



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS

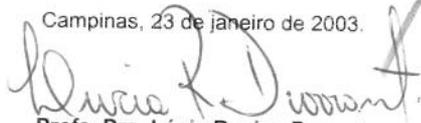


FUNGOS MICROAERÓBIOS NA BIOCONVERSÃO DE MATERIAL LIGNOCELULÓSICO

PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por **Erika Cristina Pavarina** aprovada pela Comissão Julgadora em 23 de janeiro de 2003.

Campinas, 23 de janeiro de 2003.

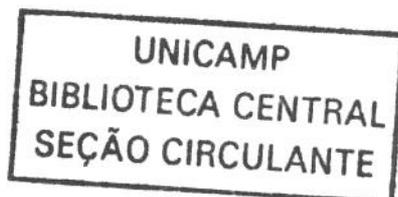

Prof. Dra. Lúcia Regina Durrant
Presidente da Banca

ERIKA CRISTINA PAVARINA
Farmacêutica

Prof^ª. Dr^ª. LUCIA REGINA DURRANT
Orientadora

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos, da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de doutor em Ciência de Alimentos.

Campinas / 2002



2003075203

UNIDADE BC
Nº CHAMADA T/UNICAMP
P 288f
V _____ EX. _____
TOMBO BCI 52725
PROC 16-124/03
C _____ D X
PREÇO R\$ 11,00
DATA 15/03/03
Nº CPD _____

CM00180988-1

BIB ID 284955

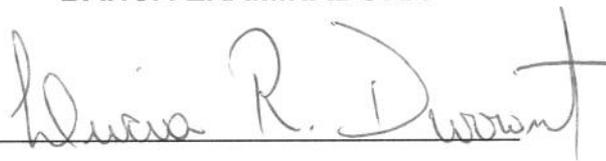
FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA F.E.A. – UNICAMP

P288f Pavarina, Erika Cristina
Fungos microaeróbios na bioconversão de material
lignocelulósico / Erika Cristina Pavarina. –
Campinas, SP: [s.n.], 2002.

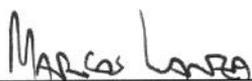
Orientador: Lucia Regina Durrant
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de
Engenharia de Alimentos.

1.Fungos. 2.Biodegradação. 3.Enzimas. 4.Lignocelulose.
5.Fermentação. I.Durrant, Lucia Regina. II.Universidade
Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos.
III.Título.

BANCA EXAMINADORA



Prof.^a Dr.^a Lucia Regina Durrant
(ORIENTADORA)



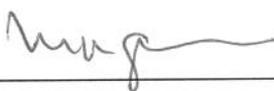
Prof. Dr. Marcos R.V. Lanza
(MEMBRO)



Prof.^a Dr.^a Tânia A. Anazawa
(MEMBRO)



Prof.^a Dr.^a Doralice S.L. Balan
(MEMBRO)



Prof.^a Dr.^a Maria Raquel Oriani
(MEMBRO)

Prof.^a Dr.^a Telma T. Franco
(MEMBRO)

Prof. Dr. Raúl J.H. Castro
(MEMBRO)

*“Há um tempo certo para cada coisa:
Tempo para nascer, tempo para morrer;
Tempo para plantar, tempo para colher;
Tempo para destruir, tempo para construir de novo;
Tempo de chorar, tempo para rir;
Tempo para ficar triste, tempo para se alegrar;
Tempo para abraçar, tempo para não abraçar;
Tempo para procurar, tempo para perder;
Tempo para ficar quieto, tempo para falar;
Tempo para amar.”*

Livro da Sabedoria

Aos meus pais e irmão, Edmir, Marlene e Carlos;
Ao meu marido Oswaldo e minha filha Taís;
pelo amor, dedicação, compreensão e constante incentivo;

dedico

À Lucia Regina Durrant, pela orientação segura, notável competência e incentivo;
grande amizade;

À Fundação de Amparo a Pesquisa do estado de São Paulo (FAPESP), pelo suporte
financeiro dispensado;

Ao Departamento de Ciência de Alimentos da FEA-UNICAMP, por tornar possível a
realização deste trabalho;

À banca examinadora pelas sugestões que aprimoraram este trabalho;

À Patrícia e Elede pelo apoio nas horas de alegria e tristeza;

À família pela cumplicidade total, apoio e carinho;

À Andrea, Eliane, Fabiana, Hamilton e Ísis, pelas horas de trabalho e descontração, e
às meninas do Laboratório de Sistemática e Fisiologia Microbiana pelo apoio recebido,
atenção e amizade;

Ao pessoal da Dia a Dia, em especial à Laíra, pela compreensão e otimismo.

Agradeço

ÍNDICE GERAL

	Pág.
LISTA DE TABELAS.....	xii
LISTA DE FIGURAS.....	xiii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xxi
RESUMO.....	xxii
ABSTRACT.....	xxiii
1. INTRODUÇÃO.....	01
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	04
2.1. Material lignocelulósico.....	04
2.2. Estrutura da celulose.....	06
2.2.1. Sistema enzimático celulolítico.....	08
2.2.1.1. Endo-1,4- β -D-Glucanase.....	09
2.2.1.2. Exo-1,4- β -D-Glucanase.....	09
2.2.1.3. β -D-Glicosidase.....	10
2.2.2. Microrganismos produtores de celulases.....	11
2.2.2.1. Produção de celulases por fungos.....	12
2.2.2.2. Produção de celulases por bactérias.....	14
2.3. Estrutura da hemicelulose.....	15
2.3.1. Sistema enzimático hemicelulolítico.....	16
2.3.2. Microrganismos produtores de hemicelulases.....	17
2.3.2.1. Produção por fungos.....	17
2.3.2.2. Produção por bactérias.....	17
2.4. Estrutura da lignina.....	18
2.4.1. Sistema enzimático ligninolítico.....	20
2.4.1.1. Lignina Peroxidase.....	21
2.4.1.2. Manganês Peroxidase.....	22
2.4.1.3. Lacase.....	25
2.4.2. Microrganismos produtores de ligninases.....	26
2.4.2.1. Fungos produtores de ligninases.....	29
2.4.2.2. Bactérias produtoras de ligninases.....	31
2.5. Bioconversão de lignocelulose.....	32

2.6.	Aplicação das enzimas lignocelulósicas.....	36
3.	MATERIAL E MÉTODOS.....	39
3.1.	Microrganismos.....	39
3.2.	Inóculo.....	39
3.3.	Fontes de carbono.....	40
3.4.	Meios de cultura.....	40
3.5.	Condições ambientais.....	42
3.5.1.	Cultivo sob condição aeróbica.....	42
3.5.2.	Cultivo sob condição microaeróbica.....	43
3.5.3.	Cultivo sob condição anaeróbica.....	43
3.6.	Condições de cultivo.....	43
3.6.1.	Crescimento aeróbico em diferentes meios de cultivo.....	43
3.6.1.1.	Seleção do melhor meio de cultivo por análise visual do crescimento..	43
3.6.1.2.	Seleção do meio de cultivo por atividade enzimática.....	44
3.6.2.	Crescimento em bagaço de cana e serragem.....	44
3.6.2.1.	Avaliação do crescimento aneróbico e microaeróbico em bagaço de cana e serragem (1%) e produção das enzimas ligninolíticas e celulolíticas	44
3.6.2.2.	Avaliação do crescimento microaeróbico em bagaço de cana e serragem (2%) e produção das enzimas celulolíticas e ligninolíticas....	45
3.6.3.	Avaliação do crescimento microaeróbico e anaeróbico e atividade das enzimas celulolíticas e ligninolíticas sob diferentes fontes de carbono.....	45
3.6.4.	Crescimento em meio contendo papel jornal como fonte de carbono...	45
3.6.4.1.	Análise visual do crescimento das linhagens em papel jornal e papel refugo sob condição aeróbica.....	45
3.6.4.2.	Avaliação das atividades enzimáticas celulolíticas e ligninolíticas após crescimento das linhagens em papel jornal sob condição microaeróbica.....	46
3.6.5.	Avaliação da composição das frações fibras após crescimento das linhagens em meio contendo bagaço de cana, serragem e papel jornal.....	46
3.6.6.	Crescimento variando as condições de oxigenação e determinação das atividades enzimáticas celulolíticas e ligninolíticas em reação e em gel (zimograma) e produção de biomassa fúngica.....	47

3.6.7.	Crescimento microaeróbico em diferentes concentrações de substrato e avaliação da biomassa fúngica e das enzimas celulolíticas e ligninolíticas.....	47
3.6.8.	Efeito de diferentes compostos na fermentação e produção enzimática das linhagens.....	48
3.6.8.1.	Avaliação das atividades enzimáticas celulolíticas e ligninolíticas, e dos produtos de fermentação produzidos pelas linhagens após adição de Tween 80 ao meio de cultivo.....	48
3.6.8.2.	Determinação dos produtos de fermentação produzidos pelas linhagens após adição nutrientes suplementares ao meio de cultivo.....	48
3.6.8.3.	Determinação dos produtos de fermentação produzidos pelas linhagens após adição de diferentes concentrações de cisteína no meio de cultivo.....	49
3.6.9.	Crescimento microaeróbico em meio complemento e determinação das enzimas celulolíticas e ligninolíticas em reação e em gel (zimograma), da biomassa fúngica, dos produtos de fermentação.....	49
3.7.	Determinação do crescimento visual das linhagens.....	50
3.8.	Preparo das amostras para as análises experimentais.....	50
3.9.	Determinação das atividades enzimáticas ligninolíticas.....	51
3.9.1.	Lignina Peroxidase.....	51
3.9.2.	Manganês Peroxidase.....	52
3.9.3.	Lacase.....	52
3.9.4.	Peroxidase.....	53
3.10.	Determinação das atividades enzimáticas celulolíticas.....	53
3.10.1.	Carboximetilcelulase.....	53
3.10.2.	Avicelase.....	54
3.10.3.	β -Glicosidase.....	54
3.11.	Determinação de biomassa fúngica.....	55
3.12.	Determinação dos produtos de fermentação.....	55
3.13.	Determinação das frações fibras.....	56
3.14.	Determinação das bandas de atividade enzimática em gel de poliacrilamida – zimograma.....	57
3.14.1.	Atividade manganês peroxidase.....	59
3.14.2.	Atividade β -Glicosidase.....	59
3.14.3.	Atividade lacase.....	60

3.14.4.	Atividade carboximetilcelulase.....	60
4.	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	61
4.1.	Crescimento aeróbico em diferentes meios de cultivo.....	61
4.1.1.	Seleção do melhor meio de cultivo por análise visual do crescimento..	61
4.1.2.	Seleção do meio de cultivo por atividade enzimática.....	62
4.2.	Crescimento em bagaço de cana e serragem.....	70
4.2.1.	Avaliação do crescimento anaeróbico e microaeróbico em bagaço de cana e serragem (1%) e produção das enzimas ligninolíticas e celulolíticas	70
4.2.2.	Avaliação do crescimento microaeróbico em bagaço de cana e serragem (2%) e produção das enzimas celulolíticas e ligninolíticas....	75
4.3.	Avaliação do crescimento microaeróbico e anaeróbico e produção das enzimas celulolíticas e ligninolíticas em diferentes fontes de carbono.....	78
4.4.	Crescimento em meio contendo papel jornal como fonte de carbono...	83
4.4.1.	Análise visual do crescimento das linhagens em papel jornal e papel refugo sob condição aeróbica.....	83
4.4.2.	Avaliação das atividades enzimáticas celulolíticas e ligninolíticas após crescimento dos fungos em papel jornal sob condição microaeróbica..	84
4.5.	Avaliação da composição das frações fibras após crescimento das linhagens em meio contendo bagaço de cana, serragem e papel jornal.....	88
4.6.	Crescimento variando as condições de oxigenação e determinação das atividades enzimáticas celulolíticas e ligninolíticas em reação e em gel (zimograma) e produção de biomassa fúngica.....	89
4.6.1.	Atividade de carboximetilcelulase.....	90
4.6.1.1	Atividade de carboximetilcelulase em gel.....	91
4.6.2.	Atividade de avicelase.....	92
4.6.3.	Atividade de β -glicosidase.....	94
4.6.3.1.	Atividade de β -glicosidase em gel.....	95
4.6.4.	Atividade de lignina peroxidase.....	96
4.6.5.	Atividade de manganês peroxidase.....	98
4.6.5.1.	Atividade de manganês peroxidase em gel.....	99
4.6.6.	Atividade de lacase.....	100
4.6.7	Atividade de peroxidase.....	101

4.6.8.	Biomassa fúngica.....	103
4.7.	Crescimento microaeróbico em diferentes concentrações de substrato e avaliação da biomassa fúngica e das enzimas celulolíticas e ligninolíticas.....	104
4.8.	Efeito de diferentes compostos na fermentação e atividade enzimática das linhagens.....	116
4.8.1.	Avaliação das atividades enzimáticas celulolíticas e ligninolíticas, e dos produtos de fermentação produzidos pelas linhagens após adição de Tween 80 ao meio de cultivo.....	116
4.8.2.	Determinação dos produtos de fermentação produzidos pelas linhagens após adição nutrientes suplementares ao meio de cultivo....	125
4.8.3.	Determinação dos produtos de fermentação produzidos pelas linhagens após adição de diferentes concentrações de cisteína no meio de cultivo.....	128
4.9.	Crescimento microaeróbico em meio complemento e determinação das enzimas celulolíticas e ligninolíticas em reação e em gel (zimograma), da biomassa fúngica, dos produtos de fermentação.....	130
4.9.1.	Atividades enzimáticas.....	131
4.9.2.	Determinação das bandas de atividade enzimática em gel.....	137
4.9.2.1.	Lacase.....	137
4.9.2.2.	Manganês peroxidase.....	138
4.9.2.3.	β -glicosidase.....	139
4.9.3.	Produtos de fermentação.....	142
5.	CONCLUSÃO.....	149
6.	BIBLIOGRAFIA.....	151

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	-	Microorganismos produtores de celulases.....	11
TABELA 2	-	Microorganismos que degradam a lignina.....	29
TABELA 3	-	Composição dos diferentes meios de cultivo líquidos utilizados...	41
TABELA 4	-	Composição do gel de poliacrilamida.....	58
TABELA 5	-	Composição do gel contendo substrato carboximetilcelulose (CMC).....	58
TABELA 6	-	Crescimento das linhagens em meio contendo papel de filtro.....	61
TABELA 7	-	Crescimento das linhagens em meio contendo papel jornal e papel refugio (1%).....	84
TABELA 8	-	Porcentagem de celulose e lignina presentes no bagaço de cana, serragem e papel jornal após crescimento das linhagens H2, <i>T. canadense</i> (Q10), <i>F. oxysporum</i> (FUS), LH5 e <i>G. terrestre</i> (LD) e nas amostras controle (CT) em diferentes fontes de carbono sob condição microaeróbica.....	88
TABELA 9	-	Amostras utilizadas no zimograma da enzima carboximetilcelulase.....	91
TABELA 10	-	Amostras utilizadas no zimograma da enzima β -glicosidase.....	95
TABELA 11	-	Amostras utilizadas no zimograma da enzima manganês peroxidase.....	99
TABELA 12	-	Produção de etanol após crescimento das linhagens em meio nutriente contendo adição de tween 80.....	123
TABELA 13	-	Produção de etanol após crescimento das linhagens em meio nutriente contendo adição de nutrientes suplementares.....	127
TABELA 14	-	Produção de etanol após crescimento das linhagens em meio nutriente contendo diferentes concentrações de cisteína.....	130
TABELA 15	-	Amostras utilizadas no zimograma da enzima lacase.....	137
TABELA 16	-	Amostras utilizadas no zimograma da enzima manganês peroxidase.....	138
TABELA 17	-	Amostras utilizadas no zimograma da enzima β -glicosidase.....	139
TABELA 18	-	Produção de etanol após crescimento das linhagens em meio complemento.....	145

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 -	Estrutura da celulose. (A) Ligações β -glicosídicas. (B) estrutura esquemática de uma fibrila.....	07
FIGURA 2 -	Ação das enzimas celulolíticas.....	10
FIGURA 3 -	Estrutura da hemicelulose.....	16
FIGURA 4 -	Estrutura da lignina.....	18
FIGURA 5 -	Precusores da lignina (A: álcool <i>p</i> -cumarílico, B: álcool coniferílico; C: álcool sinapílico).....	19
FIGURA 6 -	Ciclo catalítico da enzima lignina peroxidase.....	22
FIGURA 7 -	Ciclo catalítico da enzima manganês peroxidase.....	24
FIGURA 8 -	Representação de uma reação típica catalisada por uma lacase..	26
FIGURA 9 -	Atividade celulolítica das linhagens crescidas por 7, 14, 21 e 30 dias (7d, 14d, 21d e 30d), sob condição aeróbica em meio nutriente (NB) e em meio extratos (EB) contendo bagaço de cana. A – Carboximetilcelulase, B – Avicelase e C – β -glicosidase. Linhagens: basidiomiceto H2, deuteromicetos LH5, F.870 e F.1039, <i>G. terrestre</i> (LD) e <i>F. oxysporum</i> (FUS).....	63
FIGURA 10 -	Atividade celulolítica das linhagens crescidas por 7, 14, 21 e 30 dias (7d, 14d, 21d e 30d), sob condição aeróbica em meio nutriente (NS) e em meio extratos (ES) contendo serragem. A – Carboximetilcelulase, B – Avicelase e C – β -glicosidase. Linhagens: basidiomiceto H2, deuteromicetos LH5, F.870 e F.1039, <i>G. terrestre</i> (LD) e <i>F. oxysporum</i> (FUS).....	64
FIGURA 11 -	Atividade ligninolítica das linhagens crescidas por 7, 14, 21 e 30 dias (7d, 14d, 21d e 30d), sob condição aeróbica em meio nutriente (NB) e em meio extratos (EB) contendo bagaço de cana. A – Lignina peroxidase, B – Lacase e C – manganês peroxidase. Linhagens: basidiomiceto H2, deuteromicetos LH5, F.870 e F.1039, <i>G. terrestre</i> (LD) e <i>F. oxysporum</i> (FUS).....	66
FIGURA 12 -	Atividade ligninolítica das linhagens crescidas por 7, 14, 21 e 30 dias (7d, 14d, 21d e 30d), sob condição aeróbica em meio nutriente (NS) e em meio extratos (ES) contendo serragem. A – Lignina peroxidase, B – Lacase e C – manganês peroxidase. Linhagens: basidiomiceto H2, deuteromicetos LH5, F.870 e F.1039, <i>G. terrestre</i> (LD) e <i>F. oxysporum</i> (FUS).....	67

- FIGURA 13 -** Atividades ligninolíticas das linhagens crescidas por 20 dias, sob condição anaeróbica em meio nutriente contendo bagaço de cana (ANB) ou serragem (ANS) e sob condição microaeróbica em meio nutriente contendo bagaço de cana (MNB) ou serragem (MNS). A – Lignina peroxidase, B – Lacase e C – manganês peroxidase. Linhagens: basidiomiceto H2, deuteromicetos LH5, F.870 e F.1039, *G. terrestre* (LD) e *F. oxysporum* (FUS)..... 71
- FIGURA 14 -** Atividades celulolíticas das linhagens crescidas por 20 dias, sob condição anaeróbica em meio nutriente contendo bagaço de cana (ANB) ou serragem (ANS) e sob condição microaeróbica em meio nutriente contendo bagaço de cana (MNB) ou serragem (MNS). A – Carboximetilcelulase, B – Avicelase e C – β -glicosidase. Linhagens: basidiomiceto H2, deuteromicetos LH5, F.870 e F.1039, *G. terrestre* (LD) e *F. oxysporum* (FUS)..... 73
- FIGURA 15 -** Atividades celulolíticas das linhagens crescidas por 20 dias, sob condição microaeróbica em meio nutriente contendo bagaço de cana (B) ou serragem (S). Carboximetilcelulase (CMCase), Avicelase e β -glicosidase. Linhagens: basidiomiceto H2, deuteromiceto LH5, *G. terrestre* (LD) e *F. oxysporum* (FUS)..... 76
- FIGURA 16 -** Atividades ligninolíticas das linhagens crescidas por 20 dias, sob condição microaeróbica em meio nutriente contendo bagaço de cana (B) ou serragem (S). Lignina peroxidase (LiP), Lacase (Lac) e manganês peroxidase (MnP) Linhagens: basidiomiceto H2, deuteromiceto LH5, *G. terrestre* (LD) e *F. oxysporum* (FUS). 77
- FIGURA 17 -** Atividades celulolíticas das linhagens crescidas por 20 dias, sob condição microaeróbica e anaeróbica em meio nutriente contendo xilana (X), ac. lignossulfônico (AL), avicel (Av) ou papel jornal (PJ). A – Carboximetilcelulase, B – Avicelase e C – β -glicosidase. Linhagens: basidiomiceto H2, deuteromiceto LH5, *G. terrestre* (LD) e *F. oxysporum* (FUS)..... 79
- FIGURA 18 -** Atividades ligninolíticas das linhagens crescidas por 20 dias, sob condição microaeróbica e anaeróbica em meio nutriente contendo xilana (X), ac. lignossulfônico (AL), avicel (Av) ou papel jornal (PJ). A - Lignina peroxidase, B - Lacase e C - manganês peroxidase (MnP) Linhagens: basidiomiceto H2, deuteromiceto LH5, *G. terrestre* (LD) e *F. oxysporum* (FUS)..... 81
- FIGURA 19 -** Atividades enzimáticas das linhagens crescidas por 20,30 e 40 dias (20d, 30d e 40d), sob condição microaeróbica em meio nutriente contendo papel jornal. A - lignina peroxidase (LiP), Lacase (Lac) e manganês peroxidase (MnP); B - carboximetilcelulase (CMCase), avicelase e β -glicosidase. Linhagens: basidiomiceto H2, deuteromiceto LH5, *G. terrestre* (LD), *F. oxysporum* (FUS) e *T. canadense* (Q10)..... 85

- FIGURA 20 -** Atividade de carboximetilcelulase das linhagens crescidas sob diferentes condições de oxigenação: A (14 dias agitação e 7 dias microaeróbico), B (7 dias agitação e 21 dias microaeróbico) e C (7 dias agitação e 14 dias microaeróbico) em meio nutriente contendo bagaço de cana, serragem ou papel jornal nas concentrações de 4% (B4, S4 e J4) e 10% (B10, S10 e J10). Linhagens: basidiomiceto H2, *T. canadense* (Q10), deuteromiceto LH5, *F. oxysporum* (FUS) e *G. terrestre* (LD)..... 90
- FIGURA 21 -** Atividade de avicelase das linhagens crescidas sob diferentes condições de oxigenação: A (14 dias agitação e 7 dias microaeróbico), B (7 dias agitação e 21 dias microaeróbico) e C (7 dias agitação e 14 dias microaeróbico) em meio nutriente contendo bagaço de cana, serragem ou papel jornal nas concentrações de 4% (B4, S4 e J4) e 10% (B10, S10 e J10). Linhagens: basidiomiceto H2, *T. canadense* (Q10), deuteromiceto LH5, *F. oxysporum* (FUS) e *G. terrestre* (LD)..... 93
- FIGURA 22 -** Atividade de β -glicosidase das linhagens crescidas sob diferentes condições de oxigenação: A (14 dias agitação e 7 dias microaeróbico), B (7 dias agitação e 21 dias microaeróbico) e C (7 dias agitação e 14 dias microaeróbico) em meio nutriente contendo bagaço de cana, serragem ou papel jornal nas concentrações de 4% (B4, S4 e J4) e 10% (B10, S10 e J10). Linhagens: basidiomiceto H2, *T. canadense* (Q10), deuteromiceto LH5, *F. oxysporum* (FUS) e *G. terrestre* (LD)..... 94
- FIGURA 23 -** Atividade de lignina peroxidase das linhagens crescidas sob diferentes condições de oxigenação: A (14 dias agitação e 7 dias microaeróbico), B (7 dias agitação e 21 dias microaeróbico) e C (7 dias agitação e 14 dias microaeróbico) em meio nutriente contendo bagaço de cana, serragem ou papel jornal nas concentrações de 4% (B4, S4 e J4) e 10% (B10, S10 e J10). Linhagens: basidiomiceto H2, *T. canadense* (Q10), deuteromiceto LH5, *F. oxysporum* (FUS) e *G. terrestre* (LD)..... 97
- FIGURA 24 -** Atividade de manganês peroxidase das linhagens crescidas sob diferentes condições de oxigenação: A (14 dias agitação e 7 dias microaeróbico), B (7 dias agitação e 21 dias microaeróbico) e C (7 dias agitação e 14 dias microaeróbico) em meio nutriente contendo bagaço de cana, serragem ou papel jornal nas concentrações de 4% (B4, S4 e J4) e 10% (B10, S10 e J10). Linhagens: basidiomiceto H2, *T. canadense* (Q10), deuteromiceto LH5, *F. oxysporum* (FUS) e *G. terrestre* (LD)..... 98

- FIGURA 25 -** Atividade de lacase das linhagens crescidas sob diferentes condições de oxigenação: A (14 dias agitação e 7 dias microaeróbico), B (7 dias agitação e 21 dias microaeróbico) e C (7 dias agitação e 14 dias microaeróbico) em meio nutriente contendo bagaço de cana, serragem ou papel jornal nas concentrações de 4% (B4, S4 e J4) e 10% (B10, S10 e J10). Linhagens: basidiomiceto H2, *T. canadense* (Q10), deuteromiceto LH5, *F. oxysporum* (FUS) e *G. terrestre* (LD)..... 100
- FIGURA 26 -** Atividade de peroxidase das linhagens crescidas sob diferentes condições de oxigenação: A (14 dias agitação e 7 dias microaeróbico), B (7 dias agitação e 21 dias microaeróbico) e C (7 dias agitação e 14 dias microaeróbico) em meio nutriente contendo bagaço de cana, serragem ou papel jornal nas concentrações de 4% (B4, S4 e J4) e 10% (B10, S10 e J10). Linhagens: basidiomiceto H2, *T. canadense* (Q10), deuteromiceto LH5, *F. oxysporum* (FUS) e *G. terrestre* (LD)..... 102
- FIGURA 27 -** Biomassa fúngica das linhagens crescidas sob diferentes condições de oxigenação: A (14 dias agitação e 7 dias microaeróbico), B (7 dias agitação e 21 dias microaeróbico) e C (7 dias agitação e 14 dias microaeróbico) em meio nutriente contendo bagaço de cana, serragem ou papel jornal nas concentrações de 4% (B4, S4 e J4) e 10% (B10, S10 e J10). Linhagens: basidiomiceto H2, *T. canadense* (Q10), deuteromiceto LH5, *F. oxysporum* (FUS) e *G. terrestre* (LD)..... 104
- FIGURA 28 -** Atividades enzimáticas do basidiomiceto H2 quando crescido por 20, 30 e 40 dias (20d, 30d e 40d), sob condição microaeróbica em meio nutriente contendo bagaço de cana ou serragem nas concentrações de 4% (B4 e S4) e 10% (B10 e S10). A - lignina peroxidase (LiP), Lacase (Lac) e manganês peroxidase (MnP); B - carboximetilcelulase (CMCase), avicelase e β -glicosidase..... 105
- FIGURA 29 -** Biomassa fúngica do basidiomiceto H2 quando crescido por 20, 30 e 40 dias (20d, 30d e 40d), sob condição microaeróbica em meio nutriente contendo bagaço de cana ou serragem nas concentrações de 4% (B4 e S4) e 10% (B10 e S10)..... 106
- FIGURA 30 -** Atividades enzimáticas do deuteromiceto LH5 quando crescido por 20, 30 e 40 dias (20d, 30d e 40d), sob condição microaeróbica em meio nutriente contendo bagaço de cana ou serragem nas concentrações de 4% (B4 e S4) e 10% (B10 e S10). A - lignina peroxidase (LiP), Lacase (Lac) e manganês peroxidase (MnP); B - carboximetilcelulase (CMCase), avicelase e β -glicosidase..... 107

FIGURA 31 -	Biomassa fúngica do deuteromiceto LH5 quando crescido por 20, 30 e 40 dias (20d, 30d e 40d), sob condição microaeróbica em meio nutriente contendo bagaço de cana ou serragem nas concentrações de 4% (B4 e S4) e 10% (B10 e S10).....	108
FIGURA 32 -	Atividades enzimáticas da linhagem <i>G. terrestre</i> (LD) quando crescida por 20, 30 e 40 dias (20d, 30d e 40d), sob condição microaeróbica em meio nutriente contendo bagaço de cana ou serragem nas concentrações de 4% (B4 e S4) e 10% (B10 e S10). A - lignina peroxidase (LiP), Lacase (Lac) e manganês peroxidase (MnP); B - carboximetilcelulase (CMCase), avicelase e β -glicosidase.....	109
FIGURA 33 -	Biomassa fúngica da linhagem <i>G. terrestre</i> (LD) quando crescida por 20, 30 e 40 dias (20d, 30d e 40d), sob condição microaeróbica em meio nutriente contendo bagaço de cana ou serragem nas concentrações de 4% (B4 e S4) e 10% (B10 e S10).....	110
FIGURA 34 -	Atividades enzimáticas da linhagem <i>F. oxysporum</i> (FUS) quando crescida por 20, 30 e 40 dias (20d, 30d e 40d), sob condição microaeróbica em meio nutriente contendo bagaço de cana ou serragem nas concentrações de 4% (B4 e S4) e 10% (B10 e S10). A - lignina peroxidase (LiP), Lacase (Lac) e manganês peroxidase (MnP); B - carboximetilcelulase (CMCase), avicelase e β -glicosidase.....	111
FIGURA 35 -	Biomassa fúngica da linhagem <i>F. oxysporum</i> (FUS) quando crescida por 20, 30 e 40 dias (20d, 30d e 40d), sob condição microaeróbica em meio nutriente contendo bagaço de cana ou serragem nas concentrações de 4% (B4 e S4) e 10% (B10 e S10).....	112
FIGURA 36 -	Atividades enzimáticas da linhagem <i>T. canadense</i> (Q10) quando crescida por 20, 30 e 40 dias (20d, 30d e 40d), sob condição microaeróbica em meio nutriente contendo bagaço de cana ou serragem nas concentrações de 4% (B4 e S4) e 10% (B10 e S10). A - lignina peroxidase (LiP), Lacase (Lac) e manganês peroxidase (MnP); B - carboximetilcelulase (CMCase), avicelase e β -glicosidase.....	113
FIGURA 37 -	Biomassa fúngica da linhagem <i>T. canadense</i> (Q10) quando crescida por 20, 30 e 40 dias (20d, 30d e 40d), sob condição microaeróbica em meio nutriente contendo bagaço de cana ou serragem nas concentrações de 4% (B4 e S4) e 10% (B10 e S10).....	114

FIGURA 38 -	Atividades celulolíticas das linhagens crescidas por 30 dias sob condição microaeróbica em meio nutriente nas seguintes condições: 0T – sem tween 80; 1T – 0,5 mL/L tween 80; 2T – 1,0 mL/L tween 80; 3T – 2,0 mL/L tween 80; contendo serragem (S) ou bagaço de cana (B). A – Carboximetilcelulase, B – Avicelase e C - β -glicosidase. Linhagens: basidiomiceto H2, <i>F. oxysporum</i> (FUS) e <i>G. terrestre</i> (LD).....	117
FIGURA 39 -	Atividades ligninolíticas das linhagens crescidas por 30 dias sob condição microaeróbica em meio nutriente nas seguintes condições: 0T – sem tween 80; 1T – 0,5 mL/L tween 80; 2T – 1,0 mL/L tween 80; 3T – 2,0 mL/L tween 80; contendo serragem (S) ou bagaço de cana (B). A – Carboximetilcelulase, B – Avicelase e C - β -glicosidase. Linhagens: basidiomiceto H2, <i>F. oxysporum</i> (FUS) e <i>G. terrestre</i> (LD).....	119
FIGURA 40 -	Produtos de fermentação produzidos pelas linhagens crescidas por 30 dias sob condição microaeróbica em meio nutriente nas seguintes condições: 0T – sem tween 80; 1T – 0,5 mL/L tween 80; 2T – 1,0 mL/L tween 80; 3T – 2,0 mL/L tween 80; contendo A) bagaço de cana (B) ou B) serragem (S); Linhagens: basidiomiceto H2, <i>F. oxysporum</i> (FUS) e <i>G. terrestre</i> (LD).....	121
FIGURA 41 -	Produtos de fermentação produzidos pelas linhagens crescidas por 30 dias sob condição microaeróbica em meio nutriente nas seguintes condições: SN – sem suplementos; Fe – Citrato Férrico Amoníaco; K - KNO_3 ; Se - Na_2SeO_3 e Mn - MnO_2 , contendo: A) bagaço de cana ou B) serragem na concentração final de 4%. Linhagens: basidiomiceto H2, <i>F. oxysporum</i> (FUS) e <i>G. terrestre</i> (LD).....	125
FIGURA 42 -	Produtos de fermentação produzidos pelas linhagens crescidas por 30 dias sob condição microaeróbica em meio nutriente nas seguintes condições: 0C – sem cisteína; 1C - 0,025% de cisteína; 2C - 0,05% de cisteína; 3C - 0,1% de cisteína e 4C - 0,15% de cisteína, contendo: A) bagaço de cana ou B) serragem na concentração final de 4%. Linhagens: basidiomiceto H2, <i>F. oxysporum</i> (FUS) e <i>G. terrestre</i> (LD).....	128
FIGURA 43 -	Atividades enzimáticas do basidiomiceto H2 quando crescido por 20, 30, 40, 60 e 90 dias (20d, 30d, 40d, 60d e 90d), sob condição microaeróbica em meio complemento contendo: I) bagaço de cana ou II) serragem nas concentrações de 4% (B4 e S4), 10% (B10 e S10) e 20% (B20 e S20). A – carboximetilcelulase (CMCase), avicelase e β -glicosidase, B – lignina peroxidase (LiP), lacase (Lac), peroxidase (Per) e manganês peroxidase (MnP).....	131

- FIGURA 44 -** Biomassa fúngica do basidiomiceto H2 quando crescido por 20, 30, 40, 60 e 90 dias (20d, 30d, 40d, 60d e 90d), sob condição microaeróbica em meio complemento contendo bagaço de cana ou serragem nas concentrações de 4% (B4 e S4), 10% (B10 e S10) e 20% (B20 e S20)..... 132
- FIGURA 45 -** Atividades enzimáticas da linhagem *F. oxysporum* quando crescida por 20, 30, 40, 60 e 90 dias (20d, 30d, 40d, 60d e 90d), sob condição microaeróbica em meio complemento contendo: I) bagaço de cana ou II) serragem nas concentrações de 4% (B4 e S4), 10% (B10 e S10) e 20% (B20 e S20). A – carboximetilcelulase (CMCase), avicelase e β -glicosidase, B – lignina peroxidase (LiP), lacase (Lac), peroxidase (Per) e manganês peroxidase (MnP)..... 133
- FIGURA 46 -** Biomassa fúngica da linhagem *F. oxysporum* quando crescida por 20, 30, 40, 60 e 90 dias (20d, 30d, 40d, 60d e 90d), sob condição microaeróbica em meio complemento contendo bagaço de cana ou serragem nas concentrações de 4% (B4 e S4), 10% (B10 e S10) e 20% (B20 e S20)..... 134
- FIGURA 47 -** Atividades enzimáticas da linhagem *G. terrestre* quando crescida por 20, 30, 40, 60 e 90 dias (20d, 30d, 40d, 60d e 90d), sob condição microaeróbica em meio complemento contendo: I) bagaço de cana ou II) serragem nas concentrações de 4% (B4 e S4), 10% (B10 e S10) e 20% (B20 e S20). A – carboximetilcelulase (CMCase), avicelase e β -glicosidase, B – lignina peroxidase (LiP), lacase (Lac), peroxidase (Per) e manganês peroxidase (MnP)..... 135
- FIGURA 48 -** Biomassa fúngica da linhagem *G. terrestre* quando crescida por 20, 30, 40, 60 e 90 dias (20d, 30d, 40d, 60d e 90d), sob condição microaeróbica em meio complemento contendo bagaço de cana ou serragem nas concentrações de 4% (B4 e S4), 10% (B10 e S10) e 20% (B20 e S20)..... 136
- FIGURA 49 -** Produtos de fermentação produzidos pelas linhagens quando crescidas por 20, 30, 40, 60 e 90 dias (20d, 30d, 40d, 60d e 90d), sob condição microaeróbica em meio complemento contendo bagaço de cana nas concentrações de 4% (B4), 10% (B10) e 20% (B20) ou serragem nas concentrações de 4% (S4), 10% (S10) e 20% (S20). Linhagens: A) basidiomiceto H2, B) *F. oxysporum* (FUS) e C) *G. terrestre* (LD)..... 142

- FIGURA 50 -** Perfil cromatográfico da produção de ácido acético quando a linhagem *G. terrestre* (LD) foi inoculada em meio contendo serragem 10%, 60 dias de cultivo, sob condição microaeróbica. A – Controle; B - linhagem *G. terrestre*. Condições cromatográficas: Coluna Supelcogel C61OH; Fase móvel: H₃PO₄ 0,1%; Vazão: 0,5 ml.min⁻¹; Detecção: UV 210 nm; Quantidade injetada: 20 µL..... 144
- FIGURA 51 -** Perfil cromatográfico da produção de etanol quando a linhagem H2 foi inoculada em meio contendo serragem 4%, 90 dias de cultivo, sob condição microaeróbica. A – Controle; B - Basidiomiceto H2. Condições cromatográficas: Coluna Supelcogel C61OH; Fase móvel: H₃PO₄ 0,1%; Vazão: 0,5 ml.min⁻¹; Detecção: IR; Quantidade injetada: 20 µL..... 147

RESUMO

A maior fração que compõe a biomassa lignocelulósica é a celulose, representando o material orgânico renovável mais abundante e viável, que através de conversão biológica, química ou fisiológica, leva a formação de produtos de interesse econômico. A degradação biológica do material lignocelulósico constitui uma das etapas mais importantes do ciclo do carbono. Muitos microrganismos possuem a habilidade de degradar o material lignocelulósico em diferentes graus, metabolizando os compostos intermediários de baixo peso molecular. Os microrganismos celulolíticos possuem um papel importante na degradação da celulose, uma vez que as hifas destes fungos penetram na madeira, liberam enzimas e degradam o material lignocelulósico. A maioria dos microrganismos conhecidos em degradar a celulose eficientemente, produzem um conjunto de enzimas com diferentes especificidades, atuando juntas em sinergismo. A capacidade de produção de enzimas ligninolíticas sob condição microaeróbica pode conferir ao microrganismo vantagem seletiva para sua sobrevivência em meio natural, proporcionando a este uma maior versatilidade em relação aos estritamente aeróbios ou anaeróbios. A fim de verificar a capacidade dos fungos em degradar material lignocelulósico sob diferentes condições microaeróbica, foram testados 7 microrganismos, selecionando-se 3 linhagens: linhagem H2 (basidiomiceto); *Geotrichum terrestre* (levedura) e *Fusarium oxysporum* (fungo imperfeito). As linhagens apresentaram maiores produções das enzimas lignocelulolíticas após crescimento em meio complemento (adição de tween 80, MnO_2 , e ausência de cisteína) quando comparados os resultados obtidos após cultivo em meio nutriente. De acordo com os resultados obtidos durante o desenvolvimento deste trabalho verificou-se que o tween 80 tem influência na secreção enzimática, pois houve aumento na produção das enzimas pelas linhagens. Com relação aos produtos de fermentação obtidos pode-se observar que algumas linhagens apresentaram melhor produção quando tween 80 foi adicionado ao meio, como por exemplo a linhagem *G. terrestre* que apresentou maior produção de ácido cítrico, ácido tartárico, ácido láctico e ácido acético, e pela linhagem H2 com maior produção de etanol. De uma forma geral todos os microrganismos testados foram capazes de degradar e fermentar o material lignocelulósico nas diferentes concentrações de substratos (1%-20%) e produzir as enzimas celulolíticas e ligninolíticas sob condições de baixa oxigenação. Este resultado é importante, uma vez que a degradação da lignina é conhecida como um processo oxidativo e a possibilidade de sua degradação ocorrer em ambientes microaeróbicos implica em novas oportunidades de aplicações biotecnológicas.

