hydrogen peroxide and iron: a proposed system for degradation of wood by brown-rot basidiomycetes. Wood Fiber, 6: 66-80, 1974.
- KUBICEK, P.R. β -glucosidase excretion by *Trichoderma pseudokonigii* Correlation with cell wall bound β -1,3-glucanase activities. Arch. Microbiol., 132: 349-354, 1982.
- LABUDOVÁ, I.; FARKAS, V. Multiple enzyme forms in the cellulase system of *Trichoderma reesei* during its growth on cellulose. Biochim Biophys. Acta, 744: 135-140, 1983.
- LAYNE, E. Methods in enzymology, 3: 450, 1957.
- LINEWEAVER, H.; BURK, D. Determination of enzymatic dissociation constant. J. Am. Chem. Soc., 56: 658-666, 1934.

LJUNGDAHL, L.G. & ERIKSSON, K.E. Ecology of microbial cellulose degradation. IN: Marshall, R.E. Advan. Microbial Ecol., 8: 237-299, 1985.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the folin-phenol reagent. J. Biol. Chem., 193: 265-275, 1951.

LUSIS, A.J.; BECKER, R.R. The β -glucosidase system of the thermophilic fungus *Chaetomium thermophile* var. *Coprophile* N. var. Biochim. Biophys. Acta, 329: 5-16, 1973.

LYND, L.R.; GRETHLEIN, H.E.; WOLKIN, R.H. Fermentation of cellulosic substrates in batch continuous culture by *Clostridium thermocellum*. Appl. Environ. Microbiol., 55(12): 3121-3139, 1989.

MADAMWAR, D.; PATEL, S.; PARIKH, H. Solid state fermentation for cellulases and β -glucosidase production by *Aspergillus niger*. J. Ferm. Bioeng., 67(6): 424-426, 1989.

MANDELS, M.; ANDREOTTI, R.E. Problems and challenges in the cellulose to cellulase fermentation. Process Biochem., 6-13, 1978.

MANDELS, M. Cellulases. Ann. Report. on Ferm. Process. 5: 35-73, 1982.

MANDELS, M. Applications of cellulases. Biochem. Soc. Trans.,
13: 414-416, 1985.

MANDELS, M.; ANDREOTTI, R.; ROCHE, C. Measurement of saccharifying
cellulase. Biotechnol. Bioeng. Symp., 6: 21-33, 1976.

MANDELS, M.; HONTZ, L.; NYSTROM, J. J. Biotech. Bioeng., 16:
1471-1493, 1974.

MANDELS, M.; MEDEIROS, J.E.; ANDREOTTI, R.E.; BISSET, F.H.
Enzymatic hydrolysis of cellulose: Evaluation of cellulase
culture filtrates under use conditions. Biotechnol. Bioeng.,
23: 2009-2026, 1981.

MANDELS, M.; REESE, E.T. Induction of cellulase in *Trichoderma*
viride as influenced by carbon sources and metals. J.
Bacteriol., 73: 269-277, 1957.

MANDELS, M.; WEBER, J.; PARIZEK, R. Enhanced cellulase production
by a mutant of *Trichoderma viride*. Appl. Microbiol., 21(1):
152-154, 1971.

MANN, S.O. An improved method for determining cellulolytic
activity in anaerobic bacteria. J. Appl. Bact., 31: 241-244,
1968.

- MASON, J.C.; RICHARDS, M.; ZIMMERMANN, W.; BRODA, P.
Identification of extracellular proteins from Actinomycetes responsible for the solubilization of lignocellulose. Appl. Microbiol. Biotechnol., 28: 276-280, 1988.
- McALLISTER, A.T.; CHENG, K.J.; RODE, L.M.; FORSBERG, C.W.
Digestion of barley, maize and wheat by selected species of ruminal bacteria. Appl. Environ. Microbiol., 56(10): 3146-3153, 3146-3153, 1990.
- McHALE, A.P.; MORRISON, J. Cellulase production during growth of *Talaromyces emersonii* CBS 814.70 on lactose containing media. Enzyme Microb. Technol., 8: 749-754, 1986.
- MENEZES, T.J.B.; ARAKAKI, T.; DELAMO, P.R.; SALES, A.M. Fungal cellulases as an aid for the saccharification of cassava. Biotechnol. Bioeng., 20: 555-565, 1978.
- MERIVOURI, H.; SIEGLER, K.M.; SANDS, J.A.; MONTENECOURT, b.s.
Regulation of cellulase biosynthesis and secretion in fungi. Biochem. Soc. Trans., 13: 411-413, 1985.
- MERIVUORI, H.; TORNKVIST, M.; SANDS, J. Different temperature profile of enzyme secretion by two common strains of *Trichoderma reesei*. Biotechnol. Lett., 12(2): 117-120, 1990.