LISTA DE ABREVIATURAS

ABTS	2,2'azino-bis(3 etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)
CTAB	Brometo cetil trimetil amônia
CMC	Carboximetilcelulose
CMCase	Carboximetilcelulase
DNS	Ácido dinitro salicílico
FDA	Fibra detergente ácida
Lac	Lacase
LiP	Lignina peroxidase
MnP	Manganês peroxidase
PAGE	Eletroforese de gel de poliacrilamida
Per	Peroxidase
SDS	Dodecil sulfato de sódio
TEMED	NNN'N' tetrametil-etileno-diamina

ABSTRACT

Cellulose accounts for the major part of lignocellulose found in nature, and consequently, its degradation is essential for the operation of the global carbon cycle. Lignocellulose, such as wood, is mainly composed of a mixture of cellulose (40%), hemicellulose (20-30%), and lignin (15-30%). An association of enzymes acting in a concerted fashion degrades cellulose. This cellulase enzyme system consists of three major components, which are referred to as endoglucanase (carboxymethylcellulase), exoglucanase (avicelase), and cellobiase (β -glucosidase). These enzymatic components act synergistically in the hydrolysis of crystalline cellulose. The process by which the microorganisms degrade lignin is oxidative, involving enzymes such as lignin peroxidase, manganese peroxidase, and laccase. Cellulolytic microorganisms are found among various taxonomic groups. They include fungi and bacteria, aerobes and anaerobes, mesophiles and thermophiles and occupy a variety of habitats. Only a few groups of microorganisms are capable of degrading the complex lignin polymers and the white-rot fungi, which cause the greatest degree of mineralization, best exemplify them. Most of the lignocelluloses in nature are oxidized to carbon dioxide by aerobic microorganisms, but a substantial amount is degraded in anaerobic environments such as soil and mud that contain plant material. To verify the microbial capacity to degrade lignocellulosic material under microaerophilic conditions, seven strains were studied and three were selected: *Geotrichum terrestre*, *Fusarium oxysporum* and H2 strain (basidiomycete). The results obtained with strains H2, *F. oxysporum* and *G. terrestre* suggest that they prefer lower oxygen concentrations for growth and enzyme production. Lignocellulolytic activities were detected in all strains but varied with the carbon source used. The highest levels of these activities were produced by strains after growth in the complement media (addition of Tween 80, MnO₂, without cystein), when compared with the result obtained after growth in nutrient media. The results obtained in this study showed that Tween 80 influences the enzymatic activity, due to better enzyme production. Ethanol and other non-gaseous fermentation products were detected following HPLC analysis. Strain H2 showed a greater production of ethanol and *G. terrestre* of citrate, tartarate, lactate and acetate. Since they produce enzymes necessary for the breakdown of lignocellulosic materials and utilize most of the degradation products for growth, these strains show great potential for novel biotechnological applications.

1. INTRODUÇÃO

Na natureza, a biomassa é constituída basicamente de lignocelulose, conseqüentemente, sua degradação é importante para a operação do ciclo global de carbono. A lignocelulose, é composta principalmente por uma mistura de celulose (40%), hemicelulose (20-30%) e lignina (15-25%). A celulose é o principal constituinte da parede celular das plantas sendo o composto orgânico mais abundante na Terra. A hemicelulose, é um polímero de monossacarídeos, seus tipos e a distribuição dos mesmos variam dependendo da fonte de biomassa. A xilana, um polímero de xilose, representa a fração predominante da hemicelulose. A lignina, é um polímero fenilpropano de composição complexa (WYMAN, 1994). Juntas, a celulose e a hemicelulose representam em torno de 65-75% do total da biomassa lignocelulósica, as quais após serem hidrolisadas em seus açúcares, torna-se viável para fermentação (WYMAN, 1996). Além da sua especial importância no ciclo de carbono, a lignocelulose tem grande potencial como uma fonte alternativa de combustível e matéria prima para a indústria química (NIKOLOV, 2000).

Exemplos comuns de biomassa lignocelulósica incluem a madeira, resíduos agrícolas e de processamento industrial, como aqueles gerados pelas indústrias de papel e celulose, têxtil, etc. Porém para utilizá-la se faz necessário a sua conversão para compostos utilizáveis como, glicose, etanol, adubos orgânicos, ração animal e outros.

A maior parte do material lignocelulósico é oxidado a CO_2 na natureza, por microrganismos aeróbios, mas uma quantia substancial (5 - 10%) é degradada em ambientes microaeróbicos ou anaeróbicos, uma vez que a atividade anaeróbica em solos, compostos, pântanos e sedimentos ricos em material lignocelulósico começa próxima a superfície e condições

completamente aeróbicas são usualmente restritas a uma camada fina da crosta (BEGUIN & AUBERT, 1994).

Existe uma grande variedade de microrganismos capazes de degradar material lignocelulósico, mas a degradação da lignina é restrita a poucos organismos (TUOR et al., 1995). A degradação completa da lignina na natureza deve-se ao resultado da ação cooperativa de fungos e bactérias. Todavia, a degradação extensiva da lignina é atribuída a ação de poucos fungos capazes de degradar madeira (TUOR et al., 1995), dos quais os mais importantes são os fungos de degradação branca. Existem várias espécies desses fungos as quais formam um grupo heterogêneo consistindo basicamente de basidiomicetos (TUOMELA, 2000).

Para a degradação da lignocelulose as enzimas celulolíticas e xilanolíticas podem ser produzidas por uma grande variedade de microrganismos, tais como bactérias aeróbicas e anaeróbicas, fungos de degradação branca e de degradação branda e também por fungos microaeróbicos e anaeróbicos.

A utilização biotecnológica da lignocelulose requer um sistema lignocelulolítico eficiente. A bioconversão de materiais lignocelulósicos tem sido impedida pelo alto custo de produção das lignocelulases. Por este motivo, o isolamento de novos microrganismos produtores destas enzimas e estudos relacionados com a sua produção e também com a fermentação direta de material lignocelulósico são bastante importantes.

Sob o ponto de vista da aplicação tecnológica o estudo de fungos ligninolíticos microaeróbios são importantes pelos seguintes fatores:

1. Esses fungos seriam capazes degradar e fermentar a lignocelulose diretamente, podendo então ser utilizados na produção de açúcares e de produtos de fermentação (ex. etanol, acetato, ácido láctico, e outros) ou na produção de enzimas celulolíticas, hemicelulolíticas e ligninolíticas.

2. Pelo fato de também crescerem em lignina eles podem ser utilizados para tratamento de resíduo agrícola, tanto na produção de açúcares ou para aumentar a digestibilidade e conteúdo proteico desses resíduos, que poderiam ser empregados para ração animal.

3. Podem ser utilizados com maior eficiência em fermentações sólidas, nas quais a aeração é um fator importante, uma vez que a pressão parcial de oxigênio e dióxido de carbono no ambiente são fatores críticos para o crescimento micelial e também produção extracelular de enzimas.

4. Podem ser utilizados em processos de digestão anaeróbica de material lignocelulósico, tais como resíduos agrícolas e resíduos sólidos domésticos para a produção de fontes alternativas de energia. Nestes processos, a hidrólise da lignina e da celulose são limitantes do processo e fungos anaeróbios talvez possam melhorar a economia do processo, dependendo das características das enzimas lignocelulolíticas por eles produzidas.

Este trabalho teve como objetivo principal selecionar linhagens fúngicas com alta capacidade de metabolizar e fermentar material lignocelulósico. Para atingir este objetivo as seguintes metas foram realizadas:

- Estudo do sistema lignocelulolítico destes fungos sob diferentes condições de oxigenação e concentrações de substrato;
- Estudo do metabolismo fermentativo dos fungos selecionados e efeito da adição de nutrientes complementares.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Material Lignocelulósico

A lignocelulose é o principal constituinte da parede celular da maioria das plantas terrestres e é uma das maiores fontes de carbono renováveis, possuindo uma síntese estimada em 4×10^7 toneladas por ano (KUBICEK, 1992). Sendo assim, é o composto biológico mais abundante encontrado na Terra, e o material dominante do resíduo da agricultura, na forma de talos, troncos e cascas; sendo também um dos principais produtos de resíduos naturais e de atividades produzidas pelo homem. Na natureza a celulose não é encontrada na sua forma pura, ou seja, está sempre associada com outros polissacarídeos (hemicelulose, pectina) e lignina. Para exploração da celulose, é freqüentemente necessário remover os compostos não celulósicos. A maioria dos resíduos agroindustriais, como por exemplo, os resíduos agrícolas, os lixos urbanos, e os resíduos de processamento das indústrias de papel e alimentos é composta de celulose, hemicelulose e lignina (NIKOLOV, 2000).

Os resíduos agrícolas contêm cerca de 20 a 60% de celulose, 20 a 30% de hemicelulose e 15 a 30% de lignina. O farelo de trigo e de arroz, por exemplo, contêm cerca de 25 a 40% de celulose e o restante de hemicelulose (20-35%) e lignina (30%). Os jornais possuem aproximadamente a mesma composição que as madeiras das quais são derivados, apresentando 40 a 55% de celulose, 25 a 40% de hemicelulose e 18 a 30% de lignina (WYMAN, 1996).

O progresso na indústria biotecnológica oferece excelentes oportunidades para utilização econômica de resíduos agro-industriais, como por exemplo, o bagaço de cana-de-açúcar. O bagaço de cana-de-açúcar consiste aproximadamente de 50% de celulose, 25% de hemicelulose e 25% de lignina.

Devido ao baixo conteúdo de cinzas (2,4%), o bagaço oferece numerosas vantagens em comparação aos outros resíduos agropecuários como palha de arroz e palha de trigo, os quais têm 17,5% e 11%, respectivamente, de cinza, para o uso em processos de conversão usando culturas microbianas (PANDEY et al., 2000). Considerando esta abundante disponibilidade, o bagaço de cana pode servir como substrato ideal em processos microbiológicos para obtenção de produtos com alto valor agregado. Tentativas têm sido feitas para produzir ração animal com proteína enriquecida, enzimas, aminoácidos, ácidos orgânicos, e compostos de interesse na indústria farmacêutica a partir de bagaço de cana. Frequentemente, um processo de pré-tratamento tem resultado no aumento da utilização deste substrato por microrganismos. A aplicação da tecnologia de fermentação de estado sólido pode ser uma possibilidade atraente para tal bioconversão. Ao longo dos anos, um grande número de bactérias, leveduras e fungos têm sido cultivados em bagaço, entretanto, os fungos filamentosos, especialmente os basidiomicetos são os mais utilizados para produção de enzimas e enriquecimento de proteínas (PANDEY et al., 2000).

Há diferentes maneiras nas quais a energia que está ao nosso redor pode ser estocada, convertida e ampliada para nosso uso. As fontes de energia estão divididas em três categorias: combustível fóssil, fontes renováveis e fonte nuclear. Os combustíveis fósseis são o carvão, o petróleo e o gás natural. As fontes de energia renováveis são solar, vento (eólica), hidroelétrica, biomassa e força geotérmica. As fontes de força nuclear são fissão e fusão (DEMIRBRAS, 2001).

A energia de biomassa é derivada a partir de material vegetal e animal, como as madeiras das matas naturais, resíduos de processos agrícolas e silviculturas e resíduos industriais, humanos ou animais (DEMIRBRAS, 2001).

A energia a qual é estocada nas plantas e animais (herbívoros ou outros animais), ou nos resíduos que eles produzem é denominada energia de

biomassa. Esta energia pode ser recuperada por aquecimento da biomassa como um combustível. Durante a combustão, a biomassa libera calor e dióxido de carbono que foram absorvidos enquanto a planta estava crescendo. Essencialmente, o uso da biomassa é o contrário da fotossíntese (DEMIRBRAS, 2001).

Na natureza, toda biomassa se decompõe em moléculas com a liberação de calor. A liberação de energia a partir da combustão da biomassa imita o processo natural. Entretanto, a energia obtida desta é uma forma de energia renovável e, em princípio, utilizando-se esta energia não se estará adicionando dióxido de carbono ao meio ambiente, em contraste com o combustível fóssil. De todas as fontes de energia renováveis, a biomassa é a única na qual a energia solar é eficientemente estocada. Além disso, é fonte renovável somente de carbono e é capaz de ser convertida em combustível sólido, líquido ou gasoso. A biomassa pode ser usada diretamente (por ex. queimando-se madeira para aquecimento ou cozimento), ou indiretamente convertendo-se em combustível líquido ou gasoso (por ex. álcool a partir de cana de açúcar ou biogás a partir de resíduos animais) (DEMIRBRAS, 2001).

2.2. Estrutura da Celulose

Quimicamente, a celulose é um polímero linear, composto de unidades de D-anidro-glicopiranosídeo unidas por ligações β -1,4-glicosídicas sendo a celobiose sua unidade básica (Figura 1A). As unidades de anidroglicose adotadas na configuração de cadeia mostrada na figura, sofre rotação de 180° sobre o eixo principal em relação a sua molécula vizinha, gerando uma configuração linear espontânea com o mínimo de impedimento estérico. O número de unidades de glicose na molécula de celulose varia entre 100-14.000

resíduos e o grau de polimerização foi reportado entre 15 - 14.000 (COUGHLAN, 1992, BEGUIN & AUBERT, 1994).

A molécula de celulose está acoplada por ligações de hidrogênio intra e intermoleculares gerando grandes cadeias, as quais tem importância na formação de microfibrilas insolúveis e rígidas (COUGHLAN, 1992; BEGUIN & AUBERT, 1992), como está apresentado na Figura 1B.

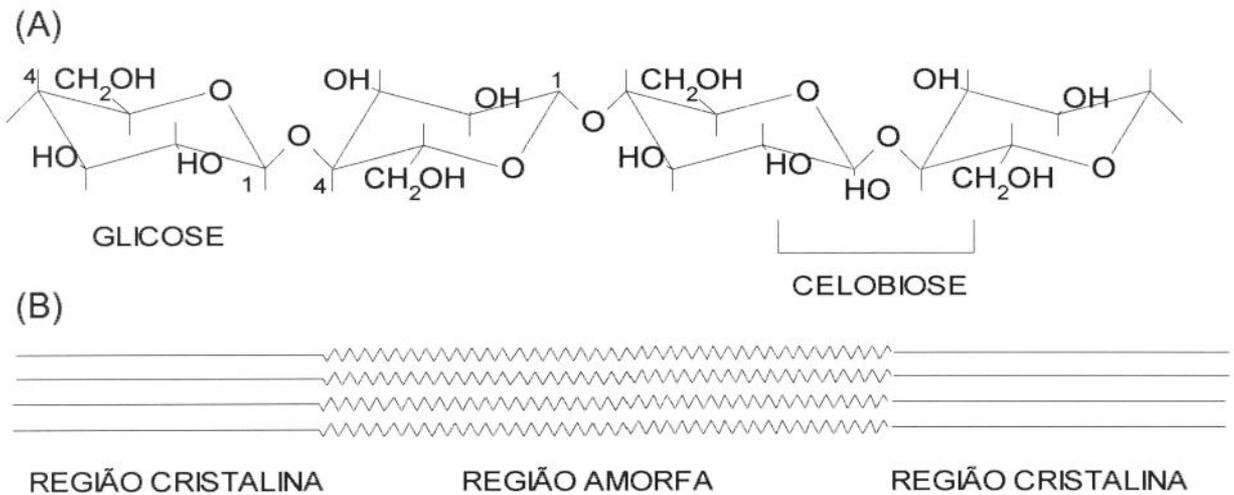


Figura 1. Estrutura da celulose. (A) Ligações β -glicosídicas. (B) Estrutura esquemática de uma fibrila (BEGUIN & AUBERT, 1992).

Estas fibrilas tornam a unir-se por ligações de hidrogênio e forças de Van der Waals intercadeias, resultando na formação de um polímero insolúvel denominado de microfibrila (COUGHLAN, 1992). A menor unidade de fibra da celulose é a fibrila elementar; e quando estas fibrilas se unem para formar as microfibrilas, podem ter um arranjo altamente ordenado, denominado de região cristalina da celulose. Entretanto, em algumas partes, as fibrilas não se encontram bem ordenadas, dando origem as regiões amorfas (BEGUIN & AUBERT, 1992).

A estrutura cristalina aparentemente executa um papel muito importante na degradação enzimática da celulose, pois tem se observado que a celulose com alta cristalinidade reage mais vagarosamente que a celulose com baixa cristalinidade. A cristalinidade juntamente com a presença de lignina são os maiores impedimentos para a hidrólise enzimática da celulose (KNAPP, 1985). Envolvendo a estrutura cristalina e infiltrando-se na região amorfa, existem hemiceluloses e cadeias isoladas de celulose (WYMAN, 1994).

2.2.1. Sistema Enzimático Celulolítico

A primeira ação da enzima para hidrólise efetiva da celulose nativa requer uma operação sequencial das celulases, isto é, endoglucanases (antes denominadas C_x), exoglucanases (C_1) e celobiasas (β -glicosidase), como está representado na Figura 2. A endoglucanase é uma endoenzima que rompe aleatoriamente a cadeia de celulose, por exemplo a carboximetilcelulase (CMCase). A enzima é capaz de quebrar a molécula de celulose no meio da cadeia para criar finais não redutores para subsequente ação da exoenzima. A exoglucanase é uma enzima que rompe as unidades a partir do final da cadeia, por exemplo, a Avicelase. Esta enzima é a principal responsável pela produção de celobiose a partir da celulose cristalina. A β -glicosidase é uma enzima específica para celobiose tendo como produto final a glicose. As enzimas endo e exoglucanases atuando juntas, podem solubilizar a celulose nativa em celobiose (duas moléculas de glicose), e este efeito é denominado sinergismo. Nenhuma das duas enzimas isoladamente são capazes de realizar a hidrólise, conforme esquematizado na Figura 2 (WOOD & McCRAE, 1979). BEGUIN & AUBERT, 1992 resumiram desta maneira: Endo-1,4- β -D-Glucanase, Exo-1,4- β -D-Glucanase e β -D-Glicosidase.

2.2.1.1. Endo-1,4- β -D-Glucanase (1,4- β -D-glucano-4-glucanohidrolase, E.C. 3.2.1.4)

Este grupo de enzimas hidrolisa aleatoriamente as cadeias de celulose na região amorfa, aumentando o número de finais não redutores e produzindo uma rápida mudança no grau de polimerização. Os substratos incluem a carboximetilcelulose ou celulose amorfa. A celulose cristalina ou Avicel não são atacadas significativamente. O índice de hidrólise de cadeias longas de celooligossacarídeos é alto, e este índice aumenta com o grau de polimerização. A celobiose é um dos principais produtos da reação.

2.2.1.2. Exo-1,4- β -D-Glucanase (E.C. 3.2.1.74. / E.C. 3.2.1.91.)

Existem dois tipos, ambos atuando em finais não redutores da cadeia. A exo-glicohidrolase (1,4- β -D-glucanoglicohidrolase, E.C. 3.2.1.74.) atua removendo as unidades de glicose e a exo-celobiohidrolase (1,4- β -D-glucano celobiohidrolase, E.C. 3.2.1.91.) remove resíduos de celobiose. As celobiohidrolases são as enzimas encontradas com maior frequência; liberam pequenas quantidades de glicose a partir da celulose. A celobiose e cadeias longas de celooligossacarídeos são hidrolisadas mais intensamente quanto maior for o grau de polimerização. O Avicel é um substrato que tem provado ser muito útil para o isolamento e quantificação das celobiohidrolases.

2.2.1.3. β -D-Glicosidase (β -D-glicosídeo-glicosil-hidrolase, E.C. 3.2.1.21.)

É um dos componentes mais importantes do sistema das celulases pois convertem a celobiose e outras celodextrinas de baixo peso molecular, com até sete moléculas de glicose, à glicose. A hidrólise de celooligossacarídeos pela β -glicosidase é menos intensa quanto maior for o grau de polimerização. A celobiase não é considerada uma celulase específica, pois apenas ajuda na ação das celulases através da remoção dos resíduos de celobiose que são inibitórios.

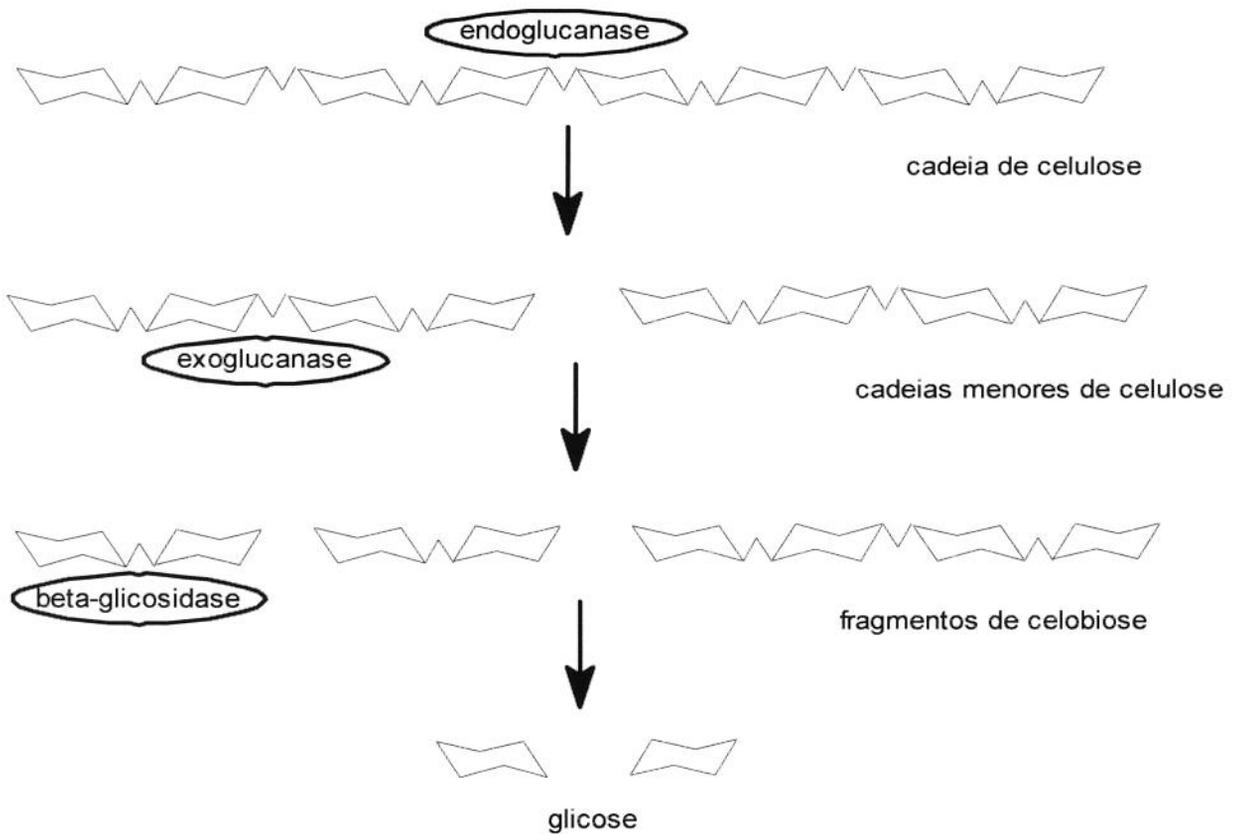


Figura 2. Ação das enzimas celulolíticas (WOOD & McCRAE, 1979).

2.2.2. Microrganismos Produtores de Celulases

Devido à grande quantidade de material celulósico existente na Terra, sua biodegradação é importante em muitos habitats naturais, tais como: solo, folhas e florestas, sedimentos aquáticos e sistemas produzidos pelo homem, como compostagem e digestores anaeróbios (BEGUIN & AUBERT, 1994).

Os microrganismos celulolíticos são encontrados entre grupos taxonômicos extremamente variados. Estes microrganismos incluem fungos, actinomicetos e bactérias (TUOR, 1995). São geralmente encontrados em toda biota onde há acúmulo de resíduo celulósico, e ocorrem em populações mistas compreendendo espécies celulolíticas e não celulolíticas, as quais agem muitas vezes em associação. Estas interações precedem a completa degradação da celulose, que finalmente é convertida em dióxido de carbono e água sob condições aeróbicas, e em dióxido de carbono, metano, e água sob condições anaeróbicas (BEGUIN & AUBERT, 1994). Os principais microrganismos produtores de celulases estão listados na Tabela 1.

Tabela 1. Microrganismos produtores de celulases

GRUPO	ORGANISMO
Bactérias	<i>Acetivibrio cellulolyticus</i> , <i>Bacteróides 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.</i> <i>thermomonospora</i> , <i>Pseudomonas fluorescens</i> , <i>Ruminococcus albus</i>
Actinomicetos	<i>Streptomyces griseus</i> , <i>Thermoactinomyce</i> sp., <i>Thermonospora curvata</i> , <i>T. fusca</i>

Tabela 1 (cont.)

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 solanii</i> , <i>Humicola insolens</i> , <i>Macrophomina phaseolina</i> , <i>Myrothecium verrucaria</i> , <i>Mycellophthora thermophila</i> , <i>Pellicularia filamentosa</i> , <i>Penicillium citrinum</i> , <i>P.funiculosum</i> , <i>P. trenis</i> , <i>P. janthinellum</i> , <i>P. variabila</i> , <i>Pestalotiopsis westerdijkii</i> , <i>Polyporus adustus</i> , <i>P. versicolor</i> , <i>Poria</i> sp., <i>Sporotrichum cellulophilumi</i> , <i>S. dimorphosporum</i> , <i>S. pruinsum</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. longibrachiatum</i> , <i>T. reesei</i> , <i>Trichosporum cutaneum</i> , <i>T. pullulans</i>
--------	---

2.2.2.1. Produção de Celulases por Fungos

Entre os fungos aeróbicos mais efetivos na biodegradação natural dos resíduos lignocelulósicos, estão os fungos de decomposição branca, os fungos de decomposição marrom e os fungos de decomposição branda (BLANCHETE, 2000).

A superfície da terra é a mais importante biota aeróbica, onde há acúmulo de resíduos celulósicos. Entre estes, a madeira é o componente mais lentamente atacado por microrganismos celulolíticos, devido a alta quantidade de lignina. A degradação completa de lignina é um processo oxidativo o qual é

realizado por poucos microrganismos como por exemplo, o fungo de degradação branca *Phanerochaete chrysosporium*. Entretanto, uma larga variedade de organismos, em particular actinomicetos (McCARTHY, 1987), são capazes de efetuar delignificação parcial para obter acesso ao substrato celulósico. O fungo *Trichoderma reesei*, um deuteromiceto aeróbico e altamente celulolítico, é provavelmente o microrganismo cujo sistema celulolítico tem sido mais pesquisado. Outros fungos são capazes de produzir o complexo celulolítico, como o *T. Koningii* (WOOD & McCRAE, 1979), *Penicillium funiculosum* (BORCHERT & BUCHHOLZS, 1987), *Fusarium solanii* (ENARI & PAAVOLA, 1987) e *Neurospora crassa*. Estes fungos produzem grande quantidade de endoglucanases e quantidade variável de β -glucosidase, mas pouca exoglucanase.

A degradação anaeróbica de celulose ocorre em uma variedade de substratos da biota anaeróbica, como esterco, adubo composto, lodo de tratamentos de esgotos de água (vegetais e marinhos) ou sedimentos de água doce. A hidrólise da celulose por microrganismos anaeróbicos presentes no rúmen e trato gastro-intestinal apresenta um papel essencial na nutrição dos animais herbívoros. A microbiota do rúmen hospeda uma variedade de microrganismos anaeróbicos que se utilizam dos polissacarídeos da parede celular vegetal. Os fungos anaeróbicos de rúmen incluem os chytridiomycetos, em particular *Neocallimastix frontalis*, *N. patriciarum* e *Piromyces* sp. Muitos ciliados anaeróbicos que utilizam fragmentos celulósicos foram identificados no rúmen, pertencentes ao gênero *Diplodinium* e *Eudiplodinium* (ORPIN, 1988), porém a grande maioria dos microrganismos anaeróbicos envolvidos na degradação da celulose no rúmen são bactérias (KNAPP, 1985).

Estudos realizados por TEUNISSEN & OP DEN CAMP (1993) revelaram que os fungos anaeróbicos têm grande potencial na digestão de lignocelulose, presente no rúmen de animais herbívoros, devido à capacidade em colonizar e

degradar tecidos da parede celular vegetal contendo lignina mais eficientemente que as bactérias presentes.

Muitos microrganismos isolados do rúmen apresentaram produção de celulasas e xilanasas, os quais são importantes na quebra dos polímeros vegetais (TEUNISSEN et al., 1992).

DURRANT et al. (1995) relataram o isolamento, usando condições de cultura anaeróbica, de duas linhagens (H2 e Q10) morfológica e fisiologicamente distintas de fungos fermentadores da celulose. A linhagem H2 pertence à classe dos Basidiomicetos e a linhagem Q10 foi identificada como *Trichocladium canadense*. As duas linhagens cresceram e utilizaram celulose mais rapidamente quando incubadas sob condições microaerofílicas. A linhagem H2 degradou celulose mais rapidamente em culturas sob aeração. Os sistemas ativos, celulase e xilanase são produzidos por ambas as linhagens, e as enzimas estão presentes no sobrenadante (DURRANT, 1996a).

2.2.2.2. Produção de Celulasas por Bactérias

Ao contrário dos fungos, o sistema enzimático das bactérias é predominantemente intracelular. Uma estrutura de alto peso molecular, associada à célula, o celulosoma, parece ser responsável pela aderência da bactéria ao substrato onde as endoglucanases atuam hidrolisando a celulose, enquanto que a celobiose e os oligossacarídeos restantes no celulosoma são metabolizados pela β -glucosidase (celobiose fosforilase) no espaço periplasmático (COUGHLAN, 1992). Em geral as bactérias produzem pouca ou nenhuma atividade de exo- β -1,4-glucanase e a enzima celobiose-fosforilase (celobiose-ortofosfato- α -D-glucosil transferase, E.C. 2.4.1.F.20) produzida intracelularmente, parece substituir a função da β -glicosidase fúngica.

Entre as bactérias aeróbicas celulolíticas de solo, muitas espécies pertencem ao gênero *Cellulomonas*, algumas cepas de *Pseudomonas* (*Cellvibrio*), *Bacillus* e muitos actinomicetos como *Streptomyces*, *Thermonospora* e *Microbispora* têm sido estudadas em detalhes (BEGUIN & AUBERT, 1994).

A bactéria mesofílica, *Acetovibrio cellulolyticus* parece ser a mais importante das bactérias isoladas de esgoto e diferente da maioria das bactérias celulolíticas pela sua habilidade de usar apenas celulose, celobiose e salicina para crescer. Entre as bactérias anaeróbicas produtoras de celulases, as do gênero *Clostridium* são as mais estudadas.

Os microrganismos celulolíticos anaeróbicos são os primeiros elos de uma cadeia nutricional complexa convertendo carboidratos poliméricos em metano e dióxido de carbono. Em uma primeira etapa, a glicose derivada de celulose é fermentada por organismos celulolíticos em hidrogênio, dióxido de carbono, e vários compostos orgânicos incluindo ácidos e álcoois. Em uma segunda etapa, estes compostos são convertidos em acetato e dióxido de carbono, sendo este passo termodinamicamente desfavorável (a menos que a pressão parcial do hidrogênio esteja mantida em níveis muito baixos). O excesso de equivalentes redutor deve futuramente ser transferido para aceptores apropriados como sulfato e dióxido de carbono (LINKO et al., 1992).

2.3. Estrutura da Hemicelulose

As hemiceluloses são heteropolímeros lineares compostos de D-xilose, L-arabinose, D-manose, D-glicose, D-galactose, e D-ácido glucurônico (Figura 3). As xilanas são as hemiceluloses mais abundantes, possuem uma ligação β -1,4 xilopirranose principal, conectada com grupos laterais de acetato,

arabinofuranose e ácido o-metil glucurônico. As hemiceluloses envolvem as microfibrilas da celulose e ocupam os espaços entre as fibrilas (ERIKSSON et al., 1990). Certos grupos do tipo arabinofuranosil podem ser esterificados por ácidos aromáticos como ácido ferúlico e ρ -cumarílico, podendo participar da ligação cruzada lignina-hemicelulose (SHOSEYOV & DOI, 1990).

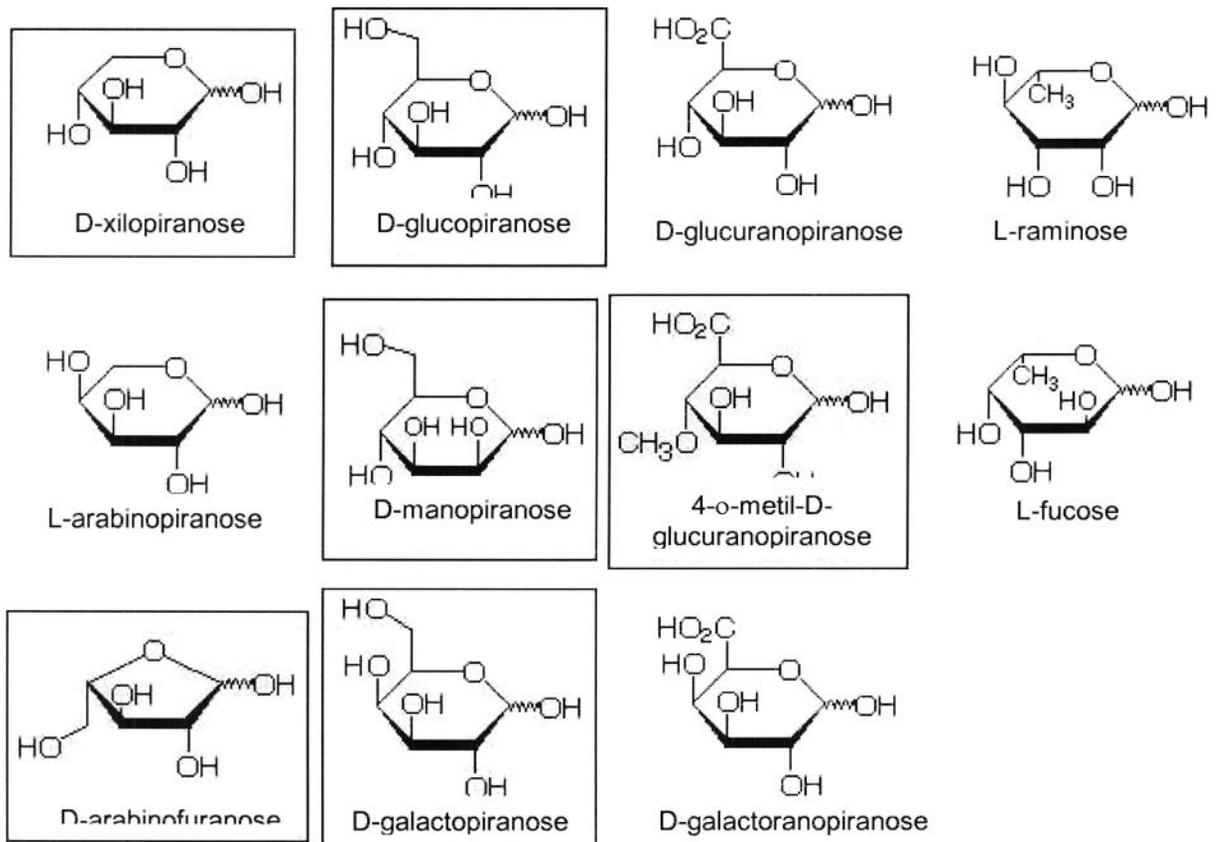


Figura 3. Estrutura da hemicelulose

2.3.1. Sistema Enzimático Hemicelulolítico

A hidrólise completa da xilana (principal constituinte da fração hemicelulósica da parede vegetal), requer ação de algumas enzimas,

provavelmente análogas à ação sinérgica das enzimas envolvidas na degradação da celulose cristalina. As hemicelulases podem ser colocadas em três categorias gerais: as endoxilanasas quebram aleatoriamente ligações β -1,4 do polímero produzindo oligossacarídeos de tamanhos variados; a atividade β -xilosidase gera D-xilose a partir de pequenas cadeias de oligossacarídeos e xilobiose; a ação da exoxilanasase é menos freqüente, tendem a agir a partir de finais redutores e não redutores (BRIGHAM et al., 1996).

Grande número de microrganismos patogênicos a plantas é conhecido em produzir xilanasas, o estudo destas enzimas na patogênese é de grande interesse (BRIGHAM et al., 1996).

2.3.2. Microrganismos Produtores de Hemicelulases

2.3.2.1. Produção por Fungos

A maioria dos fungos produtores de celulases produzem xilanasas, como é o caso do *T. reesei*, e algumas espécies de *A. niger*, *Agaricus bisporus*, *Talaromyces* sp, entre outros (COUGHLAN, 1993).

2.3.2.2. Produção por Bactérias

Algumas das bactérias celulolíticas e xilanolíticas mais extensivamente estudadas do rúmen de herbívoros pertencem às espécies Gram-negativas, como: *Fibrobacter* (formalmente *Bacteróides*) *succinogenes* e *Butyrivibrio fibrisolvens* e as espécies Gram-positivas *Ruminococcus albus* e *Ruminococcus flavefaciens* (COUGHLAN, 1993).

2.4. Estrutura da Lignina

A lignina é um polímero tridimensional aromático, complexo, hidrofóbico com unidades *p*-hidroxifenilpropanóicas ligadas por ligações do tipo C-C e C-O-C, conforme pode ser observado na Figura 4 (LEE, 1997).

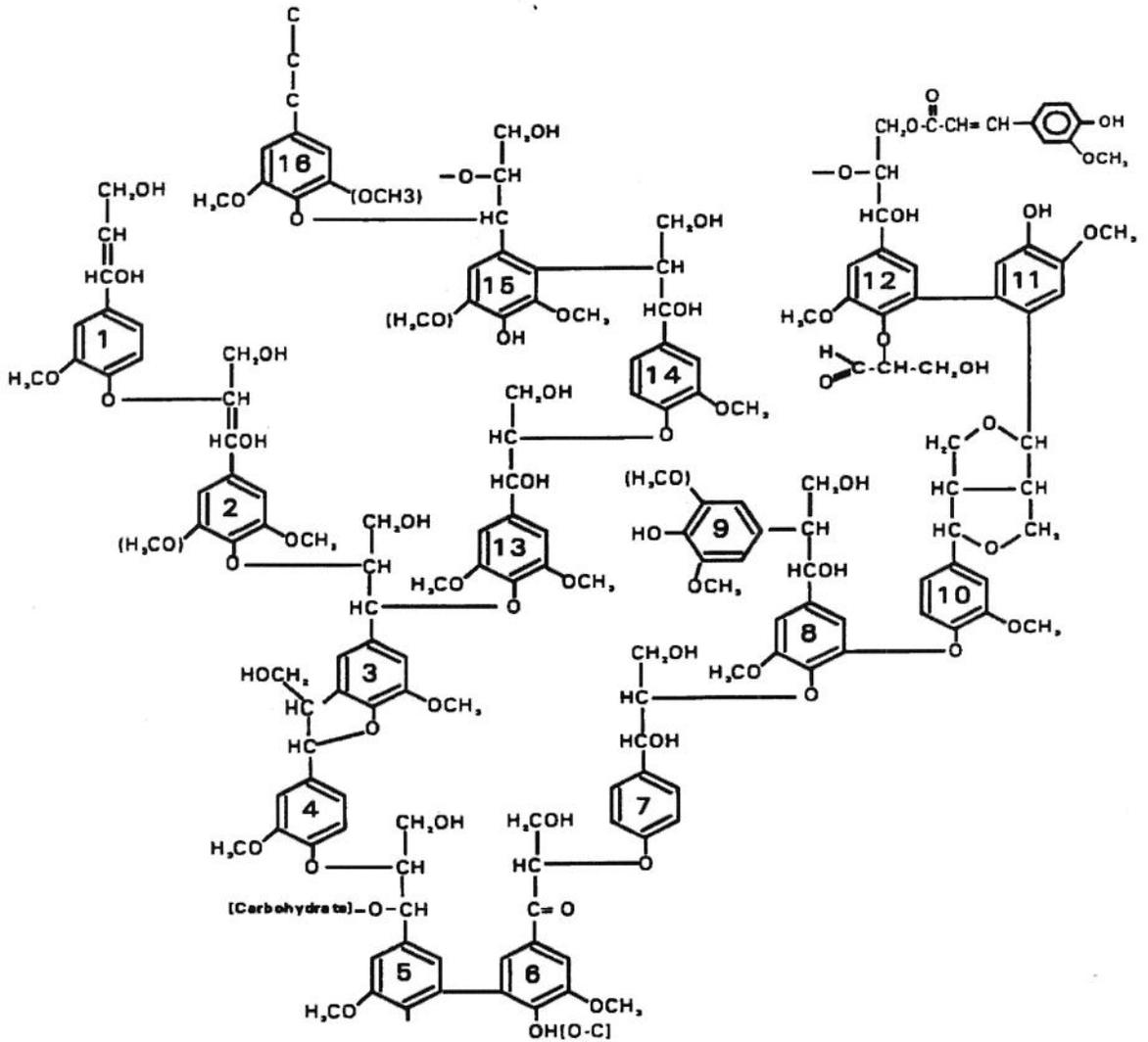


Figura 4. Estrutura da lignina (LEE, 1997)

Biossinteticamente, a lignina é formada a partir de três diferentes grupos de álcoois precursores: *p*-cumarílico (unidades de *p*-hidroxifenil), coniferílico (unidades guaiacil) e sinapílico (unidades seríngicas), conforme esquema da Figura 5.

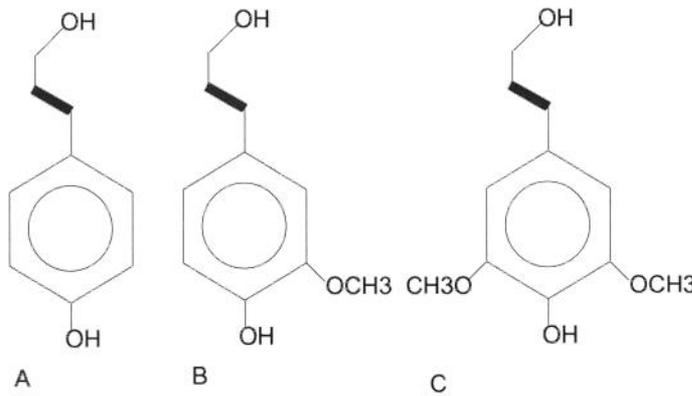


Figura 5. Precursores da lignina (A = álcool *p*-cumarílico, B = álcool coniferílico, C = álcool sinapílico) (FENGEL & WEGENER, 1983).

A lignina é parte integrante de todas as plantas superiores, sendo o segundo polímero natural mais abundante na natureza. Compreende de 15 a 36% do material lignocelulósico (10^{11} - 10^{12} toneladas/ano) produzido pela fotossíntese (KIRK & FARRELL, 1987).

A condensação de radicais livres destes precursores iniciadas por peroxidases na parede celular de plantas, resulta em uma macromolécula heterogênea, amorfa, opticamente inativa e altamente ramificada com pelo menos doze tipos de diferentes ligações como aril-éter e C-C, conectadas a um núcleo aromático. Os tipos de ligações encontradas em lignina de madeira são: β -O-4 (guaiacol- β -aril éter), α -O-4, β -5' (fenilcumaran), β -1' (diarilpropano), 5-5' (bifenil), 4-O-5' (difetil éter) e β - β' (KIRK & FARREL, 1987). Estas ligações não são hidrolisadas enzimaticamente, e requerem uma despolimerização através de mecanismos oxidativos extracelulares (ERIKSSON et al., 1990).

A distribuição da lignina na parede celular e o seu conteúdo em diferentes partes de uma árvore não são uniformes. Sua quantidade é bastante variável dentro do grupo de plantas superiores. Proporcionam resistência mecânica, transporte de nutrientes metabólicos e água e proteção à madeira contra o ataque enzimático (LEE,1997).

2.4.1. Sistema Enzimático Ligninolítico

A degradação da lignina pelos fungos é um processo do metabolismo secundário, ocorrendo sob baixos níveis de nitrogênio e requerendo a presença de uma fonte de carbono como celulose ou glicose.

A atividade de fenoloxidasas extracelulares, indicando a presença de enzimas ligninolíticas, foi descoberta na década de 30 em fungos de degradação branca (ERIKSSON et al., 1990); logo depois foi demonstrado que as reações eram catalisadas por oxidoredutases do tipo de lacases e peroxidases (KIRK et al., 1986). Em seguida ao isolamento e caracterização de lacases, duas peroxidases, denominadas lignina peroxidase e manganês peroxidase, foram evidenciadas na participação da quebra da lignina e outras enzimas. Essas enzimas, além daquelas relacionadas à quebra da lignina, como a produção de peróxido de hidrogênio, são indispensáveis para ligninólisis e logo devem ser também relatadas (NIKU-PAAVOLA et al., 1995).

Duas enzimas extracelulares, lignina peroxidase (LiP) e manganês peroxidase (MnP), foram descobertas em *P. chrysosporium* e demonstraram ser os principais componentes do sistema de degradação da lignina neste organismo (TIEN & KIRK, 1983; KUWAHARA et al., 1984).

2.4.1.1. Lignina Peroxidase (LiP - EC 1.11.1.7)

A lignina peroxidase, isolada por dois grupos de pesquisadores (TIEN & KIRK, 1983; GLENN et al., 1983), é uma glicoproteína que contém ferro protoporfirínico IX como grupo prostético, sendo dependente de peróxido de hidrogênio para sua atividade catalítica. Apresenta-se como uma série de isoenzimas com ponto isoelétrico variando entre 3,2 a 4,0 e massa molar em torno de 38 a 40 KDa (GLENN & GOLD, 1985; KIRK et al., 1986). Durante o ciclo catalítico, o ferro, contido no grupamento heme da LiP passa por quatro etapas de reações de oxido-redução (Figura 6):

1. Oxidação de Fe (III) da enzima nativa para Fe (IV) através da ação do peróxido de hidrogênio, formando o Composto I;
2. Redução do Composto I, via transferência de um elétron, formando o Composto II. O agente redutor pode ser álcool veratrílico ou peróxido de hidrogênio;
3. Redução, via um elétron que retorna a enzima a seu estado nativo completando o ciclo catalítico;
4. Na ausência do substrato redutor, o Composto II é oxidado pelo peróxido de hidrogênio, formando o Composto III (uma forma de LiP com capacidade catalítica limitada, que quando há excesso de peróxido de hidrogênio é rapidamente inativada) (CAI & TIEN, 1993; DE JONG et al., 1994).

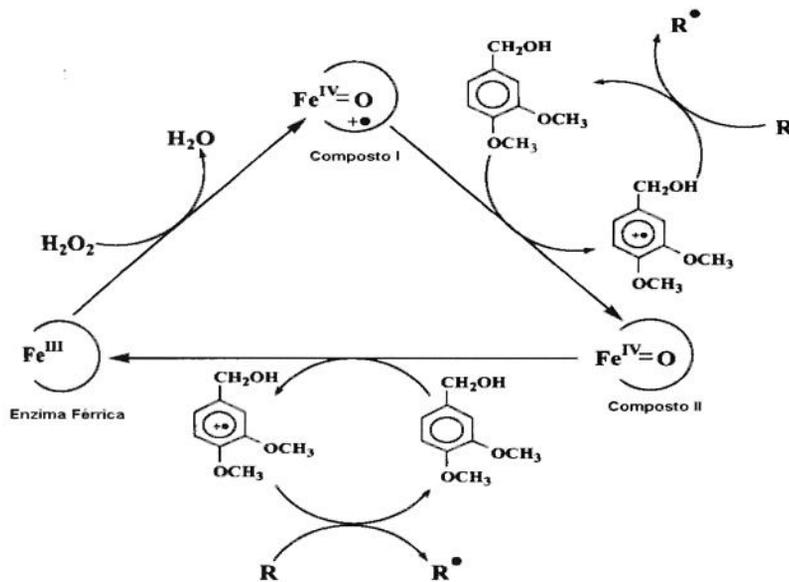


Figura 6. Ciclo Catalítico da Enzima Lignina-Peroxidase (CAMERON et al., 2000)

A enzima lignina peroxidase catalisa uma variedade de compostos modelo de lignina não fenólicos (KIRK & FARREL, 1987; GOLD et al., 1989; HIGUCHI, 1993; VALLI et al., 1992) bem como lignina sintética (HAMMEL & MOEN, 1991). Estas reações incluem oxidações do álcool benzílico, clivagem da cadeia lateral, reações de abertura do anel, desmetoxilações e descloração oxidativa. Todas estas reações são relacionadas com um mecanismo envolvendo a oxidação inicial de um elétron do núcleo aromático, formando um radical cátion arila, e este pode sofrer várias reações não enzimáticas, formando outros produtos (GOLD et al., 1989).

2.4.1.2. Manganês Peroxidase (MnP - EC 1.11.1.7)

A enzima manganês peroxidase foi isolada em culturas de *P. chrysosporium* por KUWAHARA et al. (1984). A maioria de suas propriedades

estrutural é semelhante à LiP. É uma glicoproteína com ferro protoporfirínico IX como grupo prostético, dependente de peróxido de hidrogênio para sua atividade e apresenta-se como uma série de isoenzimas com pontos isoelétricos variando entre 4,2 até 4,9 e massa molar de 46 KDa (GOLD et al., 1989). A enzima é produzida simultaneamente com a LiP, durante o metabolismo secundário e é regulada pelas concentrações de carbono e nitrogênio no meio de cultura (BUSWELL & ODIER, 1987).

A enzima MnP é dependente de peróxido de hidrogênio e íons Mn (II) e α -cetoácidos que estabilizam sua atividade oxidativa. Seu ciclo catalítico é semelhante ao da LiP, com formação de compostos I, II e III. Um excesso de peróxido de hidrogênio dá origem ao composto III, porém a concentração requerida é maior que aquela utilizada na formação do composto III da LiP. A diferença com relação ao ciclo catalítico da LiP está no doador de elétrons que gera o composto II, que no caso da MnP, é Mn (II). Alguns compostos fenólicos e ferrocianeto também podem atuar como doadores. O mesmo Mn (II) participa da conversão do composto II na enzima nativa, como pode ser observado na Figura 7 (WARIISHI & GOLD, 1991; DE JONG et al., 1994).

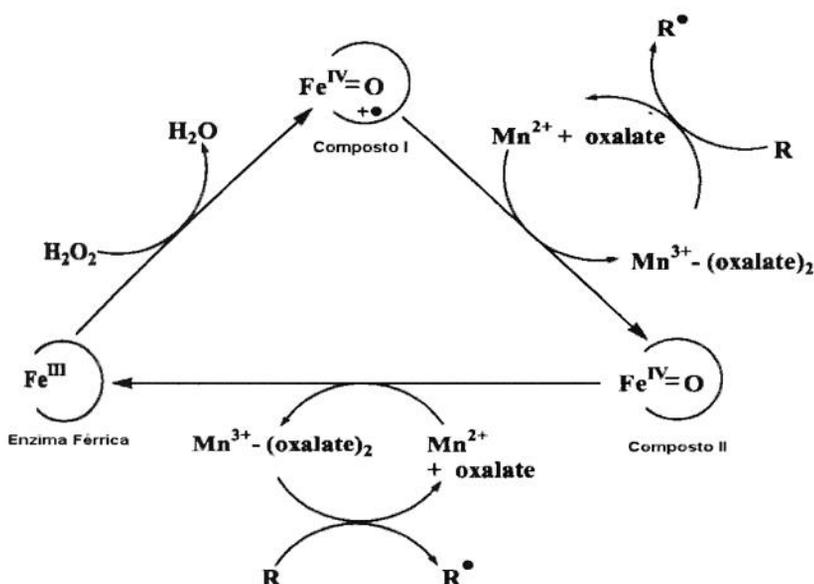


Figura 7. Ciclo Catalítico da Enzima Manganês-Peroxidase (CAMERON et al., 2000).

A enzima catalisa a oxidação de lignina (WARIISHI et al., 1992), derivados de lignina (LACKNER et al., 1991) e uma variedade de compostos modelo de lignina fenólica (TUOR et al., 1992). Demonstrou-se que o Mn (II) é o substrato mais utilizado pela MnP (WARIISHI et al., 1992). A enzima oxida Mn (II) a Mn (III), o qual se difunde para a superfície da enzima e por sua vez oxida substratos fenólicos. Ácidos orgânicos, como oxalato e malonato, produzidos por *P. chrysosporium*, ativam o sistema MnP através da quelação do Mn (III) com o fenol e a oxidação de um elétron para a formação de radicais intermediários fenoxila. Subseqüentemente há clivagem do alquil-fenil, $\text{C}\alpha\text{-C}\beta$ ou oxidação do carbonil benzílico, formando outros produtos. A enzima extracelular manganês peroxidase é capaz de degradar a lignina por uma oxidação dependente de peróxido de hidrogênio do Mn (II) para a forma reativa

Mn (III) que ataca a lignina. A Mn (III) não é capaz de oxidar diretamente a estrutura não fenólica que predomina na lignina nativa. (TUOR et al., 1992).

2.4.1.3. Lacase (benzenodiol: oxigênio oxidoreductase, EC 1.10.3.2)

A lacase é uma enzima glicoprotéica, que contém cobre no seu sítio ativo e catalisa a redução de oxigênio para água. Em geral, contém quatro átomos de cobre por molécula de enzima, embora existam enzimas com dois, três ou seis átomos de cobre (THURSTON, 1994)

As lacases são muito difundidas na natureza, sendo produzidas por fungos ou plantas e podem oxidar, desmetilar, polimerizar ou despolimerizar compostos fenólicos. Em plantas, têm sido associadas com a lignificação. Em fungos, por outro lado, estão associadas à degradação da lignina (HIGUCHI, 1990).

A lacase fúngica oxida fenóis e subestruturas de lignina fenólica pela abstração de um elétron com formação de radicais fenoxila (THURSTON, 1994). Os radicais assim formados podem ser convertidos em quinonas através de uma segunda etapa, catalisada por enzima ou através de reações não enzimáticas espontâneas (Figura 8). As quinonas e os radicais livres geram produtos amorfos insolúveis através da polimerização dos compostos fenólicos (REINHAMMAR, 1984; THURSTON, 1994).

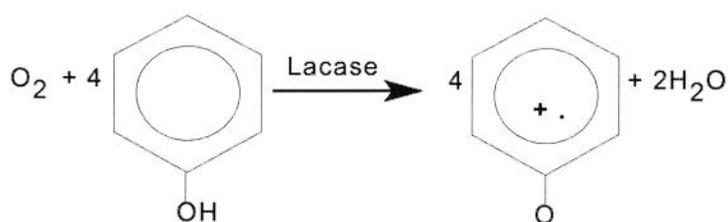


Figura 8. Representação de uma reação típica catalisada por uma lacase

A siringaldazine [N,N'-bis-(dimetoxi-4-hidroxibenziledeno) hidrazina] tem se mostrado um excelente substrato para uma fácil e rápida detecção de lacase. Em solução de siringaldazine (0,1% em etanol) a mudança de cor resulta da dupla desidrogenação do fenol e do pareamento intramolecular dos radicais livres, formando o composto tetrametoxi-azo-bis-metileno-quinona, altamente colorido e conjugado (HARKIN & OBST, 1973).

2.4.2. Microrganismos Produtores de Ligninases

Os fungos degradadores da madeira podem ser divididos em três grupos, de acordo com a morfologia da degradação que produzem: fungos de degradação branca, marrom e macia. Os fungos degradadores da madeira são taxonomicamente diversos e a maioria deles pertence à subdivisão *Basidiomycotina*. Os basidiomicetos de degradação branca são os mais eficientes organismos degradadores de lignina. São capazes de mineralizar lignina, eventualmente até CO_2 e H_2O . Os fungos de degradação marrom e macia são capazes de degradar lignina em alguma extensão, embora preferencialmente ataquem a celulose na madeira (KIRK & FARREL, 1987).

A capacidade de produção de enzimas ligninolíticas sob condições anaeróbica e microaeróbica pode conferir ao microrganismo vantagens para a

sua sobrevivência em seu meio natural, proporcionando a este uma maior versatilidade em relação aos estritamente aeróbicos ou anaeróbicos. A produção de enzimas do sistema ligninolítico sob condição microaeróbica, indica a possibilidade de degradação da lignina nestas condições, ampliando assim a aplicação desses microrganismos e/ou enzimas. Algumas espécies de fungos são capazes de se adaptar a mudanças nos ambientes nos quais eles ocorrem, podendo crescer sob tensões de oxigênio relativamente baixas e também em altas concentrações de dióxido de carbono (BEGUIN & AUBERT, 1994). Vários microrganismos degradam celulose na natureza. Estes microrganismos têm em comum a produção de enzimas hidrolíticas extracelulares, celulases, as quais atacam o polímero. Todavia, apenas alguns microrganismos são capazes de produzir todas as enzimas necessárias para a degradação de lignocelulose (ERIKSSON et al., 1990, BHAT & BHAT, 1997).

A degradação de lignina pelo basidiomiceto *Phanerochaete chrysosporium* tem sido estudada extensivamente. Este fungo degrada lignina sob condições especiais de crescimento, como por exemplo sob limitação de nutrientes, nitrogênio ou carbono e promovendo-se oxigenação das culturas em crescimento (MOUCHACCA, 1997). Cinco linhagens fúngicas: *T.canadense* (Q10); *G. terrestre* (LD); basidiomiceto - linhagem H2 e os deuteromicetos - linhagens 20 e LH5 (PAVARINA 1997 e 1999), foram capazes de produzir enzimas celulolíticas e xilanolíticas quando crescidas em meio contendo papel de filtro, celulose microcristalina, bagaço de cana, serragem e xilana como fonte de carbono, tanto sob condição de baixa oxigenação como condição combinada de agitação e posterior microaerofilia. A levedura LD foi capaz de produzir atividade de carboximetilcelulase, avicelase e xilanase. Alta atividade de β -glicosidase foi obtida com a linhagem F.LH5. Duas linhagens de fungos (H2 - basidiomiceto, e Q10 - deuteromiceto), capazes de fermentar celulose, foram isoladas sob condições anaeróbicas (DURRANT et al, 1995). Esses fungos

também degradaram celulose, hemicelulose e compostos derivados de lignina quando crescidos sob condições microaeróbicas e aeróbicas (DURRANT 1996a, e 1996b). A produção de enzimas celulolíticas e de xilanases por essas duas linhagens crescidas em meio contendo celulose e sob condições anaeróbica, microaeróbica e aeróbica foi reportada (DURRANT 1996b). O processo de fermentação da celulose por estas duas linhagens sob condições anaeróbicas é lento, mas mesmo assim esta descoberta é de importância significativa quando se considera a degradação de material lignocelulósico em ambientes naturais, uma vez que esses fungos sendo capazes de crescer sob condições variadas de oxigênio, devem participar mais ativamente na degradação desses materiais do que microrganismos estritamente aeróbios ou anaeróbios (DURRANT 1996a, e 1996b).

A degradação completa de lignina é um processo oxidativo o qual é realizado por poucos microrganismos como por exemplo, o fungo de degradação branca *Phanerochaete chrysosporium*. Entretanto, uma grande variedade de organismos, particularmente os actinomicetos, é capazes de efetuar deslignificação parcial para obter acesso ao substrato celulósico (McCARTHY, 1987). Os principais microrganismos que degradam a lignina estão listados na Tabela 2.

Tabela 2. Microrganismos que degradam a lignina

GRUPO	SUB-DIVISÃO	ORGANISMO	AMBIENTE
Fungos de degradação branca	Basidiomicotina (Ascomicotina)	<i>Phanerochaete</i> , <i>Phlebia</i> , <i>Trametes</i> <i>Coriolus</i>	Principalmente madeira dura
Fungos de degradação marrom	Basidiomicotina	<i>Poria</i> , <i>Polyporus</i>	Principalmente madeira mole
Fungos de degradação 'soft'	Ascomicotina ou Deuteromicotina	<i>Chaetomium</i> , <i>Fusarium</i>	Ambiente aquático, madeira com preservantes químicos
Bactéria	Actinomicetos ou Mixobactérias	<i>Streptomyces</i> , <i>Nocardia</i> , <i>Pseudomonas</i>	Madeira em estágio de decomposição

Fonte: BLANCHETTE (2000)

2.4.2.1. Fungos produtores de ligninases

Os fungos de decomposição branca são membros da classe de fungos Basidiomicetos que geralmente produzem corpos de frutificação, comumente reconhecidos como cogumelos. Causam a podridão branca na madeira sendo os mais eficientes degradadores da lignina na natureza. As hifas destes fungos penetram na madeira, liberam enzimas e degradam o material lignocelulósico. Em culturas puras, são capazes de mineralizar a lignina até gás carbônico e água (TUOMELA, 2000).

A degradação da lignina por fungos de decomposição branca é mais rápida do que qualquer outro microrganismo e são os responsáveis pela maioria da decomposição da lignina na natureza. O substrato de crescimento não é somente lignina, mas também hemicelulose e celulose (BLANCHETTE, 2000).

Muitos basidiomicetos de degradação branca e alguns actinomicetes têm sido empregados para produção de enzimas degradantes de lignina e para delignificação de material lignocelulósico via fermentação estado sólido (LEE, 1997).

Coriolus versicolor, *Phlebia radiata* e *Phanerochaete chrysosporium* são exemplos de fungos de decomposição branca que degradam a lignina (LEE, 1997). O fungo *P. chrysosporium* degrada a lignina somente durante o metabolismo secundário (idiofásico), quando ocorre depleção de nutrientes, como nitrogênio, carbono e enxofre no meio de cultura. A limitação de nitrogênio é o recurso mais utilizado em experimentos com este fungo (TUOMELA, 2000; KIRK & FARREL, 1987; BUSWELL & ODIER, 1987; CAI & TIEN, 1993).

Devido às diferenças estruturais e químicas dos substratos de lignina, ocorre uma especialização com relação aos fungos que a degradam, particularmente quanto às enzimas, do tipo peroxidase, expressas por cada organismo. Estes são classificados em cinco principais grupos (TUOR et al., 1995), conforme descrito abaixo:

- Grupo I → fungos de decomposição branca que expressam LiP, MnP e lacase. Os mais conhecidos são *Coriolus versicolor*, *Phanerochaete chrysosporium* e *Phlebia radiata*. O fungo *P. chrysosporium* pertence a este grupo desde que a produção da lacase foi detectada. No entanto, geralmente é considerado não produtor da mesma.

- Grupo II → fungos de decomposição branca que produzem lacase e MnP mas não secretam níveis detectáveis de LiP, como por exemplo *Dichomitus squalens* e *Lentinula edoles*.
- Grupo III → fungos de decomposição branca que secretam LiP e lacase, como *Coriolus pruinosum* e *Phlebia tremellosus*.
- Grupo IV → fungos de decomposição branca que secretam somente LiP, neste grupo encontram-se *Bjerkandera adusta*, *Daedaleopsis confragosa*, *Phallus impudicus* e *Polyporus varuis*.
- Grupo V → fungos não caracterizados, ou seja, que degradam lignina, mas nenhuma das enzimas acima foram detectadas, como por exemplo *Trametes cingulata*.

Estudos realizados por LEE, 1997, TEUNISSEN & Op DEN CAMP, 1993 indicaram que alguns fungos anaeróbicos, isolados de rúmen de mamíferos herbívoros, são capazes de degradar a lignina presente na parede celular de células vegetais com maior eficiência do que as bactérias e os protozoários.

2.4.2.2. Bactérias produtoras de ligninases

Muitos actinomicetos e eubactérias podem solubilizar e modificar a estrutura da lignina, mas sua habilidade em mineralizar a lignina é limitada. Os actinomicetes degradam a lignina na presença de altos níveis de nitrogênio em metabolismo primário ao contrário dos fungos de degradação branca que preferencialmente degradam a lignina via metabolismo secundário. Muitas espécies de *Streptomyces* e *Nocardia* têm sido apresentadas para degradar lignina no solo (TUOMELA, 2000).

A madeira é degradada por bactérias sob condições ambientais extremas: madeira saturada com água; condições anaeróbicas ou madeira com alto conteúdo extrativo, sendo a taxa de degradação muito baixa. Bactérias de alguns gêneros como as *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Nocardia* e *Streptomyces* podem degradar compostos aromáticos simples. O papel da bactéria pode ser significativo no consumo de pequenos compostos de peso molecular intermediário produzidos pelos fungos (ERIKSSON et al., 1990).

A compostagem é em geral um processo aeróbico, mas microambientes anaeróbicos podem ser gerados. Todas as bactérias anaeróbicas encontradas são altamente celulolíticas e deste modo podem ter um papel importante na degradação de macromoléculas (MOUCHACCA, 1997).

2.5. Bioconversão de Lignocelulose

A bioconversão da lignocelulose a etanol e outros ácidos orgânicos de interesse industrial por métodos convencionais é geralmente ativada em duas etapas: a primeira etapa consiste na sacarificação dos polissacarídeos em monossacarídeos; e a segunda, na bioconversão do monossacarídeo a etanol. Uma combinação de hidrólise enzimática e produção de etanol no mesmo reator tem sido testada para promover um processo eficiente usando diferentes celulasas e espécies microbianas produtoras de etanol (PHILIPPIDIS, 1996). A produção de etanol a partir de celulose em um processo simultâneo de sacarificação e conversão biológica aliviaria o problema da inibição pelo produto final, uma vez que a glicose não se acumularia no sistema, sendo convertida a etanol imediatamente após a sacarificação (PHILIPPIDIS, 1996).

A produção de ácidos orgânicos por fermentação sólida está associada com o desenvolvimento histórico da fermentação. O ácido cítrico é o mais

importante ácido orgânico produzido em alta escala e é extensivamente usado em indústria de alimentos e farmacêutica. É produzido principalmente por fermentação submergida usando *Aspergillus niger* ou *Candida* sp. a partir de diferentes fontes de carbono, como por exemplo melação. Entretanto, a fermentação sólida usando fonte de carbono alternativa como resíduo agroindustrial tem grande potencial (PANDEY, 2000). A produção de ácido láctico usando fermentação sólida tem sido realizada usando tanto linhagens fúngicas (*Rhizopus* sp.) quanto bacterianas (*Lactobacillus* sp). Diferentes culturas agrícolas como mandioca e resíduos agrícolas como bagaço de cana tem sido usados neste processo (PANDEY, 2000).

A produção de etanol a partir de biomassa celulósica requer hidrólise enzimática ou hidrólise ácida (por ex. ácido sulfúrico na conc. 1-5%). A hidrólise enzimática desta biomassa por celulasas, xilanases e ligninases produzidas por microrganismos lignocelulolíticos apresenta vantagens sobre os processos químicos e/ou físicos existentes, especialmente no que diz respeito a diminuição da poluição ambiental e dos gastos energéticos envolvidos no processo. As linhagens capazes de crescer sob condição microaeróbica podem ser utilizadas com maior eficiência em fermentações sólidas, nas quais a aeração é um fator importante, uma vez que a pressão parcial de oxigênio e dióxido de carbono no ambiente são fatores críticos para o crescimento micelial e também produção extracelular de enzimas; e podendo também ser utilizadas em processos de digestão anaeróbica de material lignocelulósico, tais como resíduos agrícolas e resíduos sólidos municipais para a produção de fontes alternativas de energia. Nestes processos, a hidrólise da celulose é o passo limitante do processo e fungos anaeróbios talvez possam melhorar a economia do processo, dependendo das características das enzimas lignocelulolíticas por eles produzidas (SINGH & KUMAR, 1991; WYMAN, 1996).

Juntas, a celulose e a hemicelulose compõe aproximadamente 65-75% de toda composição da biomassa lignocelulósica, estes materiais são hidrolisados nos seus açúcares constituintes por ácidos ou enzimas microbianas, tendo como produto de hidrólise (dos materiais celulósicos) uma mistura de açúcares predominantemente a glicose e xilose. Para converter açúcares derivados da biomassa a etanol eficientemente, se faz necessária a conversão das hexoses e pentoses. A eficiência da produção de etanol a partir de biomassa renovável depende totalmente da habilidade do microrganismo em converter a fonte de carbono viável em produtos (WYMAN, 1996).

A lignina é um dos componentes mais recalcitrantes da parede celular vegetal, sendo que a alta proporção da lignina diminui a biodisponibilidade do substrato. A presença de moléculas de lignina forma uma barreira, reduzindo a área disponível para penetração e ação das enzimas lignocelulolíticas (KIRK & FARRELL, 1987).

Muitos eucariotas e procariotas produzem celulasas e hemicelulasas extracelulares quando crescidos em um meio contendo celulose ou indutores de celulasas e eles hidrolisam material celulósico em açúcares a partir de fontes de carbono e energia. Entretanto, muitos deles não são capazes de converter estes açúcares a etanol, enquanto que outros organismos são capazes de produzir etanol eficientemente a partir de açúcares simples (GONG et al., 1981a).

Muitos fungos do gênero *Fusarium* (CHRISTAKOPOULOS et al., 1991), *Rhizopus*, *Mucor* (UENG & GONG, 1982), *Neurospora* (DESHPANDE et al., 1986), *Monilia* (GONG et al., 1981b), *Polyporus* e *Paecilomyces* (WU et al., 1986) conseguem converter glicose e xilose a etanol.

Algumas linhagens possuem a habilidade de converter celulose diretamente a etanol. Fungos como, *Monilia*, *Neurospora crassa* e *Fusarium oxysporum* apresentam alto potencial em hidrolisar e converter diretamente celulose a etanol/ácido acético. A produção de etanol é concluída colocando o

micélio crescido aeróbicamente sob condições anaeróbicas (SINGH & KUMAR, 1991). Entretanto, o processo de produção de etanol por fungo filamentosos é dificultado pela necessidade de um longo período para que ocorra alta taxa de conversão (ENARI & PAAVOLA, 1987).

DURRANT (1996b), cultivou o fungo *Trichocladium canadense* (linhagem Q10) e um basidiomiceto (linhagem H2) em meio definido contendo 0,25% de papel de filtro moído como fonte de carbono, variando as condições de oxigenação: anaeróbica, microaeróbica e aeróbica. Após degradação da celulose, as enzimas lignocelulolíticas e os produtos de fermentação foram determinados. O etanol foi o maior produto de fermentação encontrado. A maior conversão de celulose a etanol foi obtida com a linhagem Q10 (90-96%), sob condições microaerofílicas. A produção de etanol diminuiu quando celulose microcristalina e substrato lignocelulósico foram utilizados.

Segundo STERNBERG (1976) a adição do tween 80 aumenta a permeabilidade da membrana celular das linhagens fúngicas permitindo uma maior secreção de enzimas. Foi relatado na literatura que a adição de MnO_2 , íons nitrato, selênio e férrico em meio de cultura base favorece o crescimento dos microrganismos sob condição anaeróbica (GUNNER & ALEXANDER, 1964). De acordo com DUBE (1990) a presença de alta concentração de cisteína pode afetar o metabolismo fermentativo de alguns fungos.

De acordo com PANDEY et al., (2000), utilizando bagaço de cana sem tratamento a degradação é lenta pelos microrganismos, uma etapa de pré-tratamento pode ser útil para aumentar a utilização do substrato pelos microrganismos. A obtenção de lignina por hidrólise pode ser nova fonte para produção de muitos compostos fenólicos aromáticos. Esses fungos capazes de degradar e fermentar a celulose diretamente, podem ser utilizados na produção de açúcares a partir de celulose, ou de produtos de fermentação (ex. etanol, acetato) ou na produção de enzimas celulólicas, hemicelulólicas e

ligninolíticas; e pelo fato de também crescerem em lignina eles podem ser utilizados para tratamento de resíduo agrícola, tanto na produção de açúcares ou para aumentar a digestibilidade e conteúdo protéico desses resíduos, que poderiam se empregados para ração animal.