- MEYER, H.P.; CANEVASCINI, G. Separation and some properties of two intracellular β -glucosidases of *Sporotrichum (Chrysosporium) thermophile*. Appl. Envirom. Microbiol., 41(4): 924-931, 1981.
- MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Anal. Chem. 31(3): 426-428, 1959.
- MILLET, M.A.; BAKER, A.T.; SATTER, L.D. Physical and chemical pretreatments for enhancing cellulose saccharification. Biotechnol. Bioeng. Symp., 6: 125-154, 1976.
- MONTENECOURT, B.S.; CARROLL, J.O.; LANZILOTTA, R.P. Assay of industrial microbial enzymes. IN: MOO-YOUNG, M. Ed. Comprehensive Biotechnology, vol. 4, Pergamon Press Inc., N.Y., 1985. p. 329-361.
- MONTENECOURT, B.S.; EVELEIGH, D.E.^a Preparation of mutants of *Trichoderma reesei* with enhanced cellulase production. Appl. Envirom. Microbiol., 34(6): 777-782, 1977.
- MONTENECOURT, B.S.; EVELEIGH, D.E.^b Semiquantitative plate assay for determination of cellulase production by *Trichoderma viride*. Appl. Envirom. Microbiol., 33(1): 178-183, 1977.
- MONTGOMERY, R.A.P. The rôle of polysaccharidase enzymes in the decay of wood by basidiomycetes. IN: SMITH, J.E.; BERRY, D.R.;

EDWARD, A. ed., The Filamentous Fungi, vol. 4, Academic Press, 1983. p.33-58.

MORI, Y. Characterization of a symbiotic coculture of *Clostridium thermohydrosulfuricum* YM 3 and *C. thermocellum* YM 4. Appl. Envirom. Microbiol., 56(1): 37-42, 1990.

MORRISON, J.; Mc CARTHY, U.; Mc HALE, A.P. Cellulase production by *Talaromyces emersonii* CBS 814-70 and a mutant UV 7 during growth on cellulose, lactose and glucose containing media. Enzyme Microb. Technol., 9: 421-4250, 1987.

MULLINGS, R. Measurement of saccharification by cellulases. Enzyme Microb. Technol., 7: 586-590, 1985.

MURAO, S.; KANAMOTO, J.; ARAI, M. Isolation and identification of a cellulolytic enzyme producing microorganism. J. Ferment. Technol., 57(3): 151-156, 1979.

OKOSHI, H.; OZAKI, K.; SHIKATA, S.; OSHINO, K.; KAWAI, S.; ITO, S. Purification and characterization of multiple carboxymethyl cellulases from *Bacillus* sp. KSM-522. Agric. Biol. Chem., 54 (1): 83-89, 1990.

OTTOW, J.C.G. Rose bengal as a selective aid in the isolation of fungi and Actinomycetes from natural sources. Mycologia, 64: 304-315, 1972.

- RAO, M.; SEETA, R.; DESHPANDE, V. Comparative evaluation of cellulases: Role of individual components in hydrolysis. Biotechnol. and Appl. Biochem., 11: 477-482, 1989.
- REESE, E.T.; MANDELS, M. Rolling with the times: Production and applications of *T. reesei* cellulase. Ann. Reports on Ferm. Processes, 7: 1-19, 1984.
- REESE, E.T.; MAGUIRE, A. Surfactants as stimulants of enzyme production by microorganisms. Appl. Microbiol., 12: 242-245, 1969.
- REESE, E.T.; SIU, R.G.H; LEVINSON, H.S. Biological degradation of soluble cellulose derivatives. J. Bacteriol., 59: 485-497, 1950
- RIFAI, M.A. A Revision of the genus *Trichoderma*. Mycological Papers, 116: 42-44, 1969.
- ROBSON, L.M.; CHAMBLISS, C. Cellulases of bacterial origin. Enzyme Microb. Technol., 11: 626-643, 1989.
- RODRIGUEZ, H.; VOLFOVÁ, O.; KLYOSOV, A. Characterization of the cellulase complex from *Cellulomonas* grown on bagasse pith. Appl. Microbiol. Biotechnol., 28: 394-397, 1988.

- ROUAU, X.; ODIER, E. Production of extracellular enzyme by the white-rot fungus *Dichomitus squalens* in cellulose-containing liquid culture. Enzyme Microb. Technol., 8: 22-26, 1986.
- ROYER, J.C.; NAKAS, J.P. Xylanase production by *Trichoderma longibrachiatum*. Enzyme Microb. Technol., 11: 405-410, 1989.
- ROYER, J.C.; NAKAS, J.P. Interrelationship of xylanase induction and cellulase induction of *Trichoderma longibrachiatum*. Appl. Environ. Microbiol., 56(8): 2535-2539, 1990.
- SANYAL, A.; KUNDU, R.K.; DUBE, S.; DUBE, D.K. Extracellular cellulolytic enzyme system of *A. japonicus*: 2. Purification and characterization of an inducible extracellular β -glucosidase. Enzyme Microb. Technol., 10: 91-99, 1988.
- SENGUPTA, S.; SENGUPTA, S. β -glucosidase production by the mycelial culture of the mushroom *Termitomyces clyveatus*. Enzyme Microb. Technol., 12: 309-314, 1990.
- SHAMALA, T.R.; SREEKANTIAH, K.R. Successive cultivation of selected cellulolytic fungi on rice straw and wheat bran for economic production of cellulases and D-xylanase. Enzyme Microb. Technol., 9: 97-101, 1987.
- SHARMA, P.; GUPTA, J.K.; VADEHRA, D.V. Purification and properties of an endoglucanase from a *Bacillus* isolate. Enzyme Microb.

Technol., 12: 132-137, 1990.

SHARMA, A.; JOSEPH, R. Studies on the application of plant cell wall degrading enzymes from *Aspergillus terreus* and *Neurospora crassa*. Biotechnol. Lett., 5(7): 481-486, 1983.

SHIKATA, S.; SAEKI, K.; OKOSHI, H.; YOSHIMATSU, T.; OZAKI, K.; KAWAI, S.; ITO, S. Alkaline cellulases for laundry detergents: Production by alkalophilic strains of *Bacillus* and some properties of the crude enzymes. Agric. Biol. Chem., 54(1): 95-98, 1990.

SIVAN, A.; HARMAN, G.E.; STASZ, T.E. Transfer of isolated nuclei into protoplast of *Trichoderma harzianum*. Appl. Environ. Microbiol., 56(8): 2404-2409, 1990.

SOUNDAR, S.; CHANDRA, T.S. Production of cellulase and detection of avicel-adsorbing carboxymethylcellulase from a mesophilic fungus *Hemicella grisea* Fb. Enzyme Microb. Technol. 10: 368-374, 1988.

SREENATH, H.K.; FREY, M.D.; RADOLA, B.J.; SCHERZ, H. Degradation of a washed carrot preparation by cellulases and pectinases. Biotechnol. Bioeng. 26: 788-796, 1984.

STEINER, W.; SATTLER, W.; ESTERBAUER, H. Adsorption of *T. reesei* cellulase on cellulose: Experimental data and their analysis by

different equations. Biotechnol. Bioeng., 32: 853-865, 1988.

STERNBERG, D. Production of cellulase by *Trichoderma*. Biotechnol. Bioeng. Symp., 6, 35-53, 1976.

STERNBERG, D.; VIJAYAKUMAR, P.; REESE, E.T. β -glucosidase: microbial production and effect on enzymatic hydrolysis of cellulose. Can. J. Microbiol., 23: 139-147, 1977.

STOCKTON, B.C.; MITCHELL, D.J.; GROHMANN, K.; HIMMEL, M.E. Optimum β -D-glucosidase supplementation of cellulase for efficient conversion of cellulose to glucose. Biotechnol. Lett., 13(1): 57-62, 1991.

STUTZENBERGER, F.J. Component specific stimulation of cellulase secretion in *Thermomonospora curvata* by the surfactant Tween 80. J. Appl. Bacteriol., 63: 239-244, 1987.

SUH, D.H.; BECKER, T.C.; SANDS, J.A.; MONTENECOURT, B.S. Effects of temperature on xylanase secretion by *T. reesei*. Biotechnol. Bioeng., 32: 821-825, 1988.

TANAKA, M.; MASAYUKI, T.; MATSUNO, R.; KANICUBO, T. Purification and properties of cellulases from *Eupenicillium javanicum*. J. Ferment. Technol., 59(3): 177-183, 1981.

- TANAKA, M.; TUNIGUCHI, M.; MORITA, T.; MATSUNO, R.; KAMIKUBO, T.
Effect of chemical treatment solubilization of crystalline
cellulose and cellulosic wastes with *Pellicularia filamentosa*
cellulase. J. Ferment. Technol., 57(3): 186-190, 1979.
- TANAKA, M.; MATSUMO, R. Conversion of lignocellulosic materials to
single-cell protein (SCP): Recent developments and problems.
Enzyme Microb. Technol., 7: 197-205, 1985.
- TEATHER, R.M.; WOOD, P.J. Use of congo red-polysaccharide
interactions in enumeration and characterization of
cellulolytic bacteria from the bovine rumen. Appl. Envirom.
Microbiol., 43(4): 777-780, 1982.
- TOYAMA, H.; YAMAGUCHI, K.; SHINMYO, A.; OKADA, H. Protoplast
fusion of *Trichoderma reesei*, using immature conidia. Appl.
Envirom. Microbiol., 47(2): 363-368, 1984.
- TOYAMA, N. Feasibility of sugar production from agricultural and
urban cellulosic wastes with *T. viride* cellulase. Biotechnol.
Bioeng. Symp., 1: 207-219, 1976.
- TREVELYAN, W.E.; PROCTER, D.P.; HARRISON, J.G. Detection of
sugars on paper chromatograms. Nature, 166: 444-445, 1950.