2.6. Aplicação das Enzimas Lignocelulolíticas

Nos últimos anos, a produção de enzimas celulolíticas tem sido estudada com grande detalhe, mas com progresso limitado. A maioria das pesquisas tem focado sobre um "screening" de possíveis mutantes para melhorar o desenvolvimento de microrganismos produtores de celulase. Compreender a cinética enzimática e a estrutura das celulases é de crucial importância para melhorar a atividade enzimática (BEGUIN & AUBERT, 1994).

Sob o ponto de vista prático, muitos processos envolvendo celulases e hemicelulases podem ser considerados.

No setor de processamento de alimentos, a lignocelulose natural (palhas, filetes de madeira) é tradicionalmente usada para crescimento de cogumelos comestíveis, como o *Agaricus bisporus*, que é geralmente produzido na faixa de 1 milhão de toneladas por ano (BEGUIN & AUBERT, 1994). As preparações de celulases e hemicelulases são utilizadas para clarificação de sucos de frutas, podendo também ajudar na extração do suco e óleo de frutas e sementes da polpa. As celulases e hemicelulases são utilizadas também no processamento de ração animal (BHAT & BHAT, 1997). O processamento têxtil é outra área onde a celulase tem sido sucessivamente colocada em uso. As celulases adicionadas em lavanderias cortam as microfibrilas que tendem a soltar as fibras de algodão após muitos ciclos de lavagem, ajudando a retornar a leveza e a tonalidade da cor dos tecidos de algodão, e elas também têm sido usadas

para remover o excesso do colorido do jeans azul pré-desbotado (BEGUIN e AUBERT, 1994). Há também um interesse considerável do uso da hemicelulase no processamento de papel, pois muitos estudos indicam que as xilanases ajudam a reduzir a quantidade de cloro requerido no processo de branqueamento da polpa (LINKO et al., 1992). Outra aplicação está no tratamento de resíduos, os quais são produzidos em grandes quantidades, seja como resíduos sólidos de aterros municipais ou como resíduos agrícolas celulósicos. A conversão anaeróbica em metano e dióxido de carbono por bactérias associadas está sendo utilizada como uma solução de escolha para o tratamento de resíduos industriais e fertilizantes (BEGUIN & AUBERT, 1994).

O fungo *Fusarium oxysporum* metaboliza diretamente a celulose, isto é, o processo de hidrólise e fermentação ocorrem em uma única operação (CHRISTAKOPOULOS et al., 1991). A proteína unicelular pode ser obtida por duas maneiras: a primeira, pelo crescimento direto do microrganismo no material celulósico (utilizando leveduras ou bactérias devido aos seus altos teores protéicos); e a segunda, pelo crescimento do microrganismo (levedura) na glicose obtida pela hidrólise enzimática do material lignocelulósico.

Além das aplicações citadas acima, os microrganismos celulolíticos e suas enzimas possuem também aplicações industriais (MANDELS, 1982; BHAT & BHAT, 1997).

❖ Uso do fungo anaeróbico:

- Decomposição de esgotos e resíduos; decomposição de esgotos com simultânea produção de enzimas e fermentação de produtos;
- Produção de alimentos fermentados (ração animal);
- Produção de enzimas (despolimerizantes).

❖ Uso de enzimas celulolíticas e xilanolíticas:

- Remover parede celular e fibra bruta: melhorar a extração fria de sementes contendo óleo; produção de sucos de plantas e frutas; clarificação de sucos de frutas; liberação do conteúdo celular para produção de aromas, enzimas, polissacarídeos ou proteínas de sementes e folhas; melhorar a reidratação dos vegetais secos; produção de protoplastos por engenharia genética de plantas superiores; melhorar as propriedades das fibras;
- Produção de glicose, xilose e outros açúcares solúveis: melhorar a qualidade dos alimentos de não herbívoros, aumentando o teor de açúcar na ração; uso industrial para produção de colas, adesivos e químicos como etanol, butanol; fonte de produção de adoçantes como frutose de glicose e xilitol de xilose; preparação de dextranas como alimentos espessantes; produção de proteína unicelular por leveduras;
- Aplicações especiais de xilanases: biopolpação e biobranqueamento de polpas Krafts em indústrias de papéis;

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Microrganismos

Sete linhagens de fungos lignocelulolíticos isoladas de amostras de solo provenientes de diferentes regiões foram utilizadas neste estudo. O microrganismo *Trichocladium canadense* (Q10) e o basidiomiceto (H2) foram isolados conforme descrito por DURRANT et al. (1995); a linhagem de *Fusarium oxysporum* (FUS) foi obtida no Departamento de Microbiologia da Universidade de Massachusetts em Amhest; a levedura *Geotrichum terrestre* (LD) foi isolada e identificada no Laboratório de Sistemática e Fisiologia Microbiana (Departamento de Ciência de Alimentos / FEA - UNICAMP); os deuteromicetos (F.870, F.1039, LH5) foram isolados de amostras de solo coletadas na reserva ecológica Juréia-Itatins (SP). As linhagens (Q10, FUS, H2 e LH5 e LD) foram mantidas em placas de Petri contendo meio agar-GYP (agar 1%, glicose 2%, extrato de levedura 0,5% e peptona 1%), enquanto que as linhagens F.870 e F.1039 foram mantidas em meio PDA (potato - dextrose - agar); todas sob refrigeração.

3.2. Inóculo

As linhagens foram crescidas em placas de Petri contendo meio Agar-GYP ou PDA, por um período de 5 dias a 30 °C, e como inóculo utilizando-se quadrados (1,0 x 1,0 cm) de agar-micélio.

Para cada Erlenmeyer (125 mL contendo 50 mL de meio) foram utilizados oito quadrados de agar-micélio (1,0 x 1,0 cm). Para cada tubo de ensaio (50 mL

contendo 15 mL de meio) foram utilizados três quadrados de agar-micélio (1,0 x 1,0 cm). Para cada Erlenmeyer (300 mL contendo 100 mL de meio) foram utilizados dezesseis quadrados de agar-micélio (1,0 x 1,0 cm).

Todos os experimentos com as linhagens e seus respectivos controles foram realizados em duplicata.

3.3. Fontes de carbono

Para o desenvolvimento do trabalho foram utilizadas as seguintes fontes de carbono: bagaço de cana – doado pela Usina Éster – Cosmópolis – SP (utilizou-se peneira mesh 1,19 mm), nas concentrações finais 1%, 2%, 4% , 10% e 20% (m/v); pó de serragem – mistura de cedrinho, peroba e pinheiro – obtido na marcenaria da Unicamp (utilizou-se peneira mesh 1,19 mm), nas concentrações finais 1%, 2%, 4%, 10% e 20% (m/v); papel de filtro Whatman nº1 (15 cm de comprimento x 1 cm de largura); papel jornal (moído) nas concentrações finais 1% e 2% (m/v); papel refugo (mistura de folhas de revista, sulfites impressas) na concentração final de 1% (m/v); xilana (Birchwood – Sigma Co) na concentração final de 1% (m/v), avicel (celulose microcristalina) na concentração final de 1% (m/v) e ácido lignosulfônico (Sigma Co) na concentração final de 1% (m/v).

3.4. Meios de Cultura

As linhagens foram inoculadas em diferentes meios líquidos (pH 5,5-6,0) conforme descrito na Tabela 3:

Tabela 3. Composição dos diferentes meios de cultura líquidos utilizados

Meio	Componente	Quantidade
Meio Nutriente (N)	KH_2PO_4	1 g/L
	$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	0,5 g/L
	CaCl_2	0,3 g/L
	I-cisteína HCl	1 g/L
	Risazurina 0,1%	1 mL/L
	* Sol. Minerais	1 mL/L
	** Sol. Vitaminas	0,5 mL/L
Meio Peptona (P)	KH_2PO_4	2 g/L
	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1,4 g/L
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,3 g/L
	CaCl_2	0,3 g/L
	$\text{FeSO}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	5 mg/L
	$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	1,56 mg/L
	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1,4 mg/L
	CoCl_2	2 mg/L
	Peptona	0,75 g/L
Meio Levedura (L)	KH_2PO_4	0,8 g/L
	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0,5 g/L
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,3 g/L
	CaCl_2	1 g/L
	$\text{FeSO}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1 mg/L
	$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	5 mg/L
	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	4 mg/L
	CoCl_2	2 mg/L
Extrato de levedura	0,2 g/L	
Meio Extratos (E)	Extrato de malte	0,5 %
	Extrato de levedura	0,2 %
	I-cisteína HCl	0,1 %
	Risazurina 0,1%	1 mL/L

Tabela 3 (cont.)

Meio Complemento		
	KH ₂ PO ₄	1 g/L
	(NH ₄) ₂ HPO ₄	0,5 g/L
	CaCl ₂	0,3 g/L
	Risazurina 0,1%	1 mL/L
	MnO ₂	5 x 10 ⁻² M
	Tween 80	1 mL/L
	* Sol. Minerais	1 mL/L
	** Sol. Vitaminas	0,5 mL/L

* Solução de minerais: tartarato de amônia, 0,22 g/L; sulfato de manganês, 0,66 g/L; sulfato de ferro, 0,15 g/L; sulfato de cobalto, 0,10 g/L; sulfato de zinco, 0,10 g/L; sulfato de cobre, 0,64 g/L e sulfato de alumínio potássio, 10 mg/L;

** Solução de vitaminas: biotina, 2 mg/L; ácido fólico, 2 mg/L; tiamina HCl, 5 mg/L; riboflavina, 5 mg/L; piridoxina HCl, 10 mg/L; cianocobalamina, 0,10 mg/L, ácido nicotínico, 5 mg/L; DL-pantotenato de cálcio, 5 mg/L e ácido tiótico, 5 mg/L.

Obs.: As soluções de sais e de vitaminas foram esterilizadas por filtração em membrana Millipore 0,22 µm e mantidas sob refrigeração de 4-10 °C. Posteriormente foram adicionadas a cada Erlenmeyer, obedecendo a concentração indicada na Tabela 3.

3.5. Condições Ambientais

3.5.1 Cultivo sob condição aeróbica

- As linhagens foram incubadas em Erlenmeyers fechados com tampões de alumínio e mantidos em estufas com temperatura controlada a 30 °C.

3.5.2 Cultivo sob condição microaeróbica

- As linhagens foram incubadas em Erlenmeyers fechados com tampões de alumínio e mantidos em recipiente hermeticamente fechado contendo placas de Microaerobac (PROBAC) sob temperatura controlada a 30 °C, proporcionando uma atmosfera de microaerobiose (5-15% de O₂ e 10% de CO₂).

3.5.3 Cultivo sob condição anaeróbica

- As linhagens foram incubadas em Erlenmeyers fechados com tampões de alumínio e mantidos em recipiente hermeticamente fechado contendo placas de anaerobacter (PROBAC) sob temperatura controlada a 30 °C. A reação de oxido-redução ocorrida na placa de anaerobiose após acréscimo de água proporcionou um ambiente de 9-13% de CO₂ e ausência de O₂ reduzindo o azul de metileno da fita indicadora a azul de leucometileno, incolor.

3.6. Condições de Cultivo

3.6.1. Crescimento aeróbico em diferentes meios de cultivo

3.6.1.1. Seleção do melhor meio de cultivo por análise visual do crescimento

As linhagens (H2, *Geotrichum terrestre* (LD), *Fusarium oxysporum* (FUS), LH5, F870 e F1039) foram crescidas sob condições aeróbicas em três diferentes meios de cultura (conforme descrito no item 3.4): meio nutriente, meio peptona e meio levedura, contendo como fonte de carbono uma tira de papel de filtro Whatman nº 1 (15 cm de comprimento x 1 cm de largura). Foi realizada

análise visual do crescimento, com o objetivo de verificar o melhor meio de cultivo para as linhagens.

3.6.1.2. Seleção do meio de cultivo por atividade enzimática

As linhagens (H2, *Geotrichum terrestre* (LD), *Fusarium oxysporum* (FUS), LH5, F870 e F1039) foram crescidas em dois diferentes meios de cultivo (conforme descrito no item 3.4): meio nutriente e meio extrato, sob condição aeróbica. Como fonte de carbono foram utilizados resíduos agroindustriais: serragem ou bagaço de cana na concentração de 2 % (peso seco/vol). As culturas foram incubadas por um período de 7, 14, 21 e 30 dias a 30°C.

3.6.2. Crescimento em bagaço de cana e serragem

3.6.2.1. Avaliação do crescimento aneróbico e microaeróbico em bagaço de cana e serragem (1%) e produção das enzimas ligninolíticas e celulolíticas

As linhagens H2, *Geotrichum terrestre* (LD), *Fusarium oxysporum* (FUS), LH5, F870 e F1039 foram crescidas em meio nutriente (conforme descrito no item 3.4) contendo 1 % (peso seco/vol.) de resíduo agroindustrial: bagaço de cana ou serragem. As culturas foram incubadas por 20 dias a 30°C sob condições anaeróbicas e microaeróbicas (conforme descrito no item 3.5).

3.6.2.2. Avaliação do crescimento microaeróbico em bagaço de cana e serragem (2%) e produção das enzimas celulolíticas e ligninolíticas

As linhagens selecionadas (H2, LH5, *Geotrichum terrestre* (LD) e *Fusarium oxysporum* (FUS)) foram cultivadas em meio nutriente (conforme descrito no item 3.4), contendo como fonte de carbono - serragem ou bagaço de cana na concentração 2%, sob um período de 20 dias a 30°C, sob condição microaeróbica (conforme descrito no item 3.5).

3.6.3. Avaliação do crescimento microaeróbico e anaeróbico e produção das enzimas celulolíticas e ligninolíticas sob diferentes fontes de carbono

As linhagens H2, LH5, *Geotrichum terrestre* (LD) e *Fusarium oxysporum* (FUS) foram cultivadas em meio nutriente (conforme descrito no item 3.4) sob quatro diferentes fontes de carbono: xilana, Avicel (celulose microcristalina), ácido lignosulfônico ou papel jornal, na concentração final de 1% (peso seco/vol), por um período de incubação de 20 dias, em duas diferentes condições de oxigenação: microaeróbica e anaeróbica (conforme descrito no item 3.5).

3.6.4. Crescimento em meio contendo papel jornal como fonte de carbono

3.6.4.1. Análise visual do crescimento das linhagens em papel jornal e papel refugo sob condição aeróbica

As linhagens H2, LH5, *Geotrichum terrestre* (LD) e *Fusarium oxysporum* (FUS) foram cultivadas em meio nutriente (conforme descrito no item 3.4) em duas diferentes fontes de carbono: papel de jornal (moído) ou papel de refugo (mistura de papéis de revistas, folhas sulfite impressas, entre outros tipos diversos de papéis encontrados no laboratório), na concentração final de 1% (peso seco/vol), sob condição aeróbica, durante 30 dias de incubação. Após o período verificou-se visualmente o crescimento das linhagens.

3.6.4.2. Avaliação das atividades enzimáticas celulolíticas e ligninolíticas após crescimento dos fungos em papel jornal sob condição microaeróbica

As linhagens H2, LH5, *Geotrichum terrestre* (LD), *Fusarium oxysporum* (FUS) e *Trichocladium canadense* (Q10) foram cultivadas em meio nutriente (conforme descrito no item 3.4) contendo papel jornal como fonte de carbono, na concentração de 2% (peso seco/vol), por um período de 20, 30 e 40 dias, sob condição microaeróbica (conforme descrito no item 3.5).

3.6.5. Avaliação da composição das frações fibras após crescimento das linhagens em meio contendo bagaço de cana, serragem e papel jornal

As linhagens H2, LH5, *Geotrichum terrestre* (LD), *Fusarium oxysporum* (FUS) e *Trichocladium canadense* (Q10) foram cultivadas em meio nutriente (conforme descrito no item 3.4), em três diferentes fontes de carbono: serragem, bagaço de cana ou papel jornal, por um período de 20 dias na concentração de 2%.

3.6.6. Crescimento variando as condições de oxigenação e determinação das atividades enzimáticas celulolíticas e ligninolíticas em reação e em gel (zimograma) e produção de biomassa fúngica.

As linhagens (H2, LH5, *Geotrichum terrestre* (LD), *Fusarium oxysporum* (FUS) e *Trichocladium canadense* (Q10) foram cultivadas em meio nutriente (conforme descrito no item 3.4), em três diferentes fontes de carbono: serragem, bagaço de cana ou papel jornal, nas concentrações de 4% e 10%. Para este teste foram utilizados as seguintes condições combinadas de oxigenação:

- Condição A: 14 dias sob agitação (aeróbica) seguido de 7 dias sob condição microaeróbica
- Condição B: 7 dias sob agitação (aeróbica) seguido de 21 dias sob condição microaeróbica
- Condição C: 7 dias sob agitação (aeróbica) seguido de 14 dias sob condição microaeróbica

3.6.7. Crescimento microaeróbico em diferentes concentrações de substrato e avaliação da biomassa fúngica e das enzimas celulolíticas e ligninolíticas

As linhagens H2, LH5, *Geotrichum terrestre* (LD), *Fusarium oxysporum* (FUS) e *Trichocladium canadense* (Q10) foram cultivadas em meio nutriente (conforme descrito no item 3.4) contendo serragem ou bagaço de cana como fontes de carbono, em duas concentrações diferentes: 4 e 10%. As linhagens foram incubadas por um período de 20, 30 e 40 dias, sob condição microaeróbica (conforme descrito no item 3.5).

3.6.8. Efeito de diferentes compostos na fermentação e produção enzimática das linhagens.

3.6.8.1. Avaliação das atividades enzimáticas celulolíticas e ligninolíticas, e dos produtos de fermentação produzidos pelas linhagens após adição de Tween 80 ao meio de cultivo

O efeito da adição de tween 80 foi verificado nas linhagens selecionadas. As linhagens H2, *Geotrichum terrestre* (LD) e *Fusarium oxysporum* (FUS), foram crescidas em meio nutriente (conforme descrito no item 3.4), contendo serragem e bagaço de cana como fontes de carbono na concentração de 4%. Após o crescimento das linhagens por 30 dias sob condição microaeróbica (conforme descrito no item 3.5).

O tween 80 foi adicionado ao meio nutriente (descrito no item 3.4) nas seguintes concentrações: 0 mL/L (sem tween 80); 0,5 mL/L; 1,0 mL/L; 2,0 mL/L.

3.6.8.2. Determinação dos produtos de fermentação produzidos pelas linhagens após adição nutrientes suplementares ao meio de cultivo

O efeito da adição de alguns suplementos foi verificado nas linhagens selecionadas. As linhagens (H2, *Geotrichum terrestre* (LD) e *Fusarium oxysporum* (FUS), foram crescidas em meio nutriente (conforme descrito no item 3.4), contendo serragem ou bagaço de cana como fontes de carbono na concentração de 4%. Após o crescimento das linhagens por 30 dias sob condição microaeróbica (conforme descrito no item 3.5).

Os suplementos foram adicionados separadamente ao meio nutriente nas seguintes concentrações: KNO_3 : $4 \times 10^{-2} \text{ M}$ (K); Na_2SeO_3 : 10^{-3} M (Se); Citrato Férrico Amoníaco: 10^{-3} M (Fe); MnO_2 : $5 \times 10^{-2} \text{ M}$ (Mn).

3.6.8.3. Determinação dos produtos de fermentação produzidos pelas linhagens após adição de diferentes concentrações de cisteína no meio de cultivo

O efeito causado pela adição de cisteína foi verificado nas linhagens selecionadas. As linhagens (H2, *Geotrichum terrestre* (LD) e *Fusarium oxysporum* (FUS), foram crescidas em meio nutriente (conforme descrito no item 3.4), contendo serragem ou bagaço de cana como fontes de carbono na concentração de 4%. Após o crescimento das linhagens por 30 dias sob condição microaeróbica (conforme descrito no item 3.5).

A cisteína foi adicionada ao meio nutriente nas seguintes concentrações finais (p/v): 0% (sem cisteína); 0,025%; 0,05%; 0,10%; 0,15%.

3.6.9. Crescimento microaeróbico em meio complemento e determinação das enzimas celulolíticas e ligninolíticas em reação e em gel (zimograma), da biomassa fúngica, dos produtos de fermentação.

As linhagens (H2, *Geotrichum terrestre* (LD) e *Fusarium oxysporum* (FUS), foram cultivadas em meio complemento (conforme descrito no item 3.4, esta formulação contém adição de suplementos, tween 80 e ausência de cisteína) contendo serragem ou bagaço de cana como fontes de carbono, em três concentrações diferentes: 4, 10 e 20%. As linhagens foram incubadas por

um período de 20, 30, 40, 60 e 90 dias, sob condição microaeróbica (conforme descrito no item 3.5).

3.7. Determinação do crescimento visual das linhagens

Os crescimentos visuais dos fungos para cada dia de cultivo com as respectivas fontes de carbono foram observados e determinados de acordo com um padrão adaptado da ASTM (American Society for testing materials) Standard Methods G21-90 (1990) e de DURRANT et al., 1995, apresentando as seguintes faixas de crescimento: (-) ausência de crescimento, (+) pouco crescimento com pequena turvação fragmentos de micélio soltos no meio, (++) moderado crescimento com surgimento de 'pellet' fino na superfície do meio, e (+++) ótimo crescimento de massa micelial da metade à todo frasco.

3.8. Preparo das amostras para as análises experimentais

Após crescimento nas diferentes condições de cultivo as amostras foram centrifugadas por 15 minutos a 13.674 G (5°C), os caldos enzimáticos (sobrenadante) foram distribuídos em recipientes adequados e mantidos em freezer (-20 °C) até sua utilização para determinação de atividade celulolítica; de atividade ligninolítica; das bandas de atividade enzimática em gel (zimogramas); e dos produtos de fermentação. O resíduo obtido após centrifugação foi separado para determinação de biomassa fúngica e determinação da fração fibra. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

3.9. Determinação das Atividades Enzimáticas Ligninolíticas

Todas as determinações das atividades enzimáticas foram realizadas em triplicata. Os valores do controle foram descontados dos resultados obtidos com as amostras. As leituras de absorbância foram realizadas em espectrofotômetro UV/VIS. As atividades foram expressas em U.L⁻¹.min⁻¹, utilizando-se a seguinte

fórmula:

$$U/L = \frac{\Delta \text{ Abs} \times 10^6}{\epsilon \times R \times T}$$

Onde: $\Delta \text{ Abs}$ = Absorbância final – Absorbância inicial

ϵ = específico para cada enzima

R = volume de sobrenadante (L)

T = tempo da reação (min)

3.9.1. Liginina Peroxidase - LiP

Esta atividade foi determinada pela oxidação do álcool veratrílico ($\epsilon_{310} = 9.300 \text{ mol.L}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) (TIEN & KIRK, 1984). A mistura de reação foi composta por 0,6 mL de sobrenadante (descrito no item 3.7), 0,2 mL de H₂O₂ 2 mM e 0,2 mL de uma solução de álcool veratrílico 2 mM em tampão tartarato de sódio 0,4 M pH 3,0. A reação foi iniciada pela adição de H₂O₂ e o aparecimento de aldeído veratrílico foi determinado lendo-se a absorbância a 310 nm, durante 10 minutos. Esta atividade foi expressa em U.L⁻¹.min⁻¹.

3.9.2. Manganês Peroxidase - MnP

A atividade de MnP foi determinada pela oxidação do vermelho de fenol ($\epsilon_{610} = 4.460 \text{ mol.L}^{-1}.\text{cm}^{-1}$), na presença de manganês e peróxido de hidrogênio (KUWAHARA et al., 1984). A mistura de reação foi composta por 0,5 mL de sobrenadante (descrito no item 3.7); 0,1 mL de lactato de sódio 0,25 M; 0,05 mL de MnSO_4 2 mM; 0,2 mL de albumina bovina 0,5%; 0,1 mL de vermelho de fenol 0,1% e 0,05 mL de peróxido de hidrogênio 2 mM em tampão succinato de sódio 0,2 M (pH 4,5). Essa mistura foi incubada por 5 minutos a 30 °C, e a reação foi interrompida adicionando-se 0,04 mL de NaOH 2,0 M.

Após a adição de NaOH foi lida a absorbância a 610 nm. A preparação do branco foi realizada da mesma forma, porém utilizando-se o sobrenadante tratado a 100 °C durante 30 minutos. A atividade é expressa por $\text{U.L}^{-1}.\text{min}^{-1}$.

3.9.3. Lacase

A atividade de lacase foi determinada na ausência de H_2O_2 exógeno no meio de reação - tipo lacase (SZKLARZ et al., 1989 - modificado), utilizando-se siringaldazina 0,1% em etanol como substrato.

A mistura de reação foi constituída por 0,6 mL de sobrenadante (descrito no item 3.7); 0,2 mL de tampão citrato-fosfato 0,05 mM (pH 5,0); 0,1 mL de siringaldazina 0,1% em etanol e 0,1 mL de água destilada. A oxidação da siringaldazina até sua forma quinona foi acompanhada durante 10 minutos a 525 nm ($\epsilon_{525} = 65.000 \text{ mol.L}^{-1}.\text{cm}^{-1}$). A atividade foi expressa em $\text{U.L}^{-1}.\text{min}^{-1}$.

3.9.4. Peroxidase

Esta atividade foi determinada na presença de peróxido de hidrogênio (SZKLARZ et al., 1989). A mistura de reação foi preparada nas mesmas condições como para lacase, utilizando-se o mesmo substrato enzimático (siringaldazina 0,1% em etanol), porém na presença de 0,1 mL de H₂O₂ mM em lugar da água destilada. A atividade de peroxidase foi expressa em U.L⁻¹.min⁻¹.

3.10. Determinações das Atividades Enzimáticas Celulolíticas

Todas as determinações das atividades enzimáticas foram realizadas em triplicata 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 e avicelase, a glicose foi utilizada como padrão e para β-glicosidase foi utilizado p-nitrofenol, respectivamente. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como o número de μmoles de açúcar redutor ou μmoles de p-nitrofenol produzido por minuto por L de enzima (U/L), sob as condições do ensaio.

3.10.1. Carboximetilcelulase (CMCase)

A mistura da reação foi constituída de 1,0 mL de sobrenadante (descrito no item 3.7) (1.0 mL) e 1,0 mL de solução de carboximetilcelulose 1% (tampão acetato 0,05 M, pH 5,0) esta mistura foi incubada a 50 °C por 30 minutos, e a reação foi interrompida adicionando-se 2,0 mL de DNS, e colocada em banho

maria em ebulição por 5 minutos. Em seguida foi realizada a leitura em espectrofotômetro a 550 nm. Os açúcares redutores liberados foram determinados pelo método do ácido-3,5-dinitrosalicílico (DNS) conforme MILLER et al. (1960), utilizando-se uma curva padrão de glicose.

3.10.2. Avicelase

Foi realizado da mesma maneira que para carboximetilcelulase, apenas substituindo-se a solução de carboximetilcelulose pela suspensão 1% de Avicel (celulose microcristalina) em tampão acetato 0,05 M, pH 5,0. Após incubação a 50°C, por 30 minutos, e a reação foi interrompida adicionando-se 2,0 mL de DNS, e colocada em banho maria em ebulição por 5 minutos. Em seguida foi realizada a leitura em espectrofotômetro a 550 nm. Os açúcares redutores liberados foram determinados pelo método do ácido-3,5-dinitrosalicílico (DNS) conforme MILLER et al. (1960), utilizando-se uma curva padrão de glicose.

3.10.3. Atividade de β -glicosidase

A atividade da β -glicosidase (aril- β -D-glicosidase) foi determinada incubando 1,0 mL de p-nitrofenil- β -D-Glucopiranosideo 5 mM (tampão acetato 0,05 M, pH 5,0) e 0,5 mL de sobrenadante (descrito no item 3.7) por 15 min. a 50°C, a reação foi interrompida após adição de da adição de 2,0 mL Na_2CO_3 1M. O p-nitrofenol produzido, foi medido espectrofotometricamente a 410 nm, utilizando-se a curva padrão.

3.11. Determinação de Biomassa Fúngica

A biomassa fúngica foi determinada de acordo com a metodologia de MESSNER & KUBICEK (1991). Após o crescimento das linhagens e centrifugação das amostras, foi reservado 1 g do substrato sólido (conforme item 3.7), que foi homogeneizado com 15 mL de NaOH 0,1N, em Sonifer por 10 minutos a 4°C. A suspensão foi colocada em Eppendorf, centrifugada, e a proteína contida no sobrenadante foi medida de acordo com BRADFORD (1976). O método, é um procedimento simples e seguro para determinar a concentração de proteína solúvel. Este método envolve a adição de um corante ácido (neste caso Coomassie Brilliant Blue G-250) na solução de proteína, e subsequente leitura a 595 nm em espectrofotômetro. Comparando o resultado obtido das amostras com a curva padrão, obtemos a concentração de proteína presente. O resultado final foi expresso em mg de biomassa fúngica/ 100 g de substrato.

3.12. Determinação dos Produtos de Fermentação

Os produtos de fermentação foram determinados utilizando-se cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). A eluição foi monitorada usando detector ultravioleta (comprimento de onda 210 nm – para detecção dos ácidos orgânicos) e um diferencial de índice de refração (utilizado para detecção do etanol), ambos conectados em série. Condições de análise: fase móvel H₃PO₄ 0,1%, com fluxo de 0,5 mL.min⁻¹ a 30°C; fase estacionária poliestirenodivinilbenzeno; coluna Supelcogel C610H, e o volume injetado de 20 µL. Após crescimento dos microrganismos nas diferentes condições de cultivo os sobrenadantes (descrito no item 3.7) foram analisados a fim de verificar a

produção de ácidos orgânicos e etanol. O sobreadante antes de ser injetado no cromatógrafo foi filtrado em membrana Millipore (0,45 μm). Foi realizada a curva padrão dos seguintes ácidos orgânicos: ácido cítrico, ácido láctico, ácido tartárico e ácido acético (Kit organic acids – Sigma Co) e do etanol (Merck – grau analítico). A quantificação dos ácidos orgânicos presentes nas amostras foi realizada através da curva de calibração para cada composto. Os valores foram expressos em mg/mL.

3.13. Determinação das Frações Fibras

O conteúdo das frações fibras das amostras foram analisados em triplicata, segundo os métodos de VAN SOEST (1963) e VAN SOEST & WINE (1967). Após o crescimento das linhagens e centrifugação das amostras, foi reservado 1 g do substrato sólido (conforme item 3.7), que foi homogeneizado com 100 mL de solução para fibra detergente ácida - FDA (1 litro de H_2SO_4 1 N contendo 20 g de CTAB). Após fervura de 1 hora, o líquido foi filtrado em cadinho previamente pesado, lavado com água e acetona (por 2 vezes). Levado a estufa 100 °C por 12 horas. Os cadinhos contendo o resíduo de FDA (cadinho FDA) foram dispostos em bandeja de vidro inclinada, adicionando H_2SO_4 72% até cobrir completamente o conteúdo, a mistura foi homogeneizada com auxílio de um bastão de vidro até virar uma pasta, e então deixada a temperatura ambiente por 3 horas, quando o volume foi completado com ácido e homogeneizado. Os cadinhos foram lavados com água quente até que todo ácido tenha sido eliminado, levados a estufa 100 °C por 12 horas, pesados (cadinho ácido) e colocados na mufla 500 °C por 2 horas. Após este período foram deixados por 1 hora a 105 °C, resfriados em dessecador e pesados novamente (cadinho mufla). Com o resíduo resultante do processo descrito acima determinou-se as seguintes frações:

- Resíduo celulose: cadinho FDA – cadinho ácido
- % Celulose: resíduo celulose x 100
- Resíduo lignina: cadinho ácido – cadinho mufla
- % Lignina: resíduo lignina x 100

3.14. Determinação das bandas de atividade enzimática em gel de poliacrilamida - zimograma

A técnica de zimograma envolve a eletroforese utilizando gel de poliacrilamida embebido no substrato da enzima de interesse. A enzima é visualizada após incubação com uma mistura de reação apropriada. As bandas de atividade da enzima Carboximetilcelulase foram detectadas por zimogramas de géis de poliacrilamida contendo carboximetilcelulose como substrato. De maneira similar, as bandas de atividades de β -glicosidase, lacase e manganês peroxidase foram detectadas nos zimogramas contendo os respectivos substratos para as determinações enzimáticas.

As bandas de proteínas foram separadas por eletroforese de gel de poliacrilaminada - PAGE sob condição não desnaturante (ausência de dodecil sulfato de sódio). As análises foram feitas em equipamento Mighty Small II SE 250 (Pharmacia), sob sistema de corrida vertical com mini gel de poliacrilamida 12,5% gel de corrida e 4% gel de empacotamento (Tabela 4). Para determinação da atividade de carboximetilcelulase foi desenvolvido um gel contendo o substrato específico (Tabela 5).

Antes da eletroforese, os sobrenadantes (conforme item 3.7) foram tratados da seguinte forma:

1. Nativa: sem nenhum tratamento térmico, ausência de dodecil sulfato de sódio (SDS)

2. Desnaturação Branda Com Tratamento Térmico: incubadas por 7 min. a 50 °C, na presença de SDS

3. Desnaturação Branda Sem Tratamento Térmico: incubadas a temperatura ambiente por 1 hora, na presença de SDS

Tabela 4: Composição do gel de poliacrilamida

Gel	12,5% (corrida)	4% (empacotamento)
Acrilamida/Bis (30:0,8)	6,25 mL	1,5 mL
Tampão Tris (pH 8,8)	3,75 mL	-
Tampão Tris (pH 6,8)	-	2,5 mL
H ₂ O	4,8 mL	5,5 mL
Persulfato de Amônia	200 uL	100 uL
TEMED	20 uL	10 uL

Tabela 5: Composição do gel contendo substrato carboximetilcelulose (CMC)

Gel	
Acrilamida/Bis (30:0,8)	6,25 mL
CMC 1% em Tampão Acetato de Sódio	8,55 mL
Persulfato de Amônia	200 uL
TEMED	20 uL

3.14.1. Atividade Manganês Peroxidase

A presença de manganês peroxidase foi determinada pelo aparecimento de banda verde indicando precipitação do reagente ABTS (FU et al., 1997), na presença de sulfato de manganês e peróxido de hidrogênio. A mistura de reação foi composta por tampão acetato de sódio 55,6 mM pH 4,5 contendo: $MnSO_4$ 40 mM; solução ABTS 0,075% e peróxido de hidrogênio 0,04 mM. Após corrida o gel (Tabela 4) foi incubado submerso nesta mistura por 30 minutos a 30 °C.

Para a atividade de manganês peroxidase foram testadas amostras nativas e com desnaturação branda com tratamento térmico (conforme item 3.13).

3.14.2. Atividade de β -glicosidase

A presença de β -glicosidase (aril- β -D-glicosidase) foi determinada pelo aparecimento de banda amarela indicando produção de p-nitrofenol (PITSON et al., 1997). A mistura de reação foi composta por tampão acetato de sódio 0,05 M, pH 5,0 contendo: p-nitrofenil- β -D-glucopiranosideo 0,02 mM. Após corrida o gel (Tabela 4) foi incubado submerso nesta mistura por 15 min. a 50 °C, a reação foi interrompida após adição de da adição de Na_2CO_3 1 M.

Para a atividade de β -glicosidase foram testadas amostras nativas; desnaturação branda com tratamento térmico e desnaturação branda sem tratamento térmico (conforme item 3.13).

3.14.3. Atividade de Lacase (BUSWELL, 1995)

A presença de lacase foi determinada pelo aparecimento de banda verde indicando precipitação do reagente ABTS (BUSWELL, 1995). A mistura de reação foi composta por tampão acetato de sódio 0,125 M pH 5,0 contendo: solução ABTS 0,03%. Após corrida o gel (Tabela 4) foi incubado submerso nesta mistura por 30 minutos a 30 °C.

Para a atividade de lacase foram testadas amostras nativas (conforme item 3.13).

3.14.4. Atividade de Carboximetilcelulase

Para determinação da atividade de carboximetilcelulase foram utilizadas várias metodologias (POLSCHRÖDER et al., 1994, LIN & THOMPSON, 1991 e CAVEDON et al., 1990) as quais foram adaptadas afim de se obter os melhores resultados com as amostras analisadas, uma vez que, as mesmas não foram concentradas em nenhuma etapa dos experimentos.

Após corrida o gel (Tabela 4) foi colocado em contato com o outro gel (Tabela 5) contendo o substrato específico, praticamente colados um ao outro. O sanduíche foi deixado em uma caixa úmida e incubado submerso a 50 °C sob um período de 2 horas. Após o período de incubação os géis foram descolados e o gel contendo o substrato foi colocado em outro recipiente contendo uma solução de Congo Red 0,1%. Após 30 minutos o gel foi descorado com uma solução de NaCl 1 M, nesta etapa o aparecimento de zonas de clareamento indicam a presença da enzima carboximetilcelulase.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1. Crescimento aeróbico em diferentes meios de cultivo

4.1.1. Seleção do melhor meio de cultivo por análise visual do crescimento

As linhagens H2, *G. terrestre* (LD), *F. oxysporum* (FUS), LH5, F.1039 e F.870 foram cultivadas em meio nutriente, meio peptona e meio levedura, contendo uma tira de papel de filtro - Whatman nº1 (15 x 1 cm) como fonte de carbono. Após análise visual, observou-se que os microrganismos utilizaram o papel de filtro como fonte de carbono tanto no meio nutriente como no meio levedura, enquanto que no meio peptona poucas linhagens o utilizaram para crescimento. O crescimento das linhagens nos diferentes meios está apresentado na Tabela 6. De acordo com os resultados obtidos foi possível selecionar o meio nutriente.

Tabela 6. Crescimento das linhagens em meio contendo papel de filtro

LINHAGENS	MEIO NUTRIENTE	MEIO PEPTONA	MEIO LEVEDURA
H2	+++	++	+++
LD	+++	++	++
FUS	+++	+	+++
LH5	+++	+	++
F.1039	++	+	++
F.870	++	-	+

(-) ausência de crescimento, (+) pouco crescimento, (++) moderado crescimento, (+++) ótimo crescimento (adaptado da ASTM Standard Methods G21-90, 1990 e de DURRANT et al, 1995).

4.1.2. Seleção do meio de cultivo por atividade enzimática

Neste experimento analisou-se o comportamento dos microrganismos H2, *G. terrestre* (LD), *F. oxysporum* (FUS), LH5, F.1039 e F.870 em dois diferentes meios de cultura, ou seja, meio nutriente (N) e meio extratos (E), contendo serragem ou bagaço de cana como fonte de carbono na concentração de 2%, por diferentes períodos de crescimento, sob condições aeróbicas. Como os resultados obtidos (item 4.1.1.) com meio contendo extrato de levedura foram satisfatórios, este composto foi testado novamente, em associação com extrato de malte. Os resultados das atividades enzimáticas obtidas pelas linhagens estão apresentados nas figuras 9 -12.

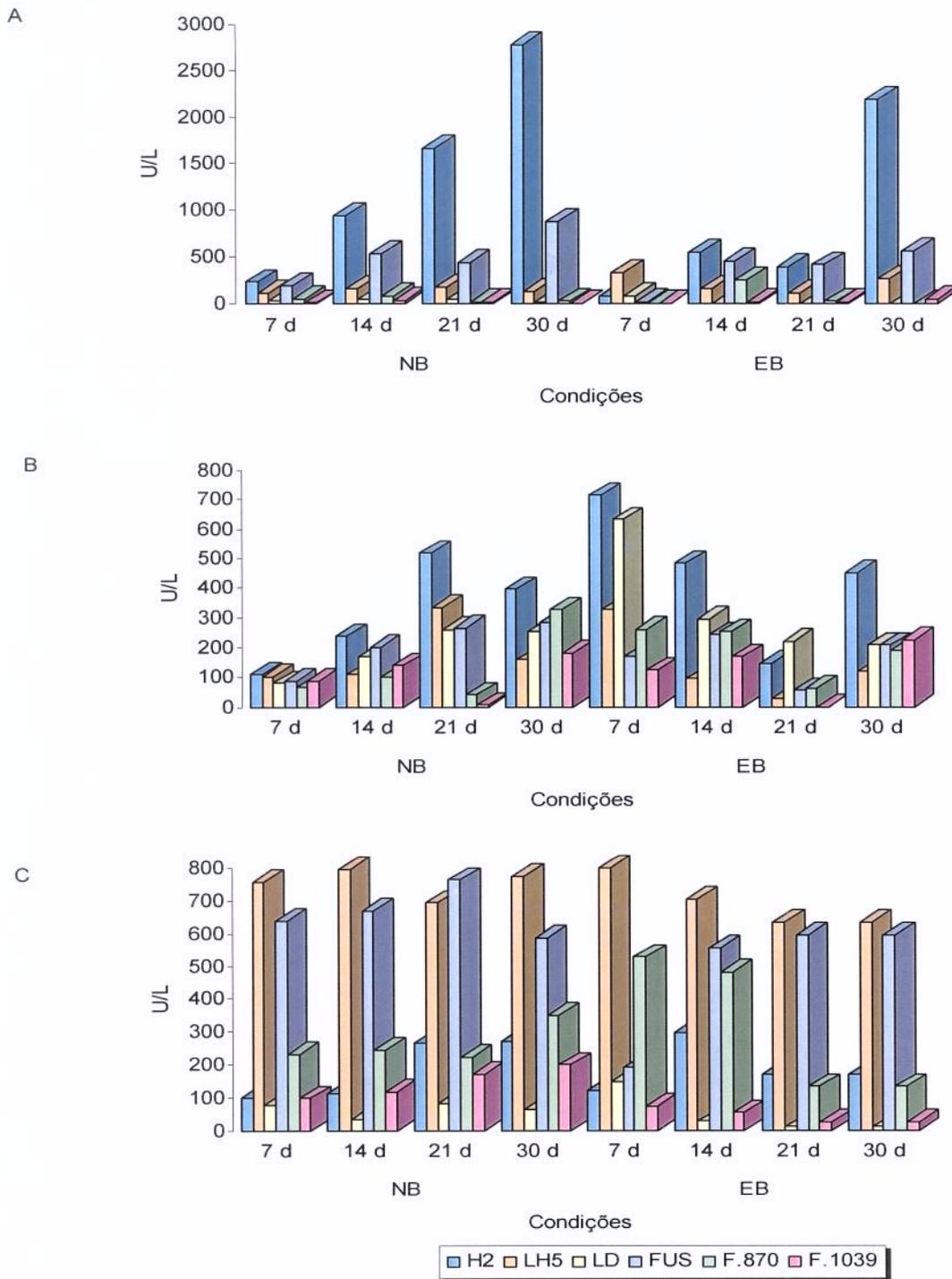


Figura 9. Atividades celulolíticas das linhagens crescidas por 7, 14, 21 e 30 dias (7d, 14d, 21d e 30d), sob condição aeróbica em meio nutriente (NB) e extratos (EB), contendo bagaço de cana. A – carboximetilcelulase, B – avicelase e C – β -glucosidase. Linhagens: basidiomiceto H2, deuteromicetos LH5, F.870 e F.1039, *G. terrestre* (LD) e *F. oxysporum* (FUS).

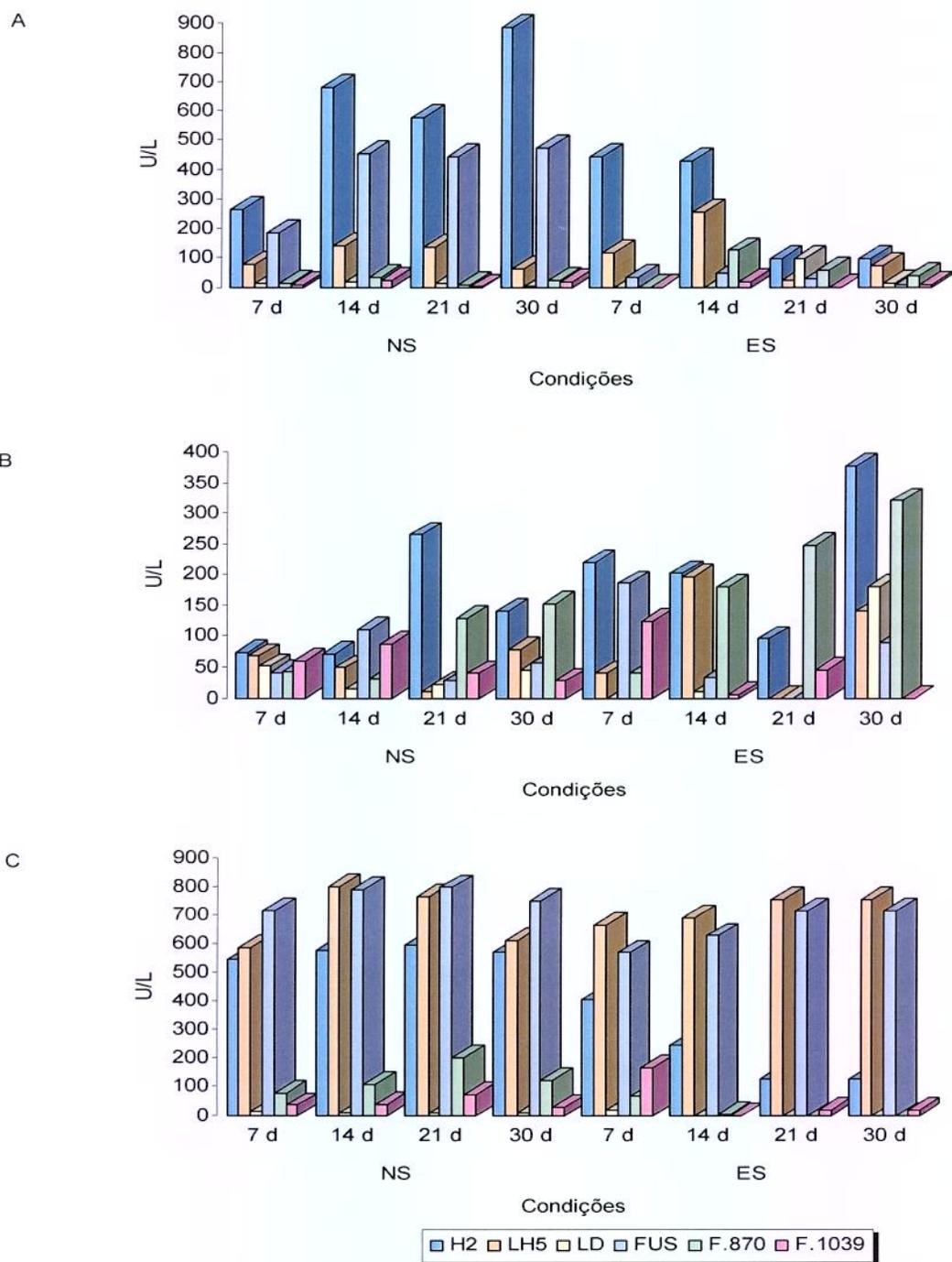


Figura 10. Atividades celulolíticas das linhagens crescidas por 7, 14, 21 e 30 dias (7d, 14d, 21d e 30d), sob condição aeróbica em meio nutriente (NB) e extratos (EB), contendo serragem. A – carboximetilcelulase, B – avicelase e C – β -glicosidase. Linhagens: basidiomiceto H2, deuteromicetos LH5, F.870 e F.1039, *G. terrestre* (LD) e *F. oxysporum* (FUS).

De acordo com os resultados apresentados nas Figuras 9 e 10 observou-se que apenas as linhagens H2, LH5 e *F. oxysporum* (FUS) apresentaram atividade de CMCase. A linhagem H2 apresentou alta atividade de CMCase com 30 dias de crescimento em meio nutriente (2.750 U/L) e extratos (2.250 U/L), ambos contendo bagaço de cana como fonte de carbono (Figura 9A). No entanto, após crescimento em serragem como fonte de carbono a linhagem H2 apresentou produção de CMCase (900 U/L) com 30 dias de cultivo em meio nutriente (Figura 10A).

Todas as linhagens apresentaram atividade de avicelase, nos meios avaliados durante o período estudado. A linhagem H2 (Figura 9B) foi a que apresentou a melhor atividade de avicelase (720 U/L), com 7 dias de crescimento em meio extratos contendo como fonte de carbono bagaço de cana, seguido da levedura *G. terrestre* (LD) (620 U/L), nas mesmas condições.

De acordo com as Figuras 9C e 10C observou-se que as linhagens H2, LH5 e *F. oxysporum* (FUS) apresentaram bons resultados de β -glicosidase, sendo que o melhor resultado foi obtido com as linhagens *F. oxysporum* (FUS) (800 U/L) e LH5 (800 U/L) cultivadas por 14 dias em meio nutriente contendo serragem (Figura 10C). As linhagens *F. oxysporum* (FUS) e LH5 apresentaram os melhores resultados de β -glicosidase, após crescimento em contendo bagaço de cana como fonte de carbono tanto no meio nutriente quanto meio extratos (Figura 9C).

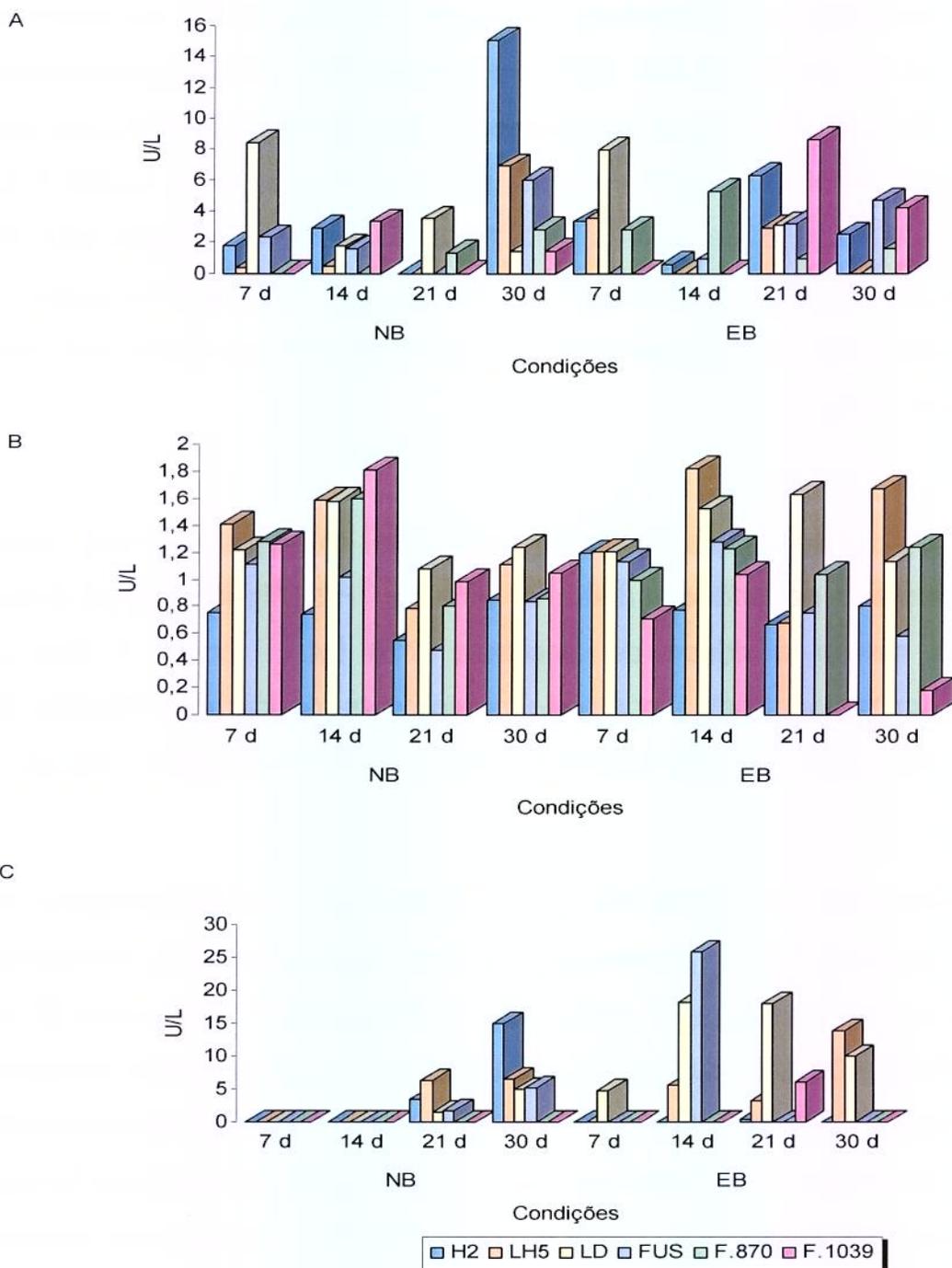


Figura 11. Atividades ligninolíticas das linhagens crescidas por 7, 14, 21 e 30 dias (7d, 14d, 21d e 30d), sob condição aeróbica em meio nutriente (NB) e extratos (EB), contendo bagaço de cana. A – lignina peroxidase, B – lacase e C – manganês peroxidase. Linhagens: basidiomiceto H2, deuteromicetos LH5, F.870 e F.1039, *G. terrestre* (LD) e *F. oxysporum* (FUS).

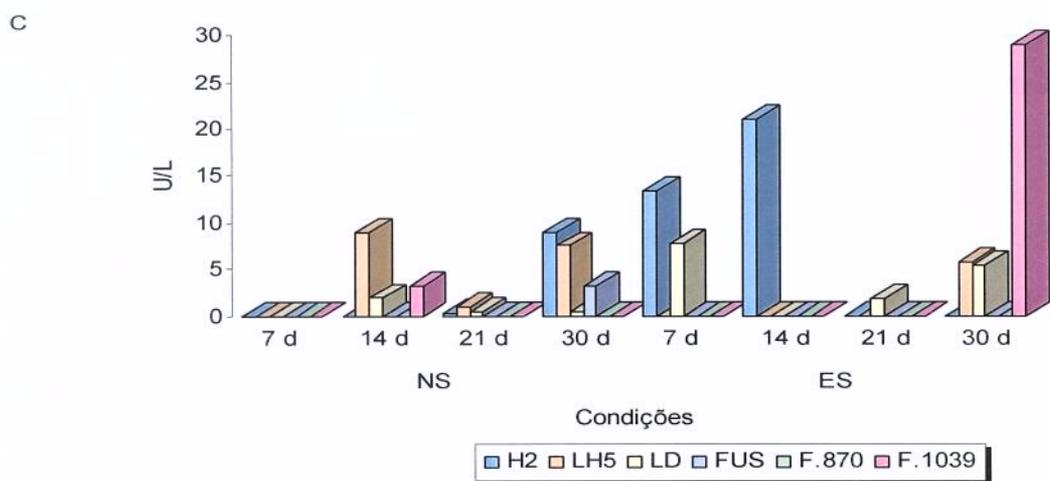
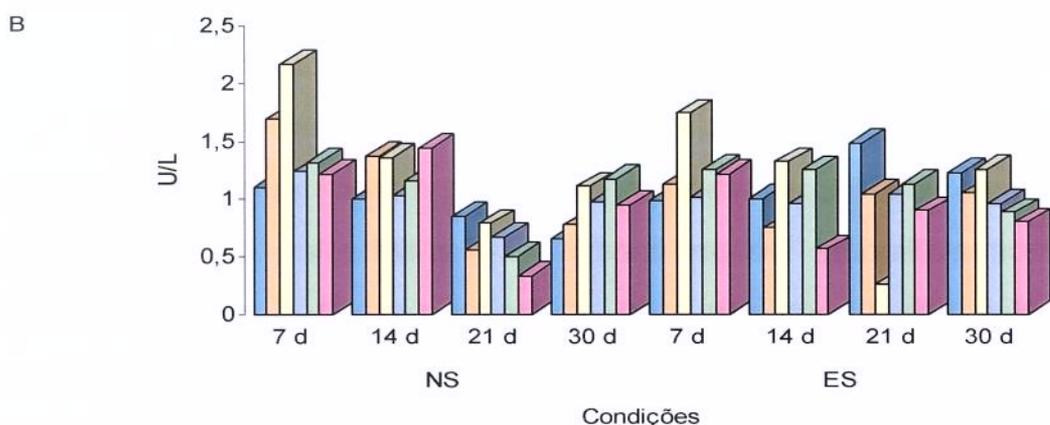
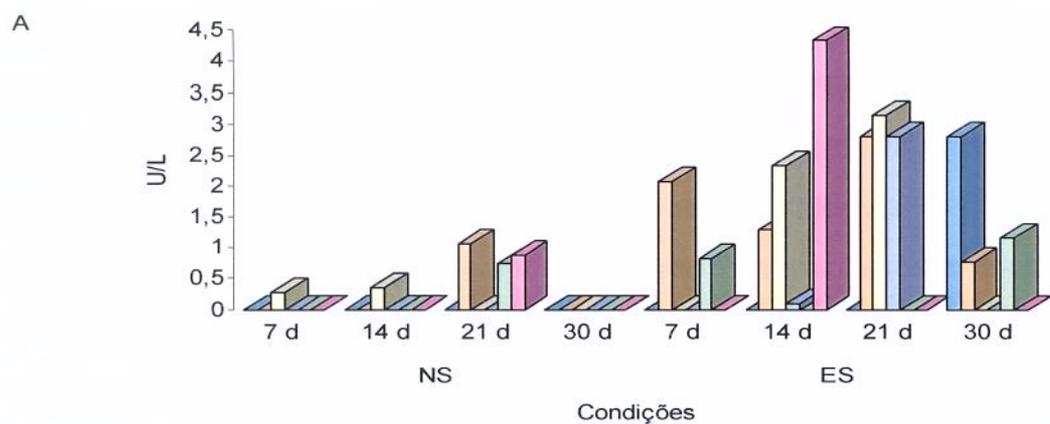


Figura 12. Atividades ligninolíticas das linhagens crescidas por 7, 14, 21 e 30 dias (7d, 14d, 21d e 30d), sob condição aeróbica em meio nutriente (NB) e extratos (EB), contendo serragem. A – lignina peroxidase, B – lacase e C – manganês peroxidase. Linhagens: basidiomiceto H2, deuteromicetos LH5, F.870 e F.1039, *G. terrestre* (LD) e *F. oxysporum* (FUS).

Analisando-se os resultados das Figuras 11 e 12 pode-se observar que o meio contendo bagaço de cana foi melhor para atividade de LiP, sendo o pico máximo obtido com 30 dias de cultivo em meio nutriente com a linhagem H2 (15 U/L) (Figura 11A). A levedura *G. terrestre* (LD) também apresentou atividade de LiP, com 7 dias de crescimento em meio nutriente (9 U/L) e extratos (8 U/L), ambos contendo bagaço de cana como fonte de carbono (Figura 11A). As menores atividades de LiP foram obtidas quando os fungos foram crescidos em meio nutriente contendo serragem como fonte de carbono durante o período avaliado (Figura 12A).

A atividade de lacase foi produzida em todas as condições pelos microrganismos avaliados. De um modo geral a linhagem *G. terrestre* (LD) apresentou atividade na maioria das condições, sendo o pico máximo de atividade (2,25 U/L) quando cultivada por 7 dias, em meio nutriente, contendo serragem como fonte de carbono (Figura 12B). A linhagem LH5 também apresentou atividade de lacase (1,8 U/L) com 14 dias de crescimento em meio extratos contendo bagaço de cana (Figura 11B).

Nem todas as linhagens apresentaram atividade de manganês peroxidase como pode ser observado nas Figuras 11C e 12C. A linhagem F.1039 (30 U/L) foi a que apresentou o máximo de atividade com 30 dias de crescimento em meio nutriente contendo serragem como fonte de carbono (Figura 12C). De um modo geral a linhagem *G. terrestre* (LD) apresentou atividade de MnP na maioria dos dias analisados quando cultivada em meio extratos contendo bagaço de cana (Figura 11C). Somente os fungos H2 e *F. oxysporum* (FUS) apresentaram atividade de MnP com 30 dias de cultivo em meio nutriente contendo bagaço de cana como fonte de carbono (Figura 11C). Já quando utilizou-se meio nutriente e serragem houve um maior número de linhagens

produzindo MnP, sendo que as maiores atividades foram obtidas com 30 dias de cultivo das linhagens H2 e *F. oxysporum* (FUS) (Figura 12C).

ARORA & GILL (2001) estudaram a produção de lacase em dois diferentes meios de cultivos (meio extrato de malte e meio de sais), sendo que a produção da enzima foi obtida em meio extrato de malte ou meio extrato de malte e sais, quando comparado com meio contendo apenas sais. De acordo com os autores a presença de aminoácidos aromáticos como triptofano e tirosina no extrato de malte foi o fator responsável a este aumento na atividade enzimática. EGGERT et al. (1996) identificou um metabólito derivado de triptofano atuando como mediador nas reações de oxidação catalizadas pela lacase em fungos de degradação branca como *Pyconoporus cinnabarinus*. Assim como COLLINS et al. (1997) reportaram aumento na produção de enzimas ligninolíticas após adição de triptofano em culturas de *Trametes versicolor*, *Phanerochaete chrysosporium* e *Chrysosporium lignorum*, indicando que o triptofano provido pelo extrato de malte, pode ser responsável pela melhor produção das enzimas. Neste estudo as linhagens *G. terrestre* (LD), LH5 e F.1039 também apresentaram produção de LiP, lacase e MnP respectivamente, após o cultivo em meio contendo extrato de malte e extrato de levedura.

A linhagem *Phlebia radiata* apresentou aumento na produção de lacase após adição de bagaço de cana (1%) ao meio extrato de malte (AURORA & GILL, 2001). O bagaço de cana também mostrou ser o melhor substrato para produção de lacase por *Flavodor flavus* (RAGHUKUMAR et al., 1999). A linhagem *G. terrestre* (LD) foi capaz de produzir atividade de MnP em todos os dias de cultivo após crescimento em meio extrato de malte e levedura contendo bagaço de cana como substrato.

Avaliando-se o perfil das enzimas produzidas (Figuras 9-12), verificou-se que, de um modo geral, entre o meio nutriente e o meio extratos, as atividades enzimáticas, foram superiores quando as linhagens foram cultivadas em meio nutriente, independente da fonte de carbono.

4.2. Crescimento em bagaço de cana e serragem

4.2.1. Avaliação do crescimento anaeróbico e microaeróbico em bagaço de cana e serragem (1%) e produção das enzimas ligninolíticas e celulolíticas

Após o crescimento das linhagens H2, *G. terrestre* (LD), *F. oxysporum* (FUS), LH5, F.1039 e F.870 foi determinada a produção das enzimas ligninolíticas: lignina peroxidase (Figura 13A), manganês peroxidase (Figura 13B) e lacase (Figura 13C); e das enzimas celulolíticas: carboximetilcelulase (Figura 14A), avicelase (Figura 14B) e β -glicosidase (Figura 14C).

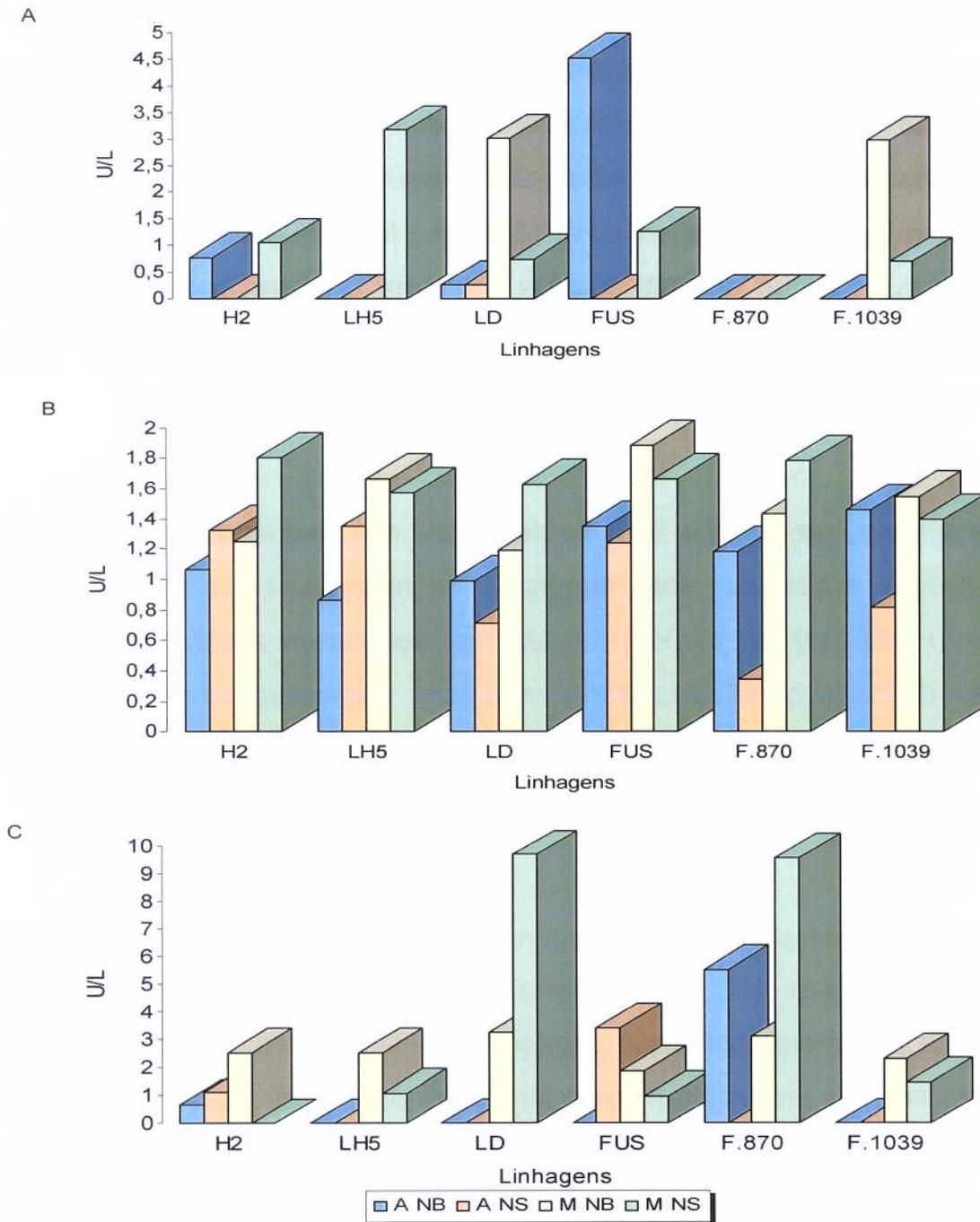
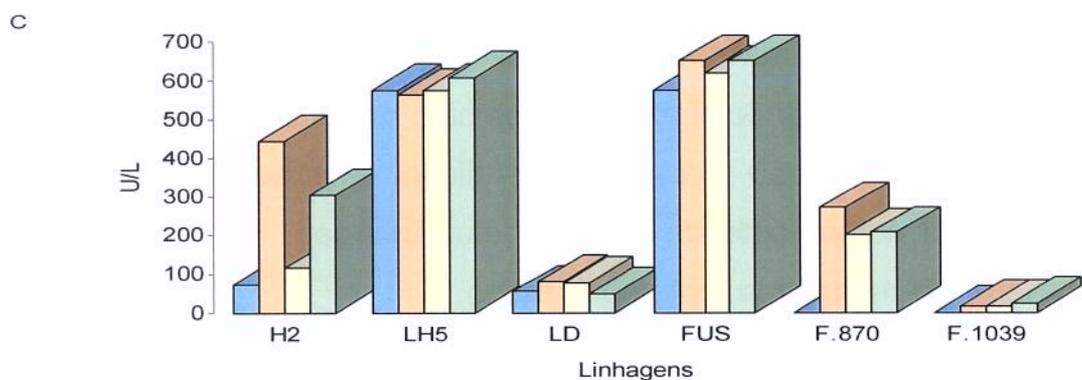
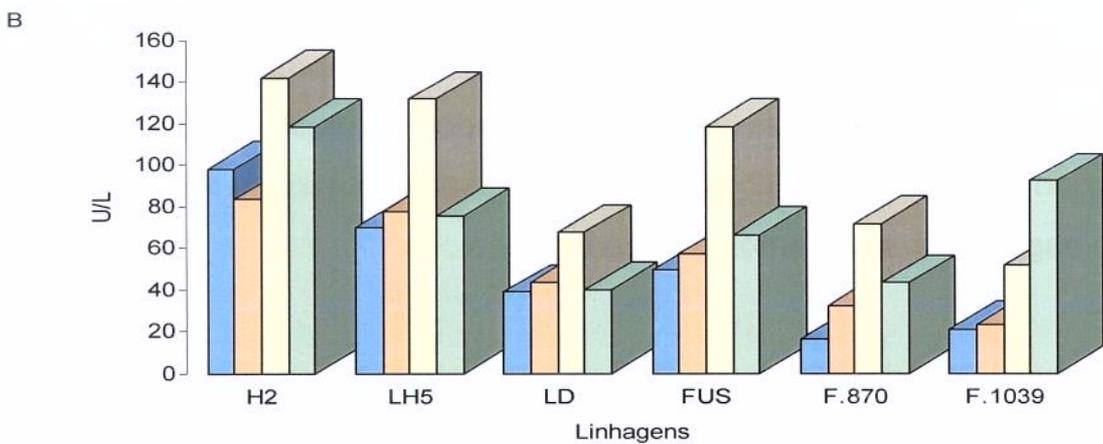
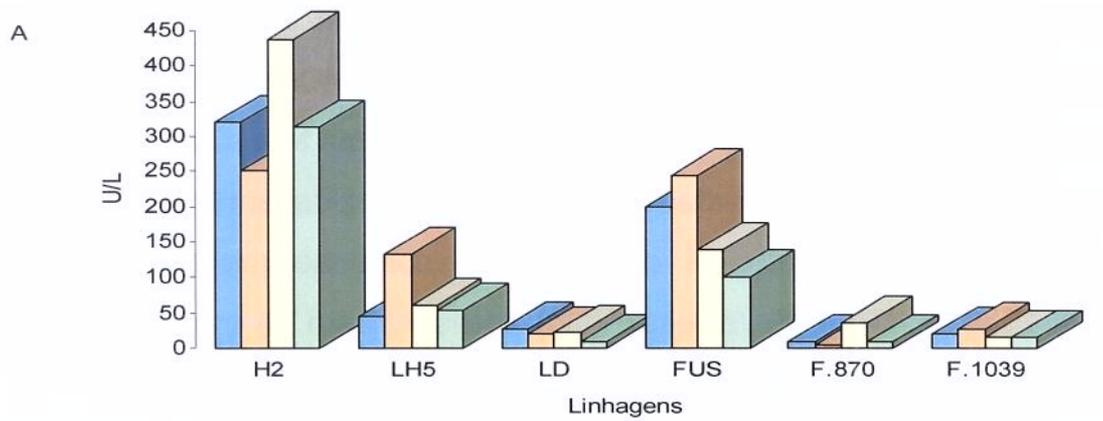


Figura 13. Atividades ligninolíticas das linhagens crescidas por 20 dias, sob condição anaeróbica em meio nutriente contendo bagaço de cana (ANB) ou serragem (ANS) e sob condição microaeróbica em meio nutriente contendo bagaço de cana (MNB) ou serragem (MNS). A – Lignina peroxidase, B – Lacase e C – Manganês peroxidase. Linhagens: basidiomiceto H2, deuteromicetos LH5, F.870 e F.1039, *G. terrestre* (LD) e *F. oxysporum* (FUS).

A atividade máxima de LiP (Figura 13A) foi obtida com o fungo *F. oxysporum* (FUS) (4,5 U/L) sob condição anaeróbica em meio contendo bagaço de cana como fonte de carbono. A maioria dos microrganismos apresentou atividade quando cultivados sob condição microaeróbica em meio contendo serragem, sendo que a linhagem LH5 (3,5 U/L) foi a que apresentou melhor atividade nesta condição de cultivo. Já a linhagem *G. terrestre* (LD) (3,4 U/L) apresentou atividade quando cultivada sob condição microaeróbica em meio contendo bagaço de cana como fonte de carbono.

A enzima lacase (Figura 13B) foi detectada nas seis linhagens estudadas nas condições avaliadas, sob condição microaeróbica as linhagens *F. oxysporum* (FUS) (1,9 U/L) e H2 (1,8 U/L) apresentaram atividades tanto em meio contendo bagaço de cana como serragem, respectivamente. Destaca-se também que a condição microaeróbica foi melhor para produção de lacase para todos os microrganismos quando comparado com a condição anaeróbica.

Como pode ser observado na Figura 13C todos os microrganismos, com exceção da linhagem H2, apresentaram atividade de MnP sob condição microaeróbica nos meios contendo bagaço de cana ou serragem, sendo que a atividade máxima foi produzida pelos microrganismos *G. terrestre* (LD) (10 U/L) e F.870 (9,8 U/L). Observou-se também que a linhagem F.870 produziu maior atividade de MnP em praticamente todas as condições de cultivo avaliadas neste período, quando comparado com as demais linhagens.



■ A NB ■ A NS ■ M NB ■ M NS

Figura 14. Atividades celulolíticas das linhagens crescidas por 20 dias, sob condição anaeróbica em meio nutriente contendo bagaço de cana (ANB) ou serragem (ANS) e sob condição microaeróbica em meio nutriente contendo bagaço de cana (MNB) ou serragem (MNS). A – Carboximetilcelulase, B – Avicelase e C – β -glicosidase. Linhagens: basidiomiceto H2, deuteromicetos LH5, F.870 e F.1039, *G. terrestre* (LD) e *F. oxysporum* (FUS).

Observando-se os valores apresentados na Figura 14A, verifica-se que todos os microrganismos apresentaram atividade de CMCase. A linhagem H2 apresentou as melhores atividades de CMCase em todas as condições estudadas, sendo a melhor atividade (450 U/L), produzida em meio contendo bagaço de cana como fonte de carbono sob condição microaeróbica. As linhagens F.1039, F.870 e *G. terrestre* (LD) apresentaram os menores valores da enzima CMCase nas condições de cultivo estudadas.

De uma maneira geral, todos os microrganismos apresentaram atividade de avicelase (Figura 14B), nas condições testadas. O pico máximo da enzima foi produzido pela linhagem H2 (150 U/L), sob condição microaeróbica em meio contendo bagaço de cana como fonte de carbono.

A Figura 14C mostra os resultados obtidos após determinação de β -glicosidase. Os microrganismos H2, LH5 e *F. oxysporum* (FUS) foram os que apresentaram as melhores atividades de β -glicosidase em todas as condições testadas. Os melhores resultados foram obtidos com as linhagens LH5 (600 U/L) e *F. oxysporum* (FUS) (650 U/L), sob condição microaeróbica, em meio contendo serragem como fonte de carbono e a linhagem H2 (450 U/L) sob condição anaeróbica na mesma fonte de carbono.