- UMILE, C.; KUBICEK, C.P. A constitutive, plasma-membrane bound β -glucosidase in *Trichoderma reesei*. FEMS Microbiol. Lett., 34: 291-295, 1986.
- Van TILBURGH, H.; CLAEVSENS, M.; BRUYNE, C.K. The use of 4-methylumbelliferyl and other chromophoric glycosides in the study of cellulolytic enzymes. FEBS Lett., 149(1): 152-157, 1982.
- VAHERI, M.P. Acidic degradation products of cellulose during enzymatic hydrolysis by *Trichoderma reesei*. J. Appl. Biochem., 4: 153-160, 1982.
- Van ZYL, W.H. A study of the cellulase produced by three mesophilic actinomycetes grown on bagasse as substrate. Biotechnol. Bioeng., 27: 1367-1373, 1985.
- WALKER, L.P.; WILSON, D.B.; IRWIN, D.C. Measuring fragmentation of cellulose by *Thermomonospora fusca* cellulase. Enzyme Microb. Tech., 12: 378-385, 1990.
- WARD, O. P. Hydrolytic enzymes. IN: MOO-YOUNG, M. ed., Comprehensive Biotechnology, vol. 3, Pergamon Press Inc. N.Y., 1985. p.819-835.
- WASE, D.A.J.; VAID, A.K. Isolation and mutation of a highly cellulolytic strain of *Aspergillus fumigatus*. Process

Biochem., 22(6): 35-37, 1983.

WERNER, W.; REY, H.G.; WIELINGER. Z. Anal. Chem., 252:224, 1970.

WESTERMARK, U.; ERIKSSON, K.E. Cellobiose: quinone oxireductase, a new wood-degrading enzyme from white-rot fungi. Acta Chem. Scand., 28: 209-214, 1974.

WILSON, R.W.; NIEDERPRUEM, D.J. Control of β -glucosidases in *Schizophyllum commune*. Can. J. of Microbiol., 13: 1009-1019, 1967.

WOOD, T.M.; McCRAE, S.I. The purification of the C_1 component of *Trichoderma koningii* cellulase. Biochem. J., 128: 1183-1192, 1972.

WOODWARD, J. Utilization of cellulose as a fermentation substrate: Problems and potential. IN: STOWELL J. D. ed. Carbon Substrate in Biotechnology, vol.21., VRL Press, Oxford, 1987. p.45-65.

YAWANOBE, T.; HIRAISHI, J.; KRUVRS, H. Improvement of fungal strain Y-94, a cellulolytic enzyme hyperproducer, and enzymatic saccharification of exploded wood. Agric. Biol. Chem., 54(2): 535-536, 1990.

YAZDI, M.T.; RADFORD, A.; KEEN, J.N.; WOODWARD, J.R. Cellulase production by *Neurospora crassa*: purification and characterization of cellulolytic enzymes. Enzyme Microb. Technol., 12: 120-123, 1990.

APÊNDICE

Meios de Cultura

1. Meio de Isolamento

	celulose tratada com H_2PO_4	5,0g/l
*	$(NH_4)_2SO_4$	1,4g/l
	KH_2PO_4	2,0g/l
	Ureia	0,3g/l
	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,3g/l
	$CaCl_2$	0,3g/l
	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	5,0mg/l
	$MnSO_4 \cdot H_2O$	1,56mg/l
	$CoCl_2$	2,0 mg/l
	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	1,40mg/l
	rosa de bengala	50 mg/l
	Tritonx100	1,0 ml/l
	ágar	20g/l

pH = 5,0

* Solução de sais base

2. Meio de Seleção

microrganismo	composição do meio	pH
fungo	. sais do meio de isolamento	≈4,8
bactéria	. sais do meio de isolamento . peptona (1,5g/l) . extrato de levedura (1,0g/l)	≈7,0
levedura	. sais do meio de isolamento . peptona (1,0g/l) . extrato de levedura (0,5g/l)	≈8,0

3. Meio Líquido Base

peptona	0.75g/l
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1,4 g/l
KH_2PO_4	2,0 g/l
Uréia	0,3 g/l
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,3 g/l
CaCl_2	0,3 g/l
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	5,0 mg/l
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	1,56mg/l
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1,4 mg/l
CaCl_2	2,0 mg/l
Tween 80	1 ml/l

pH $\cong$ 5,0