Comparando-se os resultados obtidos após crescimento das linhagens em meio contendo 1% de substrato sob diferentes condições de oxigenação (Figuras 13 e 14), foi possível observar que os melhores resultados foram obtidos com as linhagens H2, *G. terrestre* (LD), *F. oxysporum* (FUS) e LH5 sob condição microaeróbica. As linhagens LH5 e *F. oxysporum* (FUS) se destacaram por apresentarem as melhores atividades de β -glicosidase, a

levedura *G. terrestre* (LD) por apresentar bons resultados de atividades ligninolíticas e o basidiomiceto H2 por apresentar os melhores resultados de atividades celulolíticas. O período de cultivo foi outro fator considerado, em geral as melhores atividades foram obtidas entre 14 e 30 dias de cultivo. Após análise destes resultados selecionou-se o meio nutriente e os seguintes microrganismos: o basidiomiceto H2, a levedura *G. terrestre* (LD), *F. oxysporum* (FUS) e o deuteromiceto LH5.

4.2.2. Avaliação do crescimento microaeróbico em bagaço de cana e serragem (2%) e produção das enzimas ligninolíticas e celulolíticas

Com as quatro linhagens (H2, *G. terrestre* (LD), *F. oxysporum* (FUS) e LH5) previamente selecionadas foram determinadas as atividades enzimáticas celulolíticas e ligninolíticas após 20 dias de crescimento sob condição microaeróbica, em meio nutriente contendo serragem ou bagaço de cana como fontes de carbono, na concentração de 2%. Os resultados obtidos das atividades enzimáticas estão apresentados nas Figuras 15 e 16.

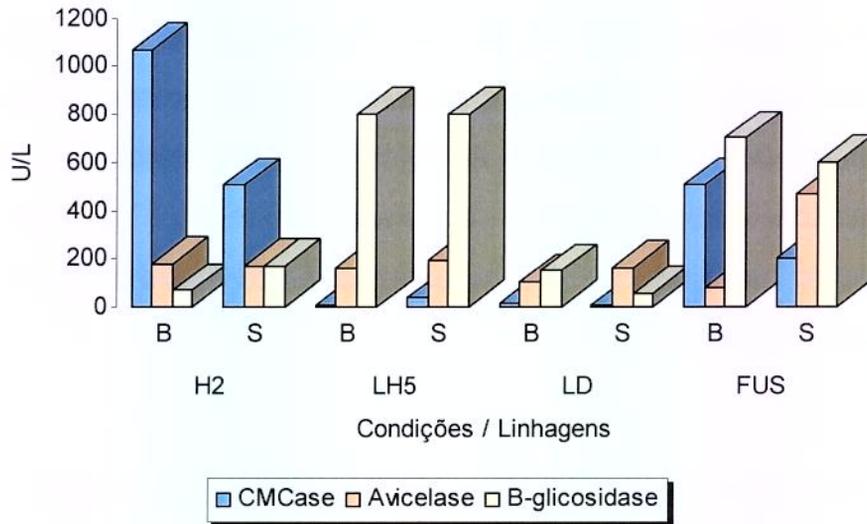


Figura 15. Atividades celulolíticas das linhagens crescidas por 20 dias, sob condição microaeróbica em meio nutriente contendo bagaço de cana (B) ou serragem (S). Carboximetilcelulase (CMCase), avicelase e β -glicosidase. Linhagens: basidiomiceto H2, deuteromiceto LH5, *G. terrestre* (LD) e *F. oxysporum* (FUS).

A Figura 15 mostra os resultados das enzimas celulolíticas produzidas pelas linhagens selecionadas. A máxima atividade de CMCase (1.000 U/L) foi produzida pela linhagem H2 em meio contendo bagaço de cana como fonte de carbono. A melhor atividade de avicelase (470 U/L) foi obtida com o fungo *F. oxysporum* (FUS) em meio contendo serragem como fonte de carbono. A linhagem LH5 apresentou máxima atividade de β -glicosidase (800 U/L) nos dois substratos utilizados.

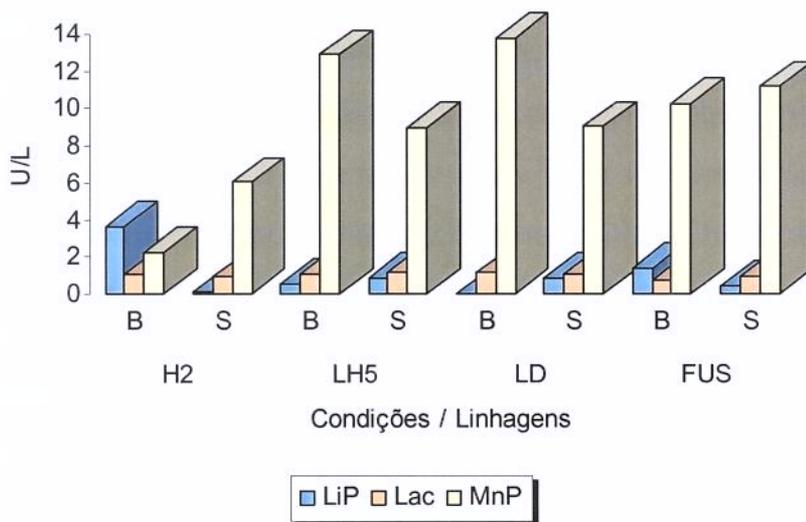


Figura 16. Atividades ligninolíticas das linhagens crescidas por 20 dias, sob condição microaeróbica em meio nutriente contendo bagaço de cana (B) ou serragem (S). Lignina peroxidase (LiP), lacase (Lac) e manganês peroxidase (MnP). Linhagens: basidiomiceto H2, deuteromiceto LH5, *G. terrestre* (LD) e *F. oxysporum* (FUS).

Na Figura pode-se observar que a maioria das linhagens apresentaram atividade das quatro enzimas ligninolíticas com 20 dias de crescimento em meio nutriente contendo serragem como fonte de carbono, sob condição microaeróbica. A melhor atividade de lignina-peroxidase foi obtida com o basidiomiceto linhagem H2 (3,7 U/L) em meio contendo bagaço de cana. Os microrganismos H2, LH5 e *G. terrestre* (LD) apresentaram atividade de lacase semelhante, quando cultivados tanto em meio contendo bagaço de cana como em serragem. O pico máximo de atividade de manganês-peroxidase (13,2 U/L) foi produzido pela levedura *G. terrestre* (LD), seguido pela linhagem LH5 (13 U/L), em meio contendo bagaço de cana.

Fungos anaeróbicos isolados de ruminantes, produzem alto nível de enzimas celulolíticas quando cultivados em diferentes substratos (WILLIAMS & ORPIN, 1987). TEUNISSEN et al. (1992) testaram a habilidade do microrganismo *Pyromices* linhagem E2 (fungo anaeróbico isolado do rúmen de animal não ruminante), de usar uma variedade de fontes de carbono em um meio líquido definido. O crescimento ocorreu em bagaço de cana, papel de filtro, celulose, frutose, lactose, glicose, manose, amido solúvel e palha de trigo. As atividades das enzimas celulolíticas foram maiores em culturas cultivadas em frutose, papel de filtro, lactose e amido. O microrganismo *Pyromices* linhagem E2 foi capaz de produzir atividade de avicelase (39 U/mL), β -glicosidase (77 U/mL) e CMCase (1,88 U/mL) após crescimento em meio contendo como fonte de carbono lactose, frutose e manose, respectivamente. Em meio contendo papel de filtro a linhagem também produziu atividade de avicelase (23 U/mL), β -glicosidase (64 U/mL) e CMCase (1,33 U/mL), mas em menor produção (TEUNISSEN et al., 1992).

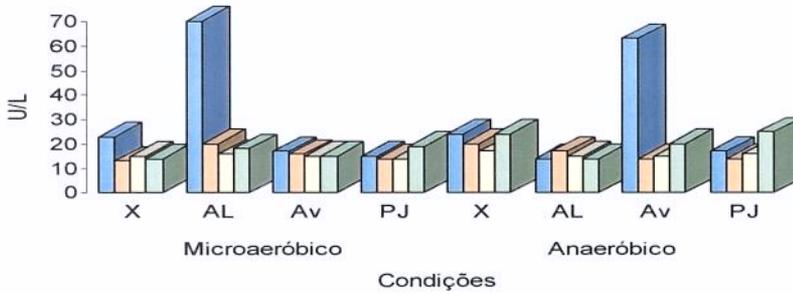
Analisando-se os resultados obtidos após crescimento das linhagens sob condição microaeróbica nas diferentes concentrações de substratos (1% e 2%) foi possível observar que as linhagens apresentaram maior produção das enzimas, principalmente as celulolíticas, após cultivo em meio contendo 2% de substrato.

4.3. Avaliação do crescimento microaeróbico e anaeróbico e produção das enzimas celulolíticas e ligninolíticas em diferentes fontes de carbono

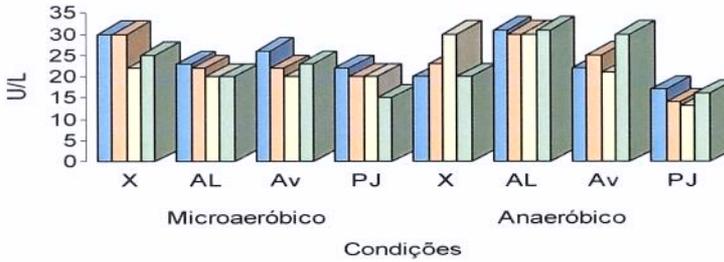
As linhagens H2, *G. terrestre* (LD), *F. oxysporum* (FUS) e LH5, foram cultivadas em meio nutriente contendo diferentes fontes de carbono na

concentração final de 1%: xilana, Avicel, ácido lignossulfônico ou papel jornal, por 20 dias, sob condição microaeróbica e anaeróbica. As atividades enzimáticas produzidas estão apresentadas nas Figuras 17 e 18.

A



B



C

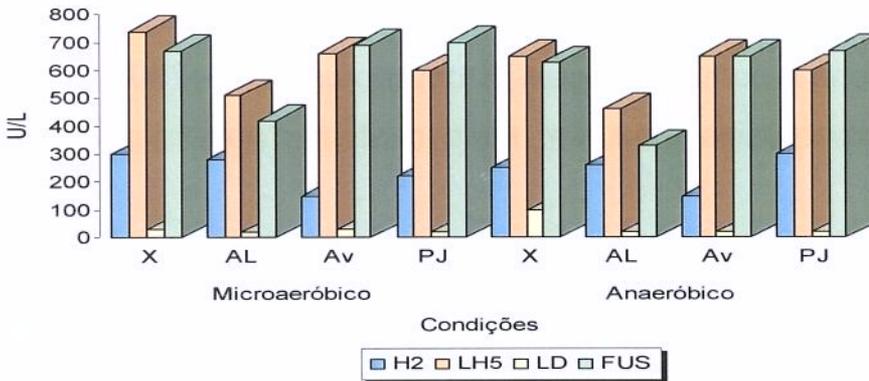


Figura 17. Atividades celulolíticas das linhagens crescidas por 20 dias, sob condição microaeróbica e anaeróbica em meio nutriente contendo xilana (X), ác. lignossulfônico (AL), avicel (Av) ou papel jornal (PJ). A – carboximetilcelulase, B – avicelase e C – β -glicosidase. Linhagens: basidiomiceto H2, deuteromiceto LH5, *G. terrestre* (LD) e *F. oxysporum* (FUS).

Observando-se os valores apresentados na Figura 17A, verifica-se que todas as linhagens apresentaram atividade de CMCase. De uma forma geral o basidiomiceto H2 apresentou as melhores atividades de CMCase, após crescimento em meio contendo ácido lignosulfônico sob condição microaeróbica e em meio contendo avicel como fonte de carbono sob condição anaeróbica, sendo a melhor atividade (70 U/L), produzida condição microaeróbica em meio contendo ácido lignosulfônico como fonte de carbono.

Todas as linhagens estudadas apresentaram atividade de avicelase (Figura 17B), nas condições testadas. As maiores atividades foram produzidas pelas linhagens H2 (31 U/L) e *F. oxysporum* (FUS) (31 U/L), ambos sob condição anaeróbica, em meio contendo ácido lignosulfônico.

Os microrganismos LH5 e *F. oxysporum* (FUS) foram os que apresentaram as melhores atividades de β -glicosidase (Figura 17C), em todas as condições testadas. Os melhores resultados foram obtidos com a linhagem LH5 (750 U/L) sob condição microaeróbica, em meio contendo xilana como fonte de carbono e com a linhagem *F. oxysporum* (FUS) (700 U/L), também sob condição microaeróbica, mas em meio contendo papel jornal como fonte de carbono.

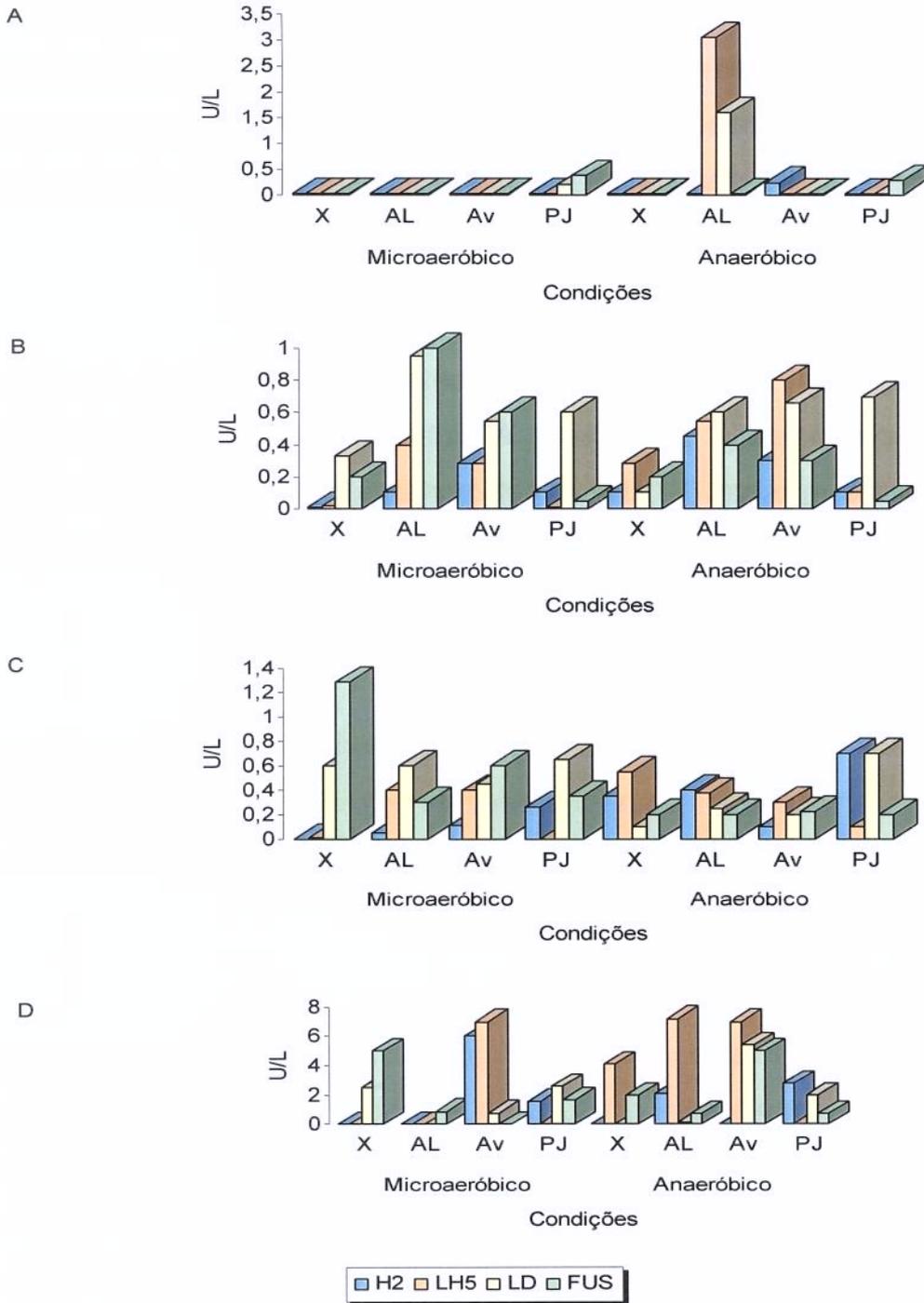


Figura 18. Atividades ligninolíticas das linhagens crescidas por 20 dias, sob condição microaeróbica e anaeróbica em meio nutriente contendo xilana (X), ác. lignossulfônico (AL), avicel (Av) ou papel jornal (PJ). A – lignina peroxidase, B – lacase, C – peroxidase e D - manganês peroxidase. Linhagens: basidiomiceto H2, deuteromiceto LH5, *G. terrestre* (LD) e *F. oxysporum* (FUS).

Conforme a Figura 18A, a atividade máxima de LiP foi obtida com a linhagem LH5 (3 U/L), seguida da levedura *G. terrestre* (1,8 U/L) sob condição anaeróbica em meio contendo ácido lignosulfônico como fonte de carbono, com 20 dias de crescimento. As demais linhagens produziram atividades mais baixas de LiP em todas as condições avaliadas.

A enzima lacase (Figura 18B), foi produzida pelas quatro linhagens estudadas nas condições propostas. A linhagem *F. oxysporum* (FUS) apresentou atividade máxima (1,0 U/L) sob condição microaeróbica em meio contendo ácido lignosulfônico como fonte de carbono, seguido pela linhagem *G. terrestre* (LD) nesta mesma condição de cultivo (0,9 U/L).

A maioria das linhagens apresentaram a atividade de peroxidase (Figura 18C), sendo que a atividade máxima foi produzida pelo *F. oxysporum* (FUS) (1,3 U/L) sob condição microaeróbica em meio contendo xilana como fonte de carbono.

Os resultados de atividade de MnP (Figura 18D) foram melhores quando comparados com as demais atividades, tanto sob condição anaeróbica quanto microaeróbica, nos diferentes substratos testados. A atividade máxima foi produzida pela linhagem LH5 (7,2 U/L) sob condição anaeróbica em meio contendo ácido lignosulfônico como fonte de carbono. A linhagem LH5, de uma forma geral, foi a que apresentou maiores atividades de MnP, sob condição anaeróbica, nos meios contendo xilana, ac. lignosulfônico e avicel como fontes de carbono, e sob condição microaeróbica, em meio contendo avicel.

Avaliando-se os resultados obtidos após crescimento dos fungos nas quatro diferentes fontes de carbono (avicel, ácido lignosulfônico, papel jornal e xilana), observou-se que as linhagens apresentaram atividades enzimáticas mais baixas quando comparadas com as outras fontes de carbono utilizadas (bagaço de cana ou serragem), nas duas condições de oxigenação.

De acordo com os resultados apresentados na Figura 18 observou-se que em meio contendo ácido lignosulfônico (1%) como fonte de carbono a linhagem LH5 foi capaz de produzir LiP (3 U/L) e MnP (7,2 U/L), enquanto que a linhagem *G. terrestre* (LD) apresentou atividade de lacase (0,9 U/L), os valores obtidos neste trabalho são semelhantes aos apresentados por FALCONI (1998) e SETTE (1997). FALCONI (1998) verificou a produção de 2,5 U/L de LiP, 4,8 U/L de MnP, e 1 U/L de lacase por fungos ligninolíticos cultivados em ácido lignosulfônico (0,01%) por 3 a 10 dias sob condição estacionária aeróbica. SETTE (1997) relatou atividade máxima de lacase (0,5 U/L) por fungos crescidos em ácido lignosulfônico 0,5% sob condição microaeróbica em 20 e 35 dias de cultivo.

4.4. Crescimento em meio contendo papel jornal como fonte de carbono

4.4.1. Análise visual do crescimento das linhagens em papel jornal e papel refugo sob condição aeróbica

Análise visual do crescimento das linhagens H2, *G. terrestre* (LD), *T. canadense* (Q10), *F. oxysporum* (FUS) e LH5 em meio contendo como fonte de carbono papel jornal ou papel refugo na concentração final de 1%, sob condição aeróbica por um período de 30 dias. O crescimento das linhagens nas diferentes

fontes de carbono está apresentado na Tabela 7. Com 15 dias de cultivo as linhagens H2 e *F. oxysporum* (FUS) apresentaram formação de peletes na superfície (++) quando crescidas em meio contendo papel jornal. De acordo com os resultados obtidos foi possível observar que os microrganismos utilizaram o papel jornal mais rapidamente que o papel refugo.

Tabela 7. Crescimento das linhagens em meio contendo papel jornal e papel refugo (1%) com 30 dias de cultivo.

LINHAGENS	PAPEL JORNAL	PAPEL REFUGO
H2	+++	++
LD	++	-
FUS	+++	+
Q10	++	+
LH5	+	-

(-) ausência de crescimento, (+) pouco crescimento, (++) moderado crescimento, (+++) ótimo crescimento (adaptado da ASTM Standard Methods G21-90, 1990 e de DURRANT et al., 1995).

4.4.2. Avaliação das atividades celulolíticas e ligninolíticas após crescimento dos fungos em papel jornal sob condição microaeróbica

As linhagens H2, LH5, *G. terrestre* (LD), *F. oxysporum* (FUS) e *T. canadense* (Q10) foram cultivadas em um meio nutriente contendo papel jornal (2%) como fonte de carbono, por um período de 20, 30 e 40 dias (Figura 19).

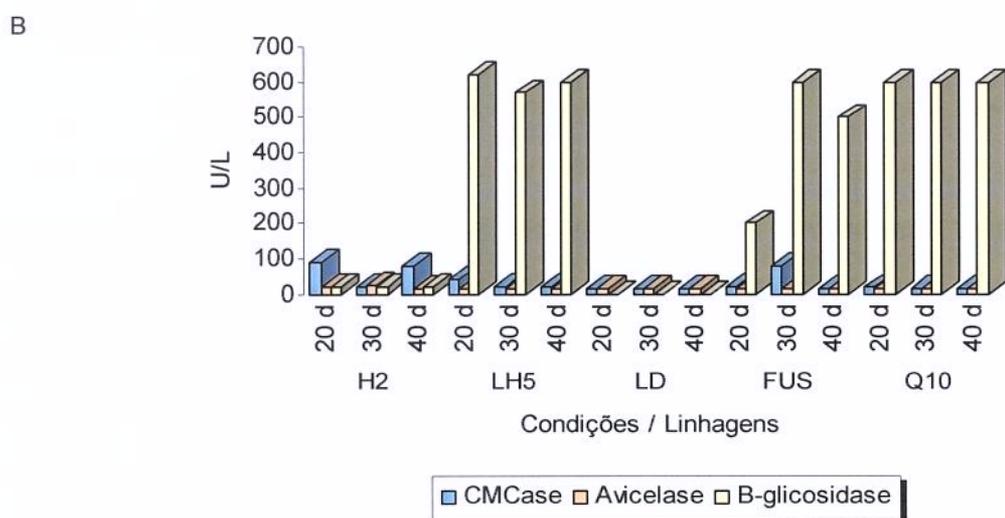
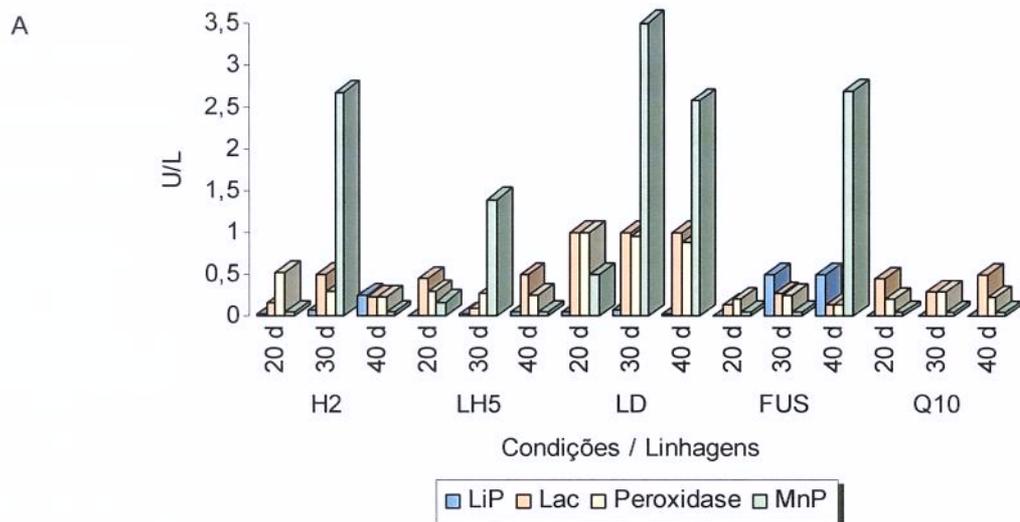


Figura 19. Atividades enzimáticas das linhagens crescidas por 20, 30 e 40 dias (20d, 30d e 40d), sob condição microaeróbica em meio nutriente contendo papel jornal. (A) – lignina peroxidase (LiP), lacase (Lac), peroxidase e manganês peroxidase (MnP) e (B) – carboximetilcelulase (CMCase), avicelase e β -glicosidase. Linhagens: basidiomiceto H2, deutericeto LH5, *G. terrestre* (LD), *F. oxysporum* (FUS) e *T. canadense* (Q10).

Quando crescida em meio contendo papel jornal como fonte de carbono, pode-se verificar que a linhagem H2 apresentou um valor máximo de MnP (2,6 U/L) com 30 dias de crescimento (Figura 19A). Também apresentou bons resultados de CMCase (Figura 19B) tanto com 20 dias de cultivo (90 U/L) quanto com 40 dias (80 U/L).

A linhagem LH5 apresentou atividade de peroxidase nos diferentes dias de cultivo. O valor máximo de MnP (1,4 U/L) foi produzido com 30 dias de cultivo (Figura 19A). Com relação as atividades celulolíticas (Figura 17B), observou-se maior atividade de β -glicosidase, nos diferentes dias de cultivo, sendo a produção máxima com 20 dias de cultivo (610 U/L).

A linhagem *G. terrestre* (LD) produziu atividade de lacase e de peroxidase próximo a 1,0 U/L, nos diferentes dias de cultivo, porém a linhagem apresentou produção de MnP (3,5 U/L), com 30 dias de crescimento (Figura 19A). Com relação às atividades de CMCase e avicelase (Figura 19B) esta linhagem produziu atividades semelhantes nos diferentes dias de cultivo, com produção de aproximadamente 15 U/L. Não foi detectada atividade de β -glicosidase nas condições de cultivo utilizadas.

O fungo *F. oxysporum* (FUS) apresentou atividade de LiP semelhante entre 30 e 40 dias de crescimento (0,5 U/L). O valor máximo de atividade de MnP (Figura 19A), foi produzido com 40 dias de cultivo (2,7 U/L). A linhagem apresentou atividade de β -glicosidase (Figura 19B), com 30 dias de cultivo (600 U/L).

Na Figura 19A, pode-se verificar que a linhagem *T. canadense* (Q10) apresentou atividade de lacase em todos os dias de crescimento, sendo que o pico máximo (0,5 U/L) foi produzido com 40 dias de cultivo. Na Figura 19B, verificou-se que esta linhagem apresentou atividade de β -glicosidase (600 U/L) nos três dias de cultivo.

Após análise dos resultados, verificou-se que as linhagens apresentaram atividades enzimáticas ligninolíticas e celulolíticas. Praticamente todas as linhagens apresentaram atividade de MnP. A melhor atividade de lacase e peroxidase foi produzida pela linhagem *G. terrestre* (LD). Com relação as atividades celulolíticas, a linhagem H2 foi a que apresentou a melhor atividade de CMCase e avicelase, enquanto que as linhagens LH5, *T. canadense* (Q10) e *F. oxysporum* (FUS) foram as que apresentaram as melhores atividades de β -glicosidase. Os resultados obtidos neste trabalho sugerem que estes fungos são capazes de produzir as diferentes enzimas pertencentes ao sistema lignocelulolítico, conforme relatado por BHAT, 2000.

WYK (1999) estudou a sacarificação enzimática da celulose presente em papel de filtro, papel jornal e papel almaço, incubando estes materiais celulósicos com celulase de *Penicillium funiculosum* e *Trichoderma reesei*. A maior produção de glicose foi obtida após sacarificação de papel almaço com celulase de *P. funiculosum* seguido por papel de filtro e por último papel jornal. De acordo com WYK (1999) a presença de tinta no papel jornal pode ser um dos motivos pelo qual os microrganismos apresentam pequena produção enzimática.

4.5. Avaliação da composição das frações fibras após crescimento das linhagens em meio contendo bagaço de cana, serragem e papel jornal

Conforme a metodologia descrita (item 3.6.10), foram determinadas as porcentagens de celulose e lignina, presentes nas amostras tratadas e nas amostras controle (sem inóculo). Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 8.

Tabela 8. Porcentagem de celulose e lignina presentes no bagaço de cana, serragem e papel jornal, após crescimento das linhagens H2, *T. canadense* (Q10), *F. oxysporum* (FUS), LH5 e *G. terrestre* (LD) e nas amostras controle (CT), cultivadas sob condição microaeróbica.

	SERRAGEM		BAGAÇO DE CANA		PAPEL JORNAL	
	%Celulose	%Lignina	%Celulose	%Lignina	%Celulose	%Lignina
CT	9	4	5	4	9	6
H2	6	2	1	1	4	5
Q10	6	2	1	1	8	5
FUS	1	3	2	1	3	5
LH5	2	3	1	1	8	2
LD	5	3	1	1	2	5

De acordo com a Tabela 8 pode-se verificar que a linhagem *F. oxysporum* (FUS) foi a que apresentou maior % de degradação de celulose em meio contendo serragem como fonte de carbono (8%), indicando a ação do sistema enzimático celulolítico da linhagem, pois a mesma foi capaz de produzir as

enzimas CMCase, avicelase e β -glicosidase nesta fonte de carbono (Figura 15). O basidiomiceto H2 foi capaz de produzir a enzima MnP (Figura 16) em meio contendo serragem e apresentou a maior % de degradação de lignina nesta fonte de carbono (2%), o mesmo valor foi obtido com o fungo *T. canadense* (Q10). Todas as linhagens com exceção do *F. oxysporum* (FUS) apresentaram 4% de degradação de celulose em bagaço de cana. Nesta fonte de carbono as linhagens H2 e LH5 apresentaram maior atividade de CMCase e β -glicosidase, respectivamente (Figura 15). Todas as linhagens apresentaram 3% de degradação de lignina em meio contendo bagaço de cana como fonte de carbono, sendo que o sistema ligninolítico foi verificado nas linhagens H2, LD e LH5 as quais apresentaram maior atividade de LiP, lacase e MnP, respectivamente (Figura 16). A linhagem *G. terrestre* (LD) apresentou 7% de degradação de celulose em meio contendo papel jornal como fonte de carbono. A linhagem *F. oxysporum* (FUS) apresentou 6% de degradação de celulose e máximo de atividade de β -glicosidase (Figura 19B) indicando a ação do sistema enzimático celulolítico. A linhagem LH5 foi a que apresentou maior % de degradação (4%) de lignina quando cultivada em meio contendo papel jornal, porém apresentou menores atividades ligninolíticas nesta mesma fonte de carbono. A linhagem *G. terrestre* (LD) apresentou os melhores resultados de enzimas ligninolíticas (Figura 19A) mesmo com baixa % de degradação de lignina nesta fonte de carbono.

4.6. Crescimento variando as condições de oxigenação e determinação das atividades enzimáticas celulolíticas e ligninolíticas em reações e em gel (zimograma) e produção de biomassa fúngica.

As linhagens H2, LH5, *G. terrestre* (LD), *F. oxysporum* (FUS) e *T. canadense* (Q10), foram cultivadas em um meio nutriente contendo serragem,

bagaço de cana ou papel jornal como fonte de carbono, nas concentrações de 4% e 10%, sob diferentes condições de oxigenação, os resultados estão apresentados nas Figuras 20 - 26.

4.6.1. Atividade de carboximetilcelulase

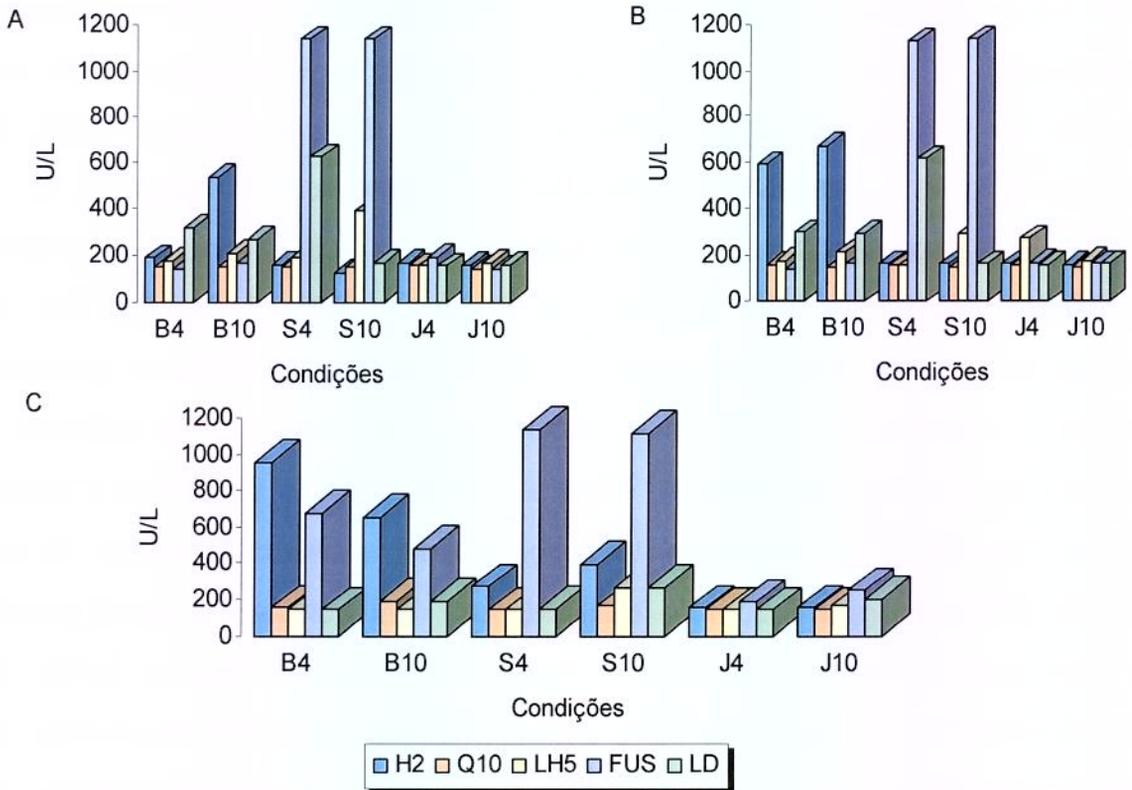


Figura 20: Atividade de carboximetilcelulase das linhagens crescidas sob diferentes condições de oxigenação: A (14 dias agitação e 7 dias microaeróbico), B (7 dias agitação e 21 dias microaeróbico) e C (7 dias agitação e 14 dias microaeróbico) em meio nutriente contendo bagaço de cana, serragem ou papel jornal nas concentrações de 4% (B4, S4 e J4) e 10% (B10, S10 e J10). Linhagens: basidiomiceto H2, *T. canadense* (Q10), deuteromiceto LH5, *F. oxysporum* (FUS) e *G. terrestre* (LD).

A Figura 20 mostra que a maioria das linhagens apresentaram atividade de carboximetilcelulase, destacando-se a linhagem *F. oxysporum* (FUS) (1.100 U/L), em meio contendo serragem nas concentrações de 4% e 10% e nas três diferentes condições de oxigenação testadas. Seguida da linhagem H2 (900 U/L) na condição de 7 dias agitação e 14 dias microaeróbico, em meio contendo bagaço de cana na concentração de 4%.

4.6.1.1. Atividade de carboximetilcelulase em gel

As linhagens que apresentaram os melhores resultados da atividade de carboximetilcelulase, apresentados na Figura 20 foram escolhidas para a realização do zimograma desta enzima (Tabela 9). Para este teste foi utilizada amostra nativa (conforme item 3.12).

Tabela 9: Amostras utilizadas no zimograma da enzima carboximetilcelulase

Linhagem	Fonte de Carbono	Condição de Oxigenação
<i>F. oxysporum</i> (FUS)	Serragem 4%	14 dias agitação e 7 dias microaeróbico
<i>F. oxysporum</i> (FUS)	Serragem 4%	14 dias agitação e 7 dias microaeróbico
<i>F. oxysporum</i> (FUS)	Serragem 4%	7 dias agitação e 21 dias microaeróbico
<i>F. oxysporum</i> (FUS)	Serragem 10%	7 dias agitação e 21 dias microaeróbico
H2	Bagaço de cana 4%	7 dias agitação e 21 dias microaeróbico
H2	Bagaço de cana 10%	7 dias agitação e 21 dias microaeróbico
<i>F. oxysporum</i> (FUS)	Serragem 4%	7 dias agitação e 14 dias microaeróbico
<i>F. oxysporum</i> (FUS)	Serragem 10%	7 dias agitação e 14 dias microaeróbico
H2	Bagaço de cana 4%	7 dias agitação e 14 dias microaeróbico
H2	Bagaço de cana 10%	7 dias agitação e 14 dias microaeróbico

Visualizando-se os géis foi possível verificar o aparecimento de zonas de clareamento indicando presença da enzima carboximetilcelulase nas seguintes condições: linhagem *F. oxysporum* (FUS) contendo serragem (4%) com 14 dias agitação e 7 dias microaeróbico, serragem (10%) com 7 dias agitação e 21 dias microaeróbico, e com 7 dias agitação e 14 dias microaeróbico. A linhagem H2 apresentou esta enzima quando cultivada em meio contendo bagaço de cana (4% e 10%) com 7 dias agitação e 14 dias microaeróbico.

4.6.2. Atividade de avicelase

Os resultados de atividade de avicelase estão demonstrados na Figura 21. A linhagem *G. terrestre* (LD) apresentou atividade desta enzima em meio contendo serragem (10%), na condição A e em meio contendo bagaço de cana (10%) nas condições A e B, sendo os melhores resultados (360 U/L) em meio contendo bagaço de cana na concentração de 4%, com 14 dias agitação e 7 dias microaeróbico (Figura 21A), e 7 dias agitação e 21 dias microaeróbico (Figura 21B). A linhagem *F. oxysporum* (FUS) (340 U/L), apresentou atividade com 14 dias agitação e 7 dias microaeróbico, em meio contendo serragem como fonte de carbono na concentração de 10%.

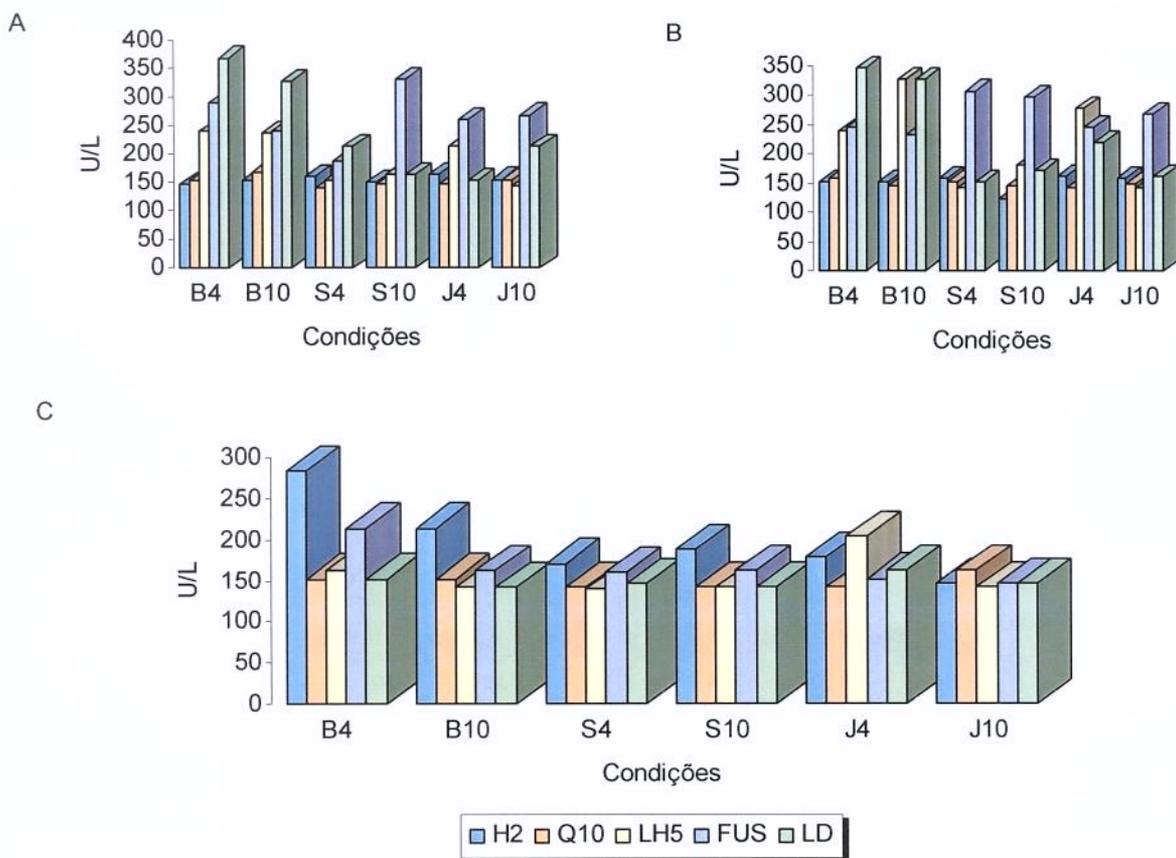


Figura 21: Atividade de avicelase das linhagens crescidas sob diferentes condições de oxigenação: A (14 dias agitação e 7 dias microaeróbico), B (7 dias agitação e 21 dias microaeróbico) e C (7 dias agitação e 14 dias microaeróbico) em meio nutriente contendo bagaço de cana, serragem ou papel jornal nas concentrações de 4% (B4, S4 e J4) e 10% (B10, S10 e J10). Linhagens: basidiomiceto H2, *T. canadense* (Q10), deuteromiceto LH5, *F. oxysporum* (FUS) e *G. terrestre* (LD).

4.6.3. Atividade de β -glicosidase

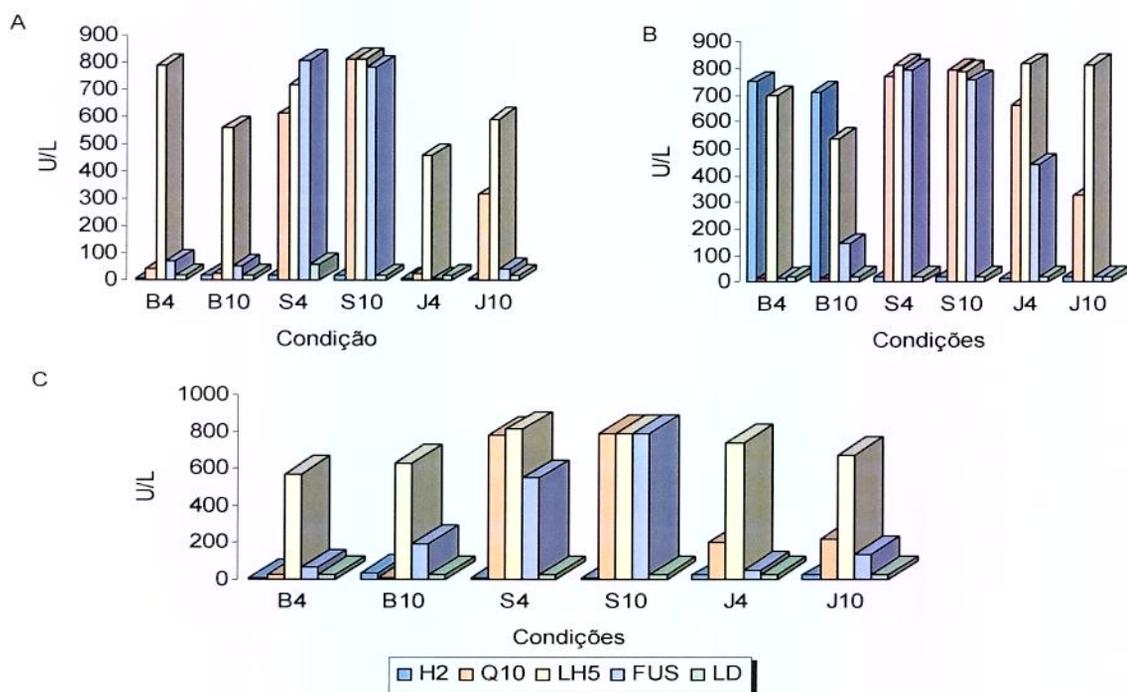


Figura 22: Atividade de β -glicosidase nas linhagens crescidas sob diferentes condições de oxigenação: A (14 dias agitação e 7 dias microaeróbico), B (7 dias agitação e 21 dias microaeróbico) e C (7 dias agitação e 14 dias microaeróbico) em meio nutriente contendo bagaço de cana, serragem ou papel jornal nas concentrações de 4% (B4, S4 e J4) e 10% (B10, S10 e J10). Linhagens: basidiomiceto H2, *T. canadense* (Q10), deuteromiceto LH5, *F. oxysporum* (FUS) e *G. terrestre* (LD).

A atividade de β -glicosidase pode ser observada na Figura 22, onde a linhagem LH5 (800 U/L) foi a que apresentou melhor resultado, tanto cultivada em papel jornal quanto em serragem na concentração de 4% com 7 dias agitação e 21 dias microaeróbico (Figura 22B), seguida da linhagem *F. oxysporum* (FUS) (790 U/L) em meio contendo serragem (4%) como fonte de carbono com 14 dias agitação e 7 dias microaeróbico (Figura 22A). As linhagens *T. canadense* (Q10) e *F. oxysporum* (FUS) (810 U/L) foram as que apresentaram melhores resultados quando cultivadas em meio contendo

serragem como fonte de carbono na concentração de 10% na condição A. Observou-se também que a linhagem *G. terrestre* (LD) apresentou pequena produção da enzima β -glicosidase em todas as condições testadas quando comparada com as demais linhagens.

4.6.3.1. Atividade de β -glicosidase em gel

As linhagens que apresentaram os melhores resultados da atividade enzimática de β -glicosidase, apresentados na Figura 22 foram escolhidas para a realização do zimograma desta enzima (Tabela 10). Para este teste foi utilizada amostra nativa, desnaturada com tratamento térmico e desnaturada sem tratamento térmico (conforme item 3.12).

Tabela 10: Amostras utilizadas no zimograma da enzima β -glicosidase

Linhagem	Fonte de Carbono	Condição de Oxigenação
<i>F. oxysporum</i> (FUS)	Serragem 4%	14 dias agitação e 7 dias microaeróbico
<i>T. canadense</i> (Q10)	Serragem 10%	14 dias agitação e 7 dias microaeróbico
LH5	Serragem 10%	14 dias agitação e 7 dias microaeróbico
LH5	Serragem 4%	7 dias agitação e 21 dias microaeróbico
<i>F. oxysporum</i> (FUS)	Serragem 4%	7 dias agitação e 21 dias microaeróbico
<i>T. canadense</i> (Q10)	Serragem 10%	7 dias agitação e 21 dias microaeróbico
LH5	Serragem 10%	7 dias agitação e 21 dias microaeróbico
<i>T. canadense</i> (Q10)	Serragem 4%	7 dias agitação e 14 dias microaeróbico
LH5	Serragem 4%	7 dias agitação e 14 dias microaeróbico
<i>T. canadense</i> (Q10)	Serragem 4%	7 dias agitação e 14 dias microaeróbico

Visualizando-se os géis foi possível verificar o aparecimento de banda amarela indicando presença desta enzima. Os melhores resultados foram obtidos com a linhagem LH5 em meio contendo serragem (4%) com 7 dias agitação e 21 dias microaeróbico, e 7 dias agitação e 14 dias microaeróbico e em meio contendo serragem (10%) com 14 dias agitação e 7 dias microaeróbico, amostra nativa, desnaturação com tratamento térmico e sem tratamento térmico. A linhagem *F. oxysporum* (FUS) apresentou esta enzima quando cultivada em meio contendo serragem (4%) com 14 dias agitação e 7 dias microaeróbico, amostra nativa.

4.6.4. Atividade de lignina peroxidase

Na Figura 23 está apresentada a atividade de LiP, onde pode-se observar que poucas linhagens produziram esta enzima. A atividade máxima de LiP foi obtida com a linhagem LH5 (27 U/L) em meio contendo papel jornal como fonte de carbono na concentração de 4%, sob a condição combinada de oxigenação (14 dias agitação e 7 dias microaeróbico), seguida da *G. terrestre* (LD) (16 U/L) em meio contendo bagaço de cana (10%) como fonte de carbono após 14 dias agitação e 7 dias microaeróbico (Figura 23A).

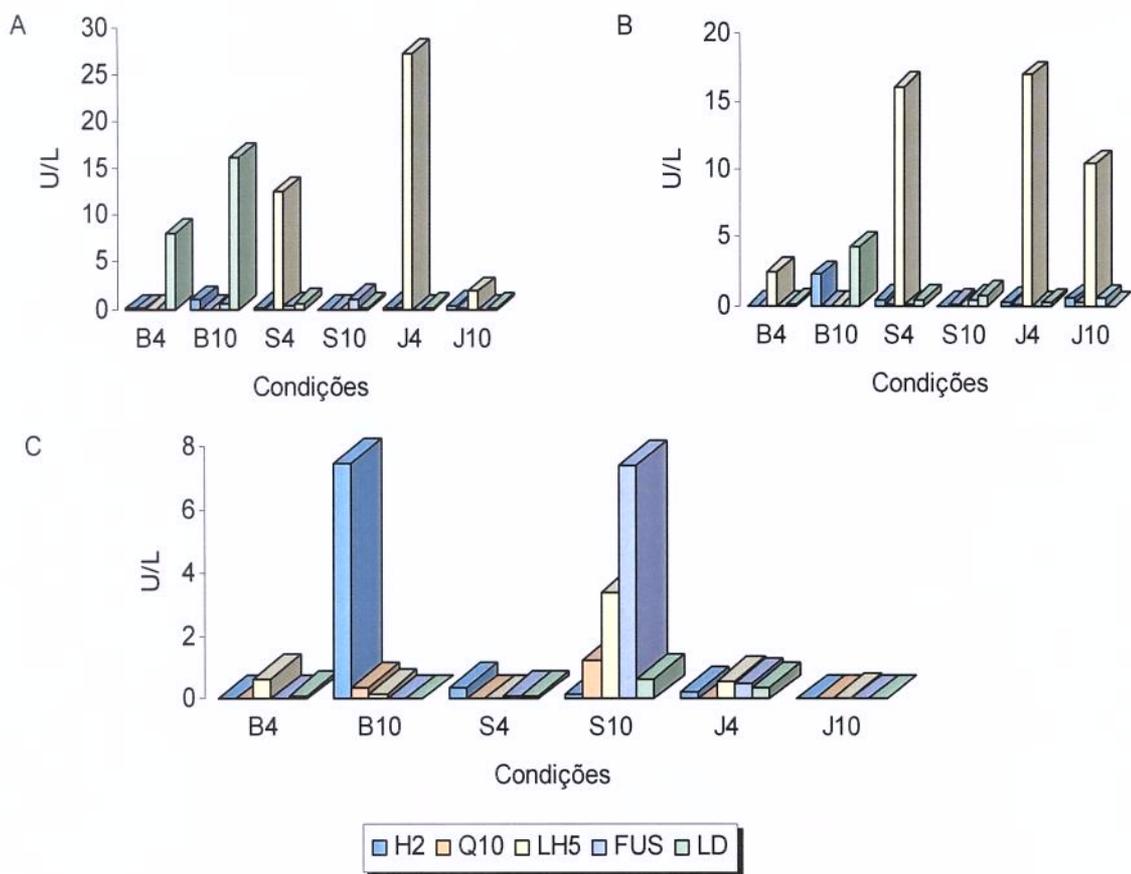


Figura 23: Atividade de lignina peroxidase das linhagens crescidas sob diferentes condições de oxigenação: A (14 dias agitação e 7 dias microaeróbico), B (7 dias agitação e 21 dias microaeróbico) e C (7 dias agitação e 14 dias microaeróbico) em meio nutriente contendo bagaço de cana, serragem ou papel jornal nas concentrações de 4% (B4, S4 e J4) e 10% (B10, S10 e J10). Linhagens: basidiomiceto H2, *T. canadense* (Q10), deuteromiceto LH5, *F. oxysporum* (FUS) e *G. terrestre* (LD).

4.6.5. Atividade de manganês peroxidase

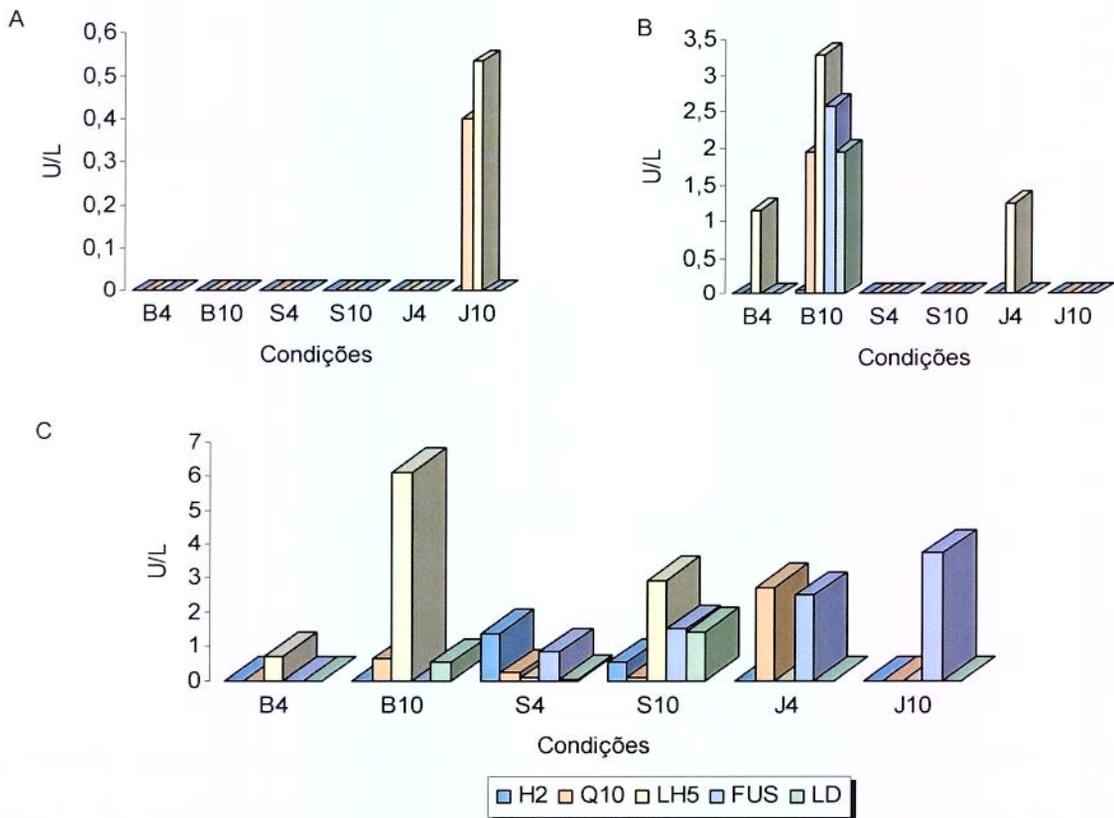


Figura 24: Atividade de manganês peroxidase das linhagens crescidas sob diferentes condições de oxigenação: A (14 dias agitação e 7 dias microaeróbico), B (7 dias agitação e 21 dias microaeróbico) e C (7 dias agitação e 14 dias microaeróbico) em meio nutriente contendo bagaço de cana, serragem ou papel jornal nas concentrações de 4% (B4, S4 e J4) e 10% (B10, S10 e J10). Linhagens: basidiomiceto H2, *T. canadense* (Q10), deuteromiceto LH5, *F. oxysporum* (FUS) e *G. terrestre* (LD).

A atividade de MnP está apresentada na Figura 24. Na condição 14 dias agitação e 7 dias microaeróbico somente as linhagens LH5 e *T. canadense* (Q10) apresentaram atividade de MnP (Figura 24A). A linhagem LH5 (6 U/L) foi a que apresentou máximo de atividade com 7 dias agitação e 14 dias microaeróbico, em meio contendo bagaço de cana na concentração 10% (Figura

24C). Nesta mesma condição de oxigenação as linhagens *T. canadense* (Q10) (2,7 U/L) e *F. oxysporum* (FUS) (2,5 U/L) apresentaram atividade de MnP quando cultivadas em meio contendo papel jornal na concentração 4%.

4.6.5.1. Atividade de manganês peroxidase em gel

As linhagens que apresentaram os melhores resultados da atividade de manganês peroxidase, apresentados na Figura 24 foram escolhidas para a realização do zimograma desta enzima desta enzima (Tabela 10). Para este teste foi utilizada amostra nativa e desnaturada com tratamento térmico (conforme item 3.12).

Tabela 10: Amostras utilizadas no zimograma da enzima manganês peroxidase

Linhagem	Fonte de Carbono	Condição de Oxigenação
LH5	Papel jornal 10%	14 dias agitação e 7 dias microaeróbico
<i>T. canadense</i> (Q10)	Bagaço de cana 10%	7 dias agitação e 21 dias microaeróbico
<i>F. oxysporum</i> (FUS)	Bagaço de cana 10%	7 dias agitação e 21 dias microaeróbico
<i>G. terrestre</i> (LD)	Bagaço de cana 10%	7 dias agitação e 21 dias microaeróbico
LH5	Bagaço de cana 10%	7 dias agitação e 21 dias microaeróbico
LH5	Bagaço de cana 4%	7 dias agitação e 21 dias microaeróbico
H2	Serragem 4%	7 dias agitação e 14 dias microaeróbico
<i>F. oxysporum</i> (FUS)	Papel jornal 10%	7 dias agitação e 14 dias microaeróbico
<i>G. terrestre</i> (LD)	Papel jornal 4%	7 dias agitação e 14 dias microaeróbico
LH5	Bagaço de cana 10%	7 dias agitação e 14 dias microaeróbico

Visualizando-se os géis foi possível verificar o aparecimento de banda verde mais intensa com a linhagem H2 em meio contendo serragem (4%), amostra nativa, e com a linhagem LH5 em meio bagaço de cana 10%, amostra nativa, ambas com 7 dias agitação e 14 dias microaeróbico.

4.6.6. Atividade de lacase

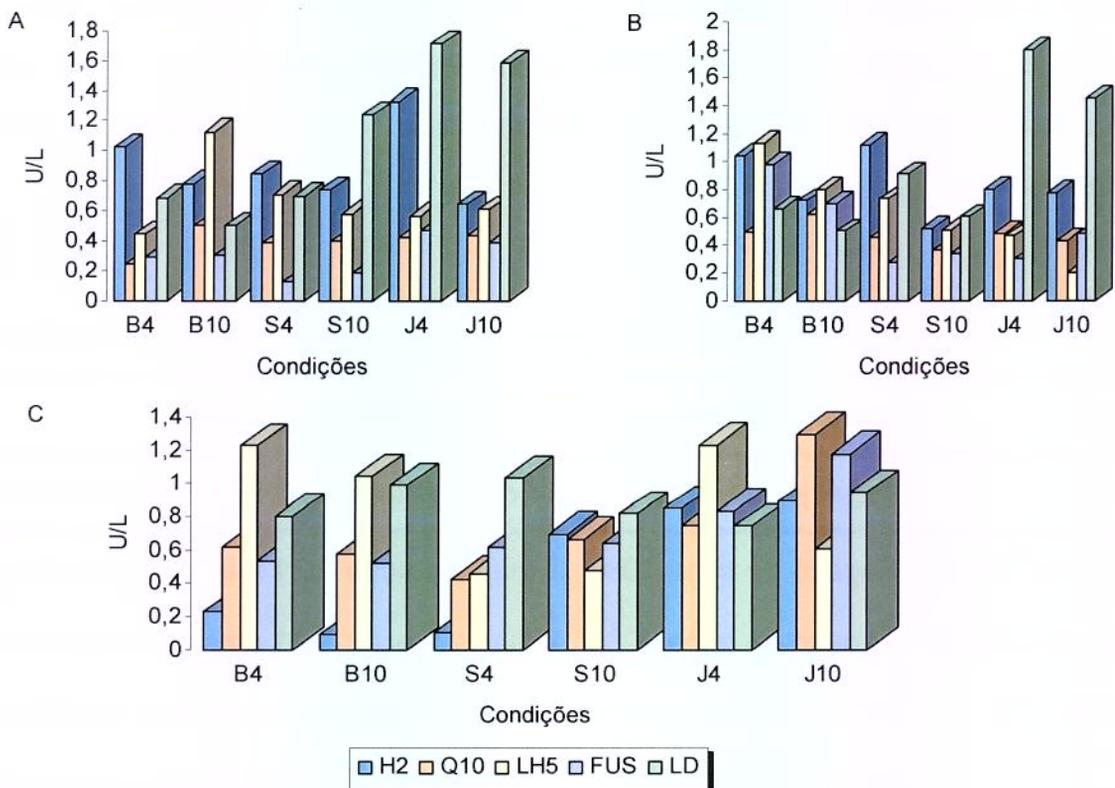


Figura 25: Atividade de lacase das linhagens crescidas sob diferentes condições de oxigenação: A (14 dias agitação e 7 dias microaeróbico), B (7 dias agitação e 21 dias microaeróbico) e C (7 dias agitação e 14 dias microaeróbico) em meio nutriente contendo bagaço de cana, serragem ou papel jornal nas concentrações de 4% (B4, S4 e J4) e 10% (B10, S10 e J10). Linhagens: basidiomiceto H2, *T. canadense* (Q10), deuteromiceto LH5, *F. oxysporum* (FUS) e *G. terrestre* (LD).

Como pode ser observado na Figura 25 todas as linhagens apresentaram atividade de lacase nos três meios de cultivo e nas três diferentes condições de oxigenação testadas. De um modo geral, a linhagem *G. terrestre* (LD), foi a que apresentou os melhores resultados tanto na concentração de 4% quanto de 10%, nos meios contendo papel jornal nas condições de oxigenação A e B, sendo a máxima atividade obtida após crescimento em meio contendo papel jornal como fonte de carbono, na concentração 4% (1,8 U/L) com 7 dias agitação e 21 dias microaeróbico (Figura 25B), na concentração de 10% (1,6 U/L) com 14 dias agitação e 7 dias microaeróbico (Figura 25A).

4.6.7. Atividade de peroxidase

De acordo com a Figura 26, a linhagem *G. terrestre* (LD) (1,7 U/L) apresentou atividade máxima de lacase em meio contendo papel jornal na concentração 4%, após um período de incubação de 7 dias agitação e 21 dias microaeróbico (Figura 26B), e em meio contendo serragem como fonte carbono na concentração de 10% (1,7 U/L) após 14 dias agitação e 7 dias microaeróbico (Figura 26A). Na condição 7 dias agitação e 14 dias microaeróbico em meio contendo papel jornal como fonte de carbono, as linhagem LH5 e *T. canadense* (Q10) apresentaram atividade de peroxidase, na concentração 4% e 10%, respectivamente.

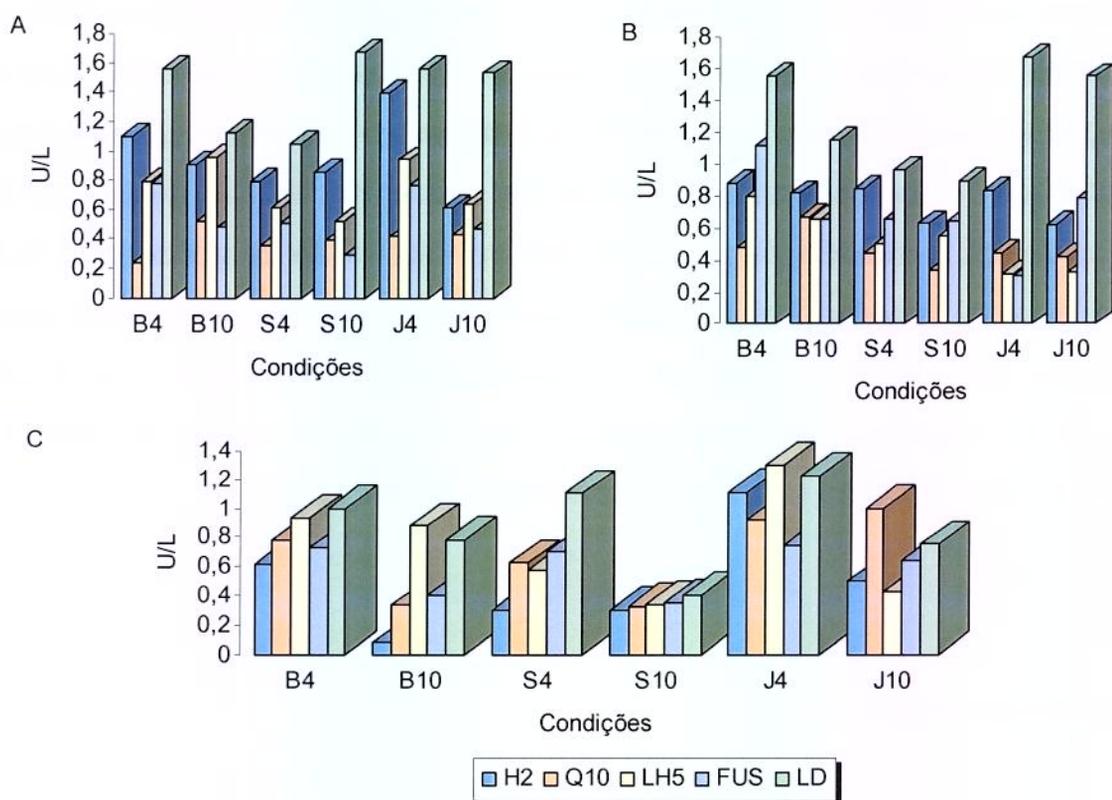


Figura 26: Atividade de peroxidase das linhagens crescidas sob diferentes condições de oxigenação: A (14 dias agitação e 7 dias microaeróbico), B (7 dias agitação e 21 dias microaeróbico) e C (7 dias agitação e 14 dias microaeróbico) em meio nutriente contendo bagaço de cana, serragem ou papel jornal nas concentrações de 4% (B4, S4 e J4) e 10% (B10, S10 e J10). Linhagens: basidiomiceto H2, *T. canadense* (Q10), deuteromiceto LH5, *F. oxysporum* (FUS) e *G. terrestre* (LD).

De acordo com os resultados obtidos nas Figuras 20-26 todas as linhagens apresentaram produção das enzimas celulolíticas e ligninolíticas, sendo que a linhagem *G. terrestre* (LD) apresentou atividade de lacase (1,7 U/L) e peroxidase (1,7 U/L), quando crescida em meio contendo papel jornal como fonte de carbono na concentração de 4%, com 7 dias agitação e 21 dias microaeróbico, e atividade de avicelase (360 U/L) quando crescida em meio contendo bagaço de cana (4%) com 14 dias agitação e 7 dias microaeróbico. A linhagem LH5 apresentou atividade de lignina-peroxidase (27 U/L), quando

cultivada em meio contendo papel jornal (4%) com 14 dias agitação e 7 dias microaeróbico, e manganês-peroxidase (6 U/L) (meio bagaço de cana, 10%, 7 dias agitação e 14 dias microaeróbico). A linhagem *F. oxysporum* (FUS) de uma forma geral apresentou atividade de CMCase em meio contendo serragem tanto na concentração de 4% quanto 10% nas três diferentes condições de oxigenação testadas. Enquanto que os melhores resultados de atividade de β -glicosidase, foram obtidos, principalmente, em meio contendo serragem (4% e 10%) nas três diferentes condições de oxigenação testadas, com as linhagens LH5, *T. canadense* (Q10) e *F. oxysporum* (FUS).

4.6.8. Biomassa Fúngica

De acordo com a Figura 27, a linhagem H2 apresentou 900 mg de biomassa fúngica/100 g de substrato quando cultivada em meio contendo jornal (10%) como fonte de carbono, com 14 dias sob agitação e 7 dias microaeróbico. Já a linhagem *T. canadense* (Q10) apresentou 800 mg de biomassa fúngica/100 g de substrato em meio contendo bagaço de cana (10%), com 7 dias agitação e 21 dias microaeróbico. A linhagem *F. oxysporum* (FUS) apresentou 750 mg de biomassa fúngica/100 g de substrato em meio contendo serragem (10%) como fonte de carbono com 14 dias agitação e 7 dias microaeróbico. A linhagem LH5 apresentou 360 mg de biomassa fúngica/100 g de substrato em meio contendo serragem (4%) como fonte de carbono, com 7 dias agitação e 14 dias microaeróbico. A linhagem *G. terrestre* (LD) apresentou valor máximo 700 mg de biomassa fúngica/100 g de substrato quando cultivada em meio contendo serragem (10%), com 14 dias agitação e 7 dias microaeróbico.

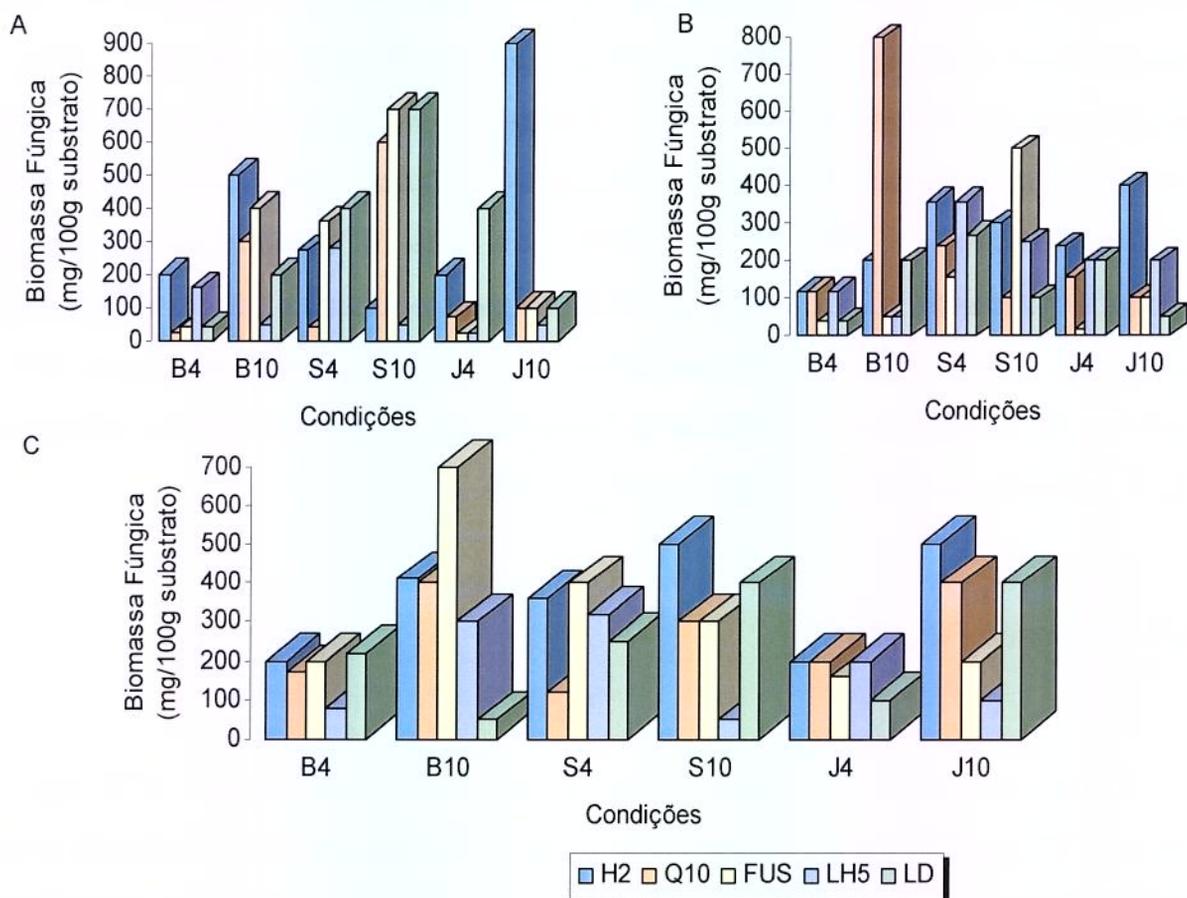


Figura 27: Biomassa fúngica das linhagens crescidas sob diferentes condições de oxigenação: A (14 dias agitação e 7 dias microaeróbico), B (7 dias agitação e 21 dias microaeróbico) e C (7 dias agitação e 14 dias microaeróbico) em meio nutriente contendo bagaço de cana, serragem ou papel jornal nas concentrações de 4% (B4, S4 e J4) e 10% (B10, S10 e J10). Linhagens: basidiomiceto H2, *T. canadense* (Q10), *F. oxysporum* (FUS), deuteromiceto LH5 e *G. terrestre* (LD).

4.7. Crescimento microaeróbico em diferentes concentrações de substrato e avaliação das enzimas celulolíticas e ligninolíticas e da biomassa fúngica

As linhagens H2, LH5, *G. terrestre* (LD), *F. oxysporum* (FUS) e *T. canadense* (Q10) foram cultivadas em um meio nutriente contendo serragem ou

bagaço de cana como fonte de carbono, nas concentrações de 4% e 10% e incubadas por um período de 20, 30 e 40 dias, sob condição microaeróbica. Os resultados obtidos estão apresentados nas Figuras 28 - 37.

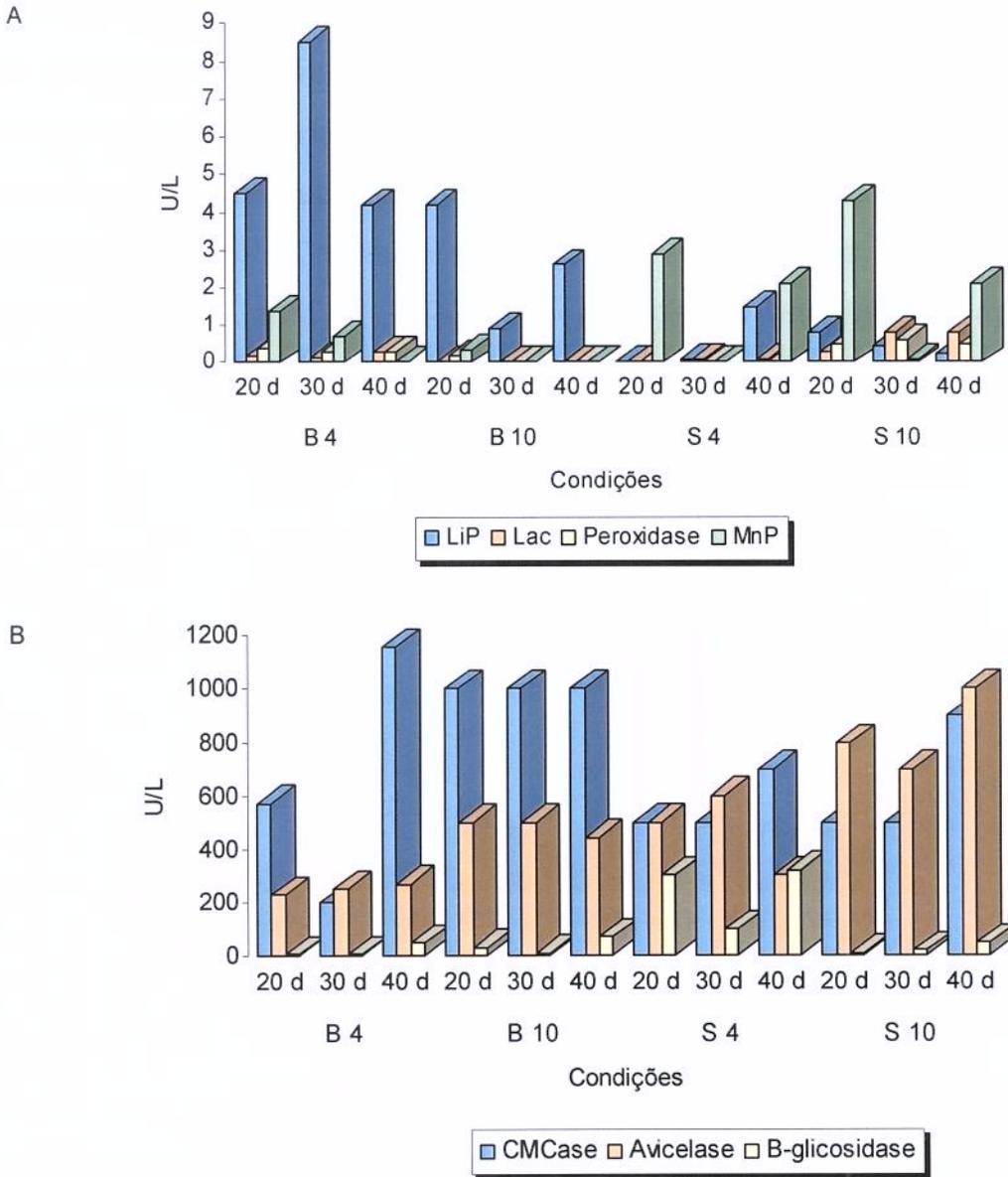


Figura 28. Atividades enzimáticas do basidiomiceto H2 quando crescida por 20, 30 e 40 dias (20d, 30d e 40d), sob condição microaeróbica em meio nutriente contendo bagaço de cana ou serragem nas concentrações de 4% (B4 e S4) e 10% (B10 e S10). (A) – lignina peroxidase (LiP), lacase (Lac), peroxidase e manganês peroxidase (MnP); (B) – carboximetilcelulase (CMCase), avicelase e β -glicosidase.

Observando-se a Figura 28A, verifica-se que a linhagem H2 apresentou atividade de LiP (8,5 U/L) após cultivo em meio contendo bagaço de cana (4%, 20 dias) como fonte de carbono, e atividade de MnP (4,2 U/L) após crescimento em serragem (4%, 30 dias). Observou-se produção de LiP na maioria dos dias avaliados utilizando-se o bagaço de cana como fonte de carbono na concentração de 4%. Em meio contendo serragem (10%) como fonte de carbono observou-se produção de MnP, na maioria dos dias estudados. Na Figura 28B, verificou-se atividade de CMCase (1.180 U/L) quando a linhagem H2 foi cultivada em meio contendo bagaço de cana (4%, 40 dias), e atividade de avicelase (1.000 U/L) quando utilizado serragem (10%, 40 dias) como fonte de carbono.

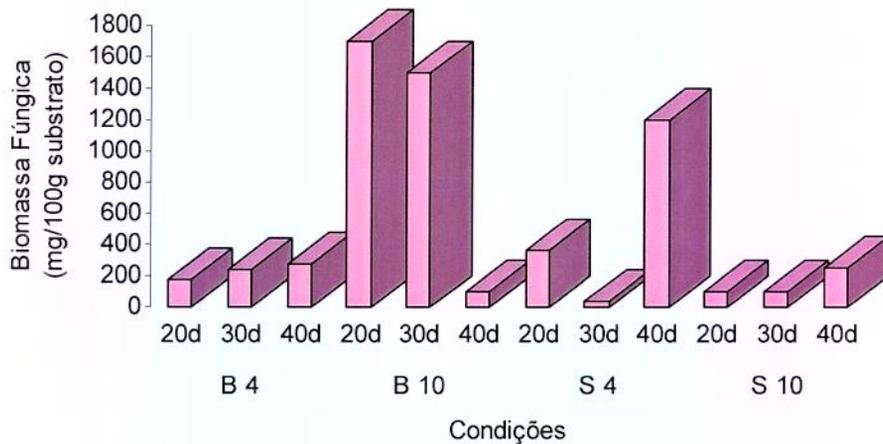
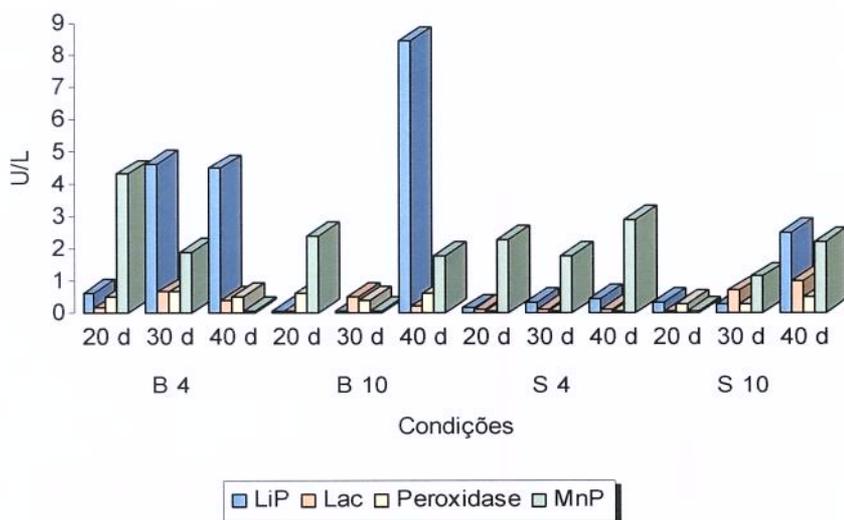


Figura 29. Biomassa fúngica basidiomiceto H2 quando crescido por 20, 30 e 40 dias (20d, 30d e 40d), sob condição microaeróbica em meio nutriente contendo bagaço de cana ou serragem nas concentrações de 4% (B4 e S4) e 10% (B10 e S10).

A linhagem H2 apresentou 1.750 mg de biomassa fúngica/100 g de substrato quando cultivada em meio contendo bagaço de cana como fonte de carbono na concentração de 10%, com 20 dias de cultivo (Figura 29). Observou-

se que ao utilizar bagaço de cana na concentração de 4% a produção de biomassa fúngica foi semelhante em todos os dias avaliados. Quando utilizou-se bagaço de cana na concentração de 10% houve um aumento na produção da biomassa fúngica até 30 dias de cultivo.

A



B

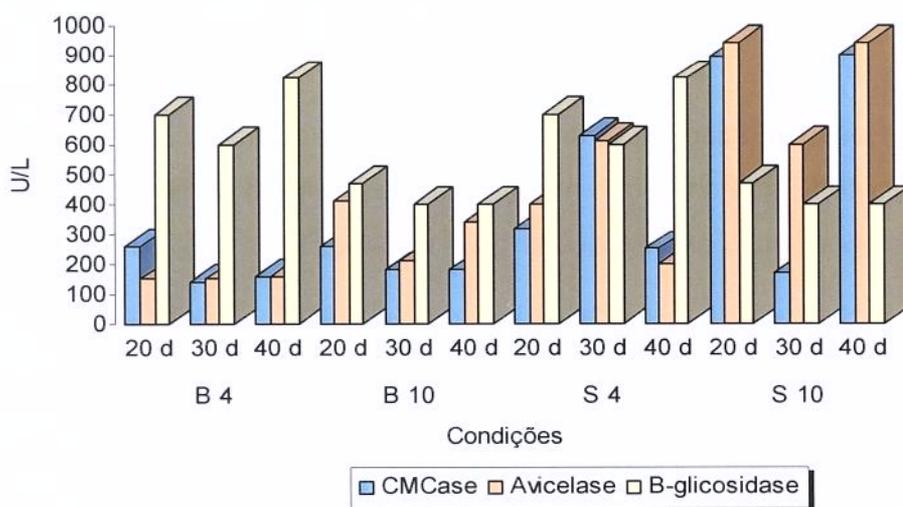


Figura 30. Atividades enzimáticas do deutericeto LH5 quando crescido por 20, 30 e 40 dias (20d, 30d e 40d), sob condição microaeróbica em meio nutriente contendo bagaço de cana ou serragem nas concentrações de 4% (B4 e S4) e 10% (B10 e S10). (A) – lignina peroxidase (LiP), lacase (Lac), peroxidase e manganês peroxidase (MnP), (B) – carboximetilcelulase (CMCase), avicelase e β -glicosidase.

Como pode ser observado na Figura 30A, a linhagem LH5 apresentou atividade de MnP em quase todas as condições testadas. A produção máxima de LiP (8,5 U/L) foi observada com 40 dias em meio bagaço de cana na concentração de 10%. Na figura 30B observou-se que a linhagem apresentou atividade de β -glicosidase (820 U/L) em meio contendo bagaço de cana na concentração de 4%, e o pico máximo de avicelase (920 U/L) foi obtido em meio contendo serragem na concentração de 10% nos diferentes dias testados.

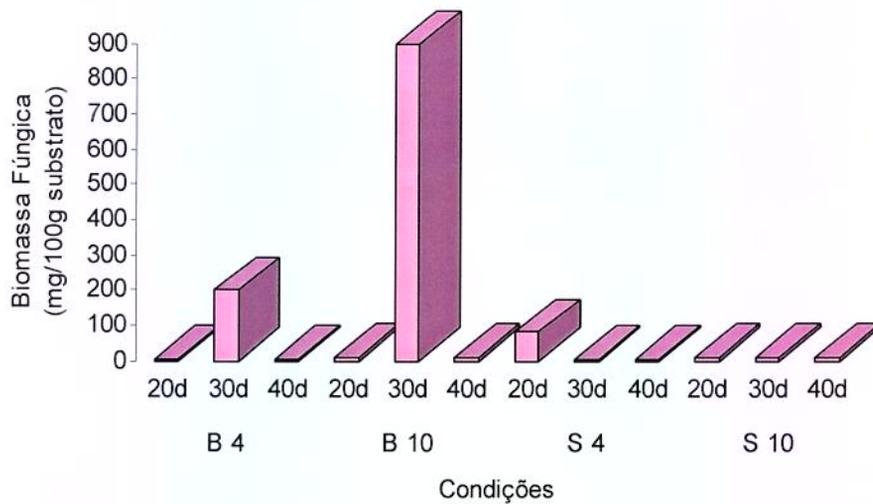


Figura 31. Biomassa fúngica do deuteromiceto LH5 quando crescido por 20, 30 e 40 dias (20d, 30d e 40d), sob condição microaeróbica em meio nutriente contendo bagaço de cana ou serragem nas concentrações de 4% (B4 e S4) e 10% (B10 e S10).

A maior produção de biomassa (900 mg de biomassa fúngica/100 g de substrato), foi observada após crescimento em meio bagaço de cana na concentração de 10% com 30 dias de cultivo (Figura 31).

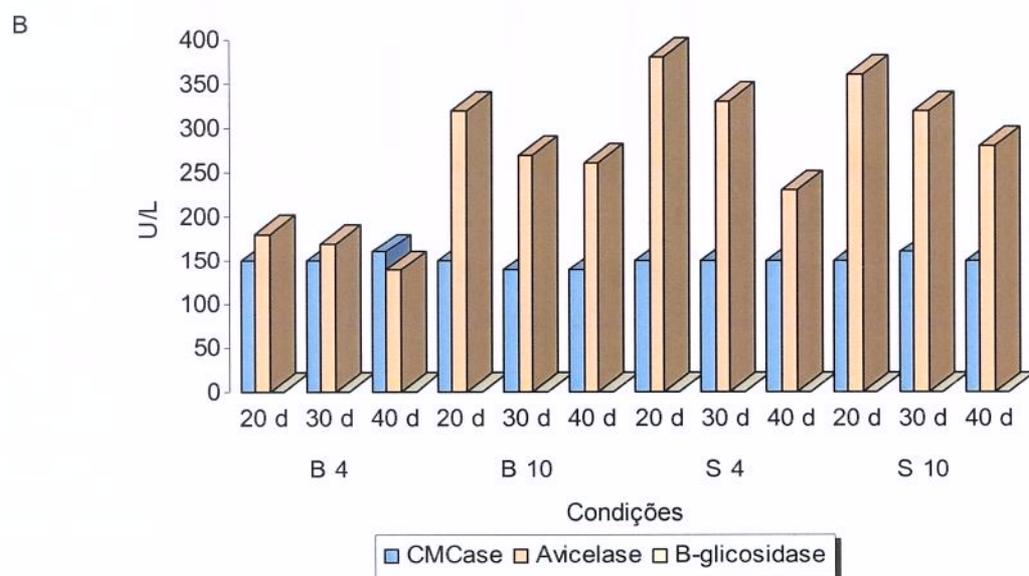
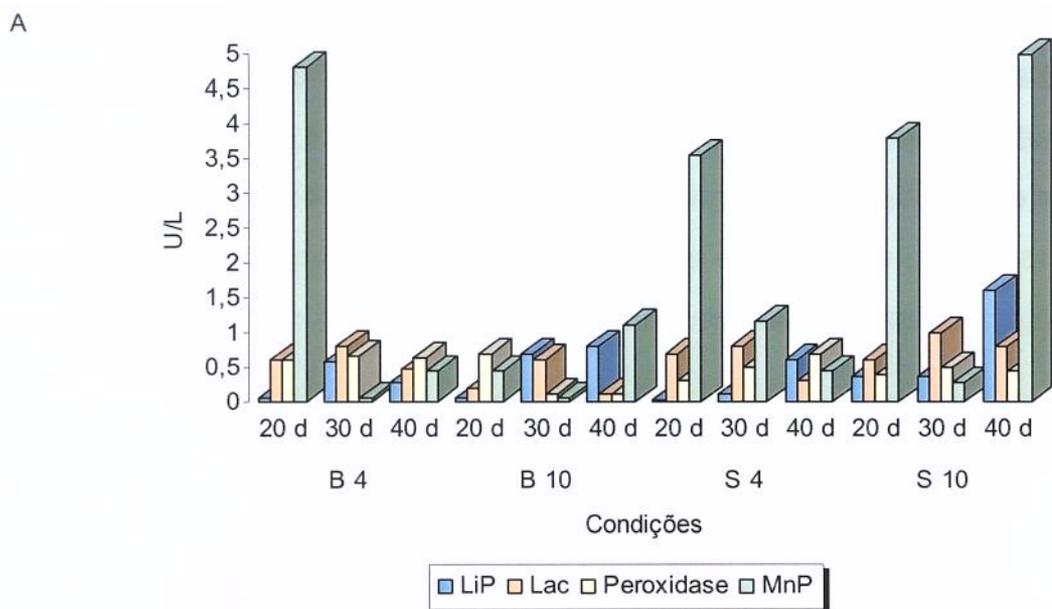


Figura 32. Atividades enzimáticas da linhagem *G. terrestre* (LD) quando crescida por 20, 30 e 40 dias (20d, 30d e 40d), sob condição microaeróbica em meio nutriente contendo bagaço de cana (B) ou serragem (S) nas concentrações de 4% (B4 e S4) e 10% (B10 e S10). (A) – lignina peroxidase (LiP), lacase (Lac), peroxidase e manganês peroxidase (MnP), (B) – carboximetilcelulase (CMCase), avicelase e β -glicosidase.

De acordo com a Figura 32A, pode-se verificar que a linhagem *G. terrestre* (LD) apresentou produção de MnP (5 U/L) com 40 dias de crescimento em meio contendo serragem na concentração de 10%, e 4,8 U/L com 20 dias em meio contendo bagaço de cana na concentração de 4%. Na Figura 32B, verifica-se que o pico máximo de avicelase (380 U/L) ocorreu com 20 dias de cultivo em meio contendo serragem como fonte de carbono na concentração de 4%.

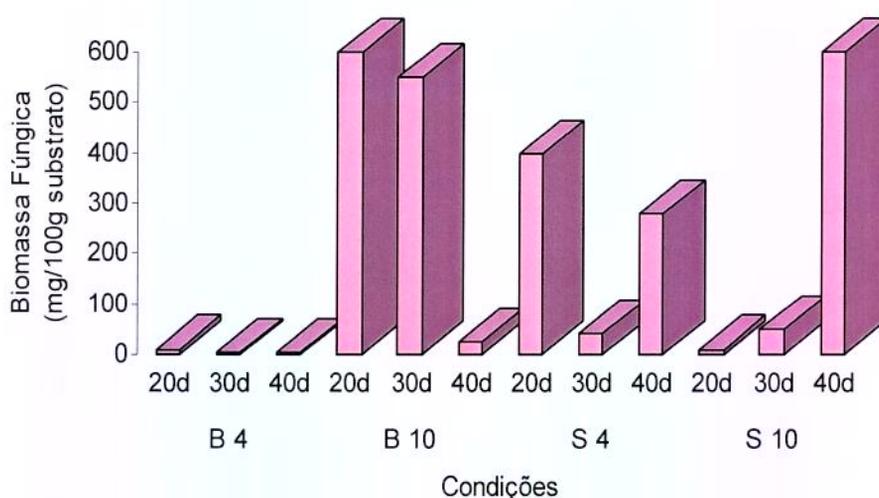


Figura 33. Biomassa fúngica da linhagem *G. terrestre* (LD) quando crescida por 20, 30 e 40 dias (20d, 30d e 40d), sob condição microaeróbica em meio nutriente contendo bagaço de cana ou serragem nas concentrações de 4% (B4 e S4) e 10% (B10 e S10).

O valor máximo de biomassa (600 mg de biomassa fúngica/100 g de substrato), foi obtido com 20 dias de cultivo em meio contendo bagaço de cana na concentração de 10% (Figura 33). Pôde-se observar um aumento na produção da biomassa fúngica após 30 dias de cultivo em meio contendo serragem como fonte de carbono na concentração de 10%.

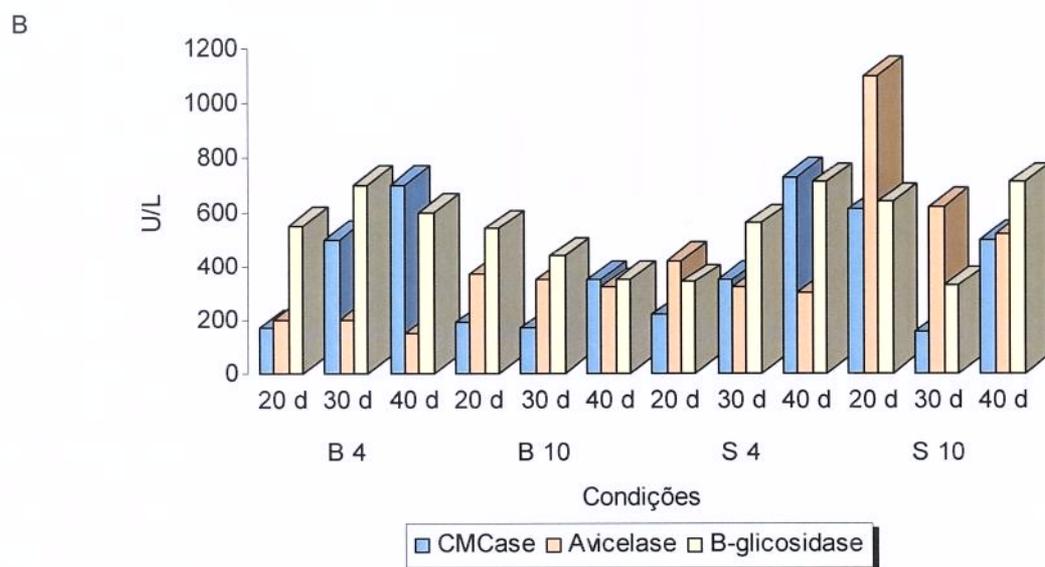
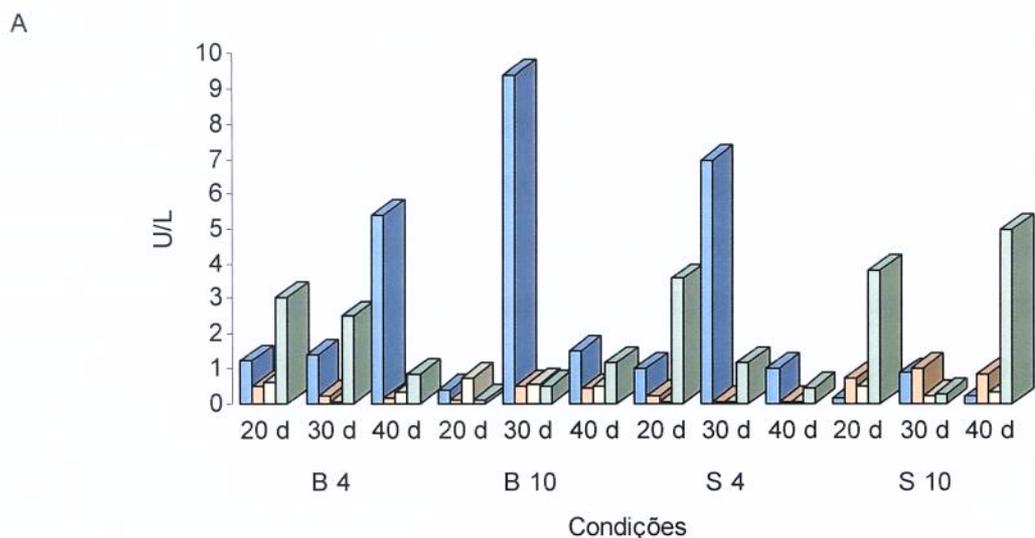


Figura 34. Atividades enzimáticas da linhagem *F. oxysporum* (FUS) quando crescida por 20, 30 e 40 dias (20d, 30d e 40d), sob condição microaeróbica em meio nutriente contendo bagaço de cana ou serragem nas concentrações de 4% (B4 e S4) e 10% (B10 e S10). (A) – lignina peroxidase (LiP), lacase (Lac), peroxidase e manganês peroxidase (MnP), (B) – carboximetilcelulase (CMCase), avicelase e β -glicosidase.

O fungo *F. oxysporum* (FUS) apresentou atividade LiP e MnP nas condições testadas como pode ser verificado na Figura 34A. A produção máxima de LiP (9,2 U/L) foi obtida com 30 dias de crescimento em meio contendo bagaço de cana na concentração de 10%. Na Figura 34B, observou-se a produção de todas as enzimas, sendo que a melhor atividade de avicelase (1.100 U/L), foi produzida com 20 dias de cultivo em meio contendo serragem na concentração de 10%.

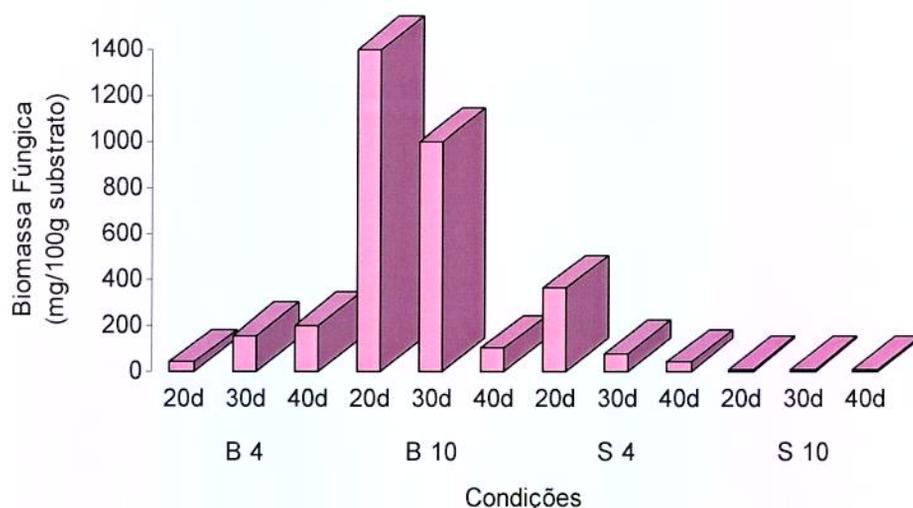


Figura 35. Biomassa fúngica da linhagem *F. oxysporum* (FUS) quando crescida por 20, 30 e 40 dias (20d, 30d e 40d), sob condição microaeróbica em meio nutriente contendo bagaço de cana ou serragem nas concentrações de 4% (B4 e S4) e 10% (B10 e S10).

De acordo com a Figura 35, pode-se verificar que a linhagem *F. oxysporum* (FUS) apresentou valor máximo (1.400 mg de biomassa fúngica/100 g de substrato) com 20 dias de cultivo em meio contendo bagaço de cana na concentração de 10%.

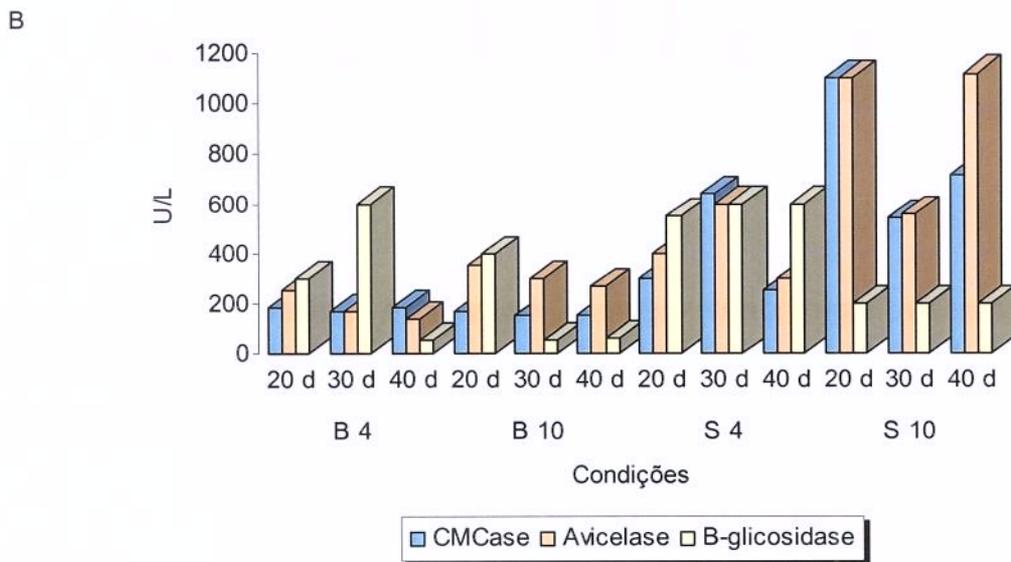
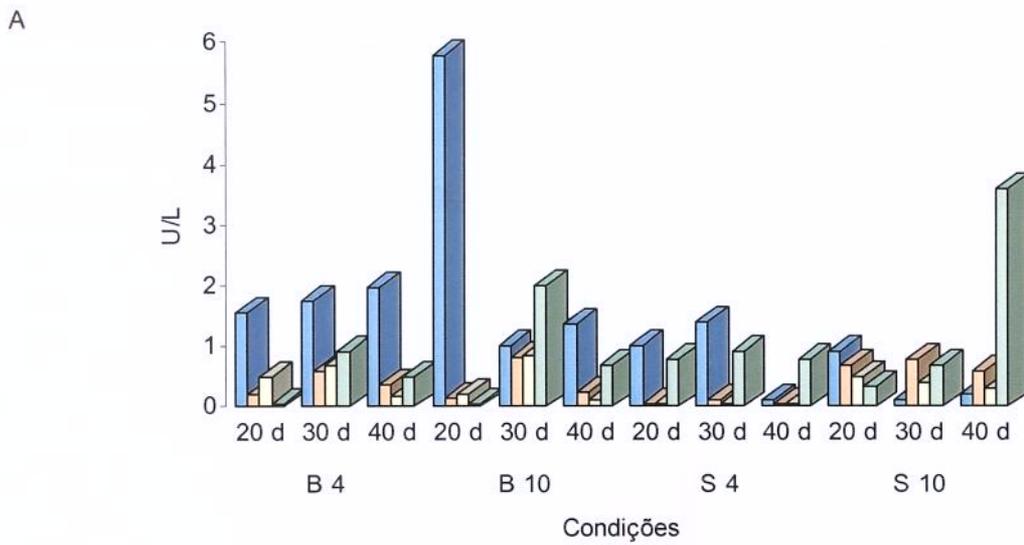


Figura 36. Atividades enzimáticas da linhagem *T. canadense* (Q10) quando crescida por 20, 30 e 40 dias (20d, 30d e 40d), sob condição microaeróbica em meio nutriente contendo bagaço de cana ou serragem nas concentrações de 4% (B4 e S4) e 10% (B10 e S10). (A) – lignina peroxidase (LiP), lacase (Lac), peroxidase e manganês peroxidase (MnP), (B) – carboximetilcelulase (CMCase), avicelase e β -glicosidase.

Como pode ser observado na Figura 36A a linhagem *T. canadense* (Q10) apresentou produção de LiP (5,9 U/L) com 20 dias de cultivo em meio contendo bagaço de cana na concentração de 10%. Em meio contendo serragem na concentração de 10% verificou-se as melhores atividades de carboximetilcelulase e avicelase (1.100 U/L) com 20 dias de crescimento (Figura 36B).

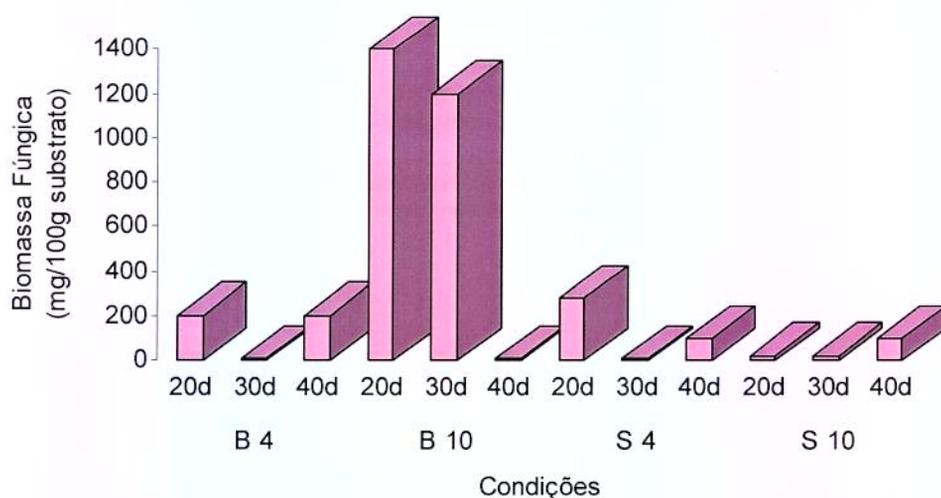


Figura 37. Biomassa fúngica da linhagem *T. canadense* (Q10) quando crescida por 20, 30 e 40 dias (20d, 30d e 40d), sob condição microaeróbica em meio nutriente contendo bagaço de cana ou serragem nas concentrações de 4% (B4 e S4) e 10% (B10 e S10).

Como pode ser verificado na Figura 37, a linhagem *T. canadense* (Q10) apresentou 1.400 mg de biomassa fúngica/100 g de substrato quando cultivada em meio contendo bagaço de cana na concentração de 10% como fonte de carbono, com 20 dias de cultivo.

De acordo com os resultados obtidos observou-se que houve produção das enzimas celulolíticas e ligninolíticas nas condições testadas. A linhagem H2 quando crescida em meio contendo bagaço de cana como fonte de carbono apresentou atividades de LiP e CMCase. A mesma linhagem, quando crescida em meio contendo serragem apresentou atividades de MnP e avicelase. A linhagem LH5, de uma forma geral, apresentou melhor atividade de LiP principalmente com 40 dias em meio contendo bagaço de cana tanto em 4% quanto 10%, apresentando também atividade de β -glicosidase. A levedura *G. terrestre* (LD) apresentou atividade de MnP e avicelase na maioria das condições testadas. Quando analisado os resultados obtidos com os fungos *F. oxysporum* (FUS) e *T. canadense* (Q10) observou-se a produção de enzimas celulolíticas quando cultivados em meio contendo serragem como fonte de carbono. Em meio contendo bagaço de cana (10%) as linhagens apresentaram atividade de LiP, com 20 dias (linhagem *T. canadense* (Q10)) e 30 dias (linhagem *F. oxysporum* (FUS)) de cultivo. Com relação a biomassa fúngica observou-se a maioria das linhagens apresentaram produção quando cultivadas em meio contendo bagaço de cana na concentração de 10%, com 20 dias de crescimento.

As cinco linhagens estudadas foram capazes de utilizar os diferentes substratos nas duas concentrações (4% e 10%), como fonte de carbono e energia. Com relação as condições de oxigenação testadas, pode-se observar que as amostras apresentaram melhores resultados de atividades enzimáticas quando cultivadas sob condição microaeróbica do que sob condição combinada de oxigenação (agitação e microaeróbico).

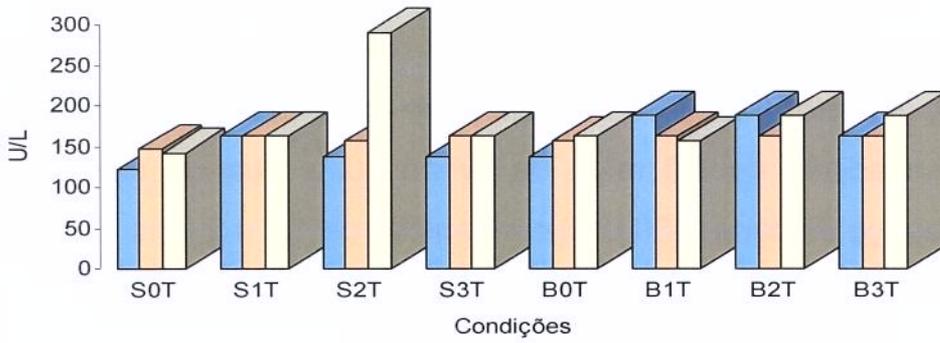
De acordo com os resultados obtidos nas últimas etapas (itens 4.4, 4.5, 4.6 e 4.7) foi possível fazer a seleção final dos microrganismos. Foram selecionadas o basidiomiceto linhagem H2 por apresentar capacidade de produzir enzimas celulolíticas, o fungo *F. oxysporum* (FUS) por apresentar atividade da enzima β -glicosidase e a levedura *G. terrestre* (LD) por apresentar capacidade de produzir enzimas ligninolíticas.

4.8. Efeito de diferentes compostos na fermentação e atividade enzimática das linhagens

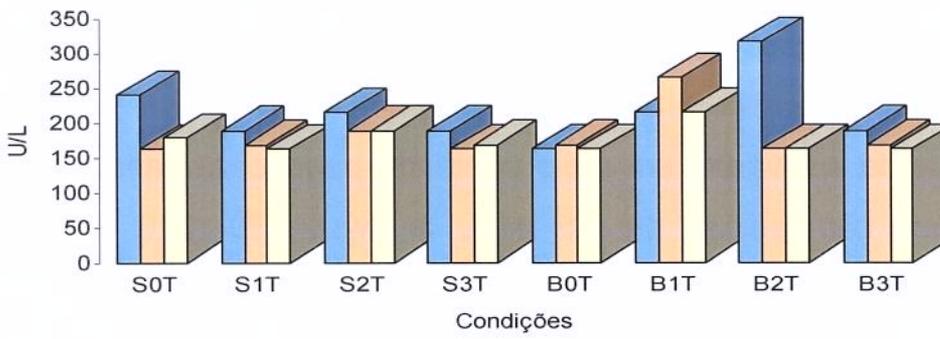
4.8.1. Avaliação das atividades enzimáticas celulolíticas e ligninolíticas, e dos produtos de fermentação produzidos após adição de Tween 80 ao meio de cultivo

A influência do tween 80 foi verificada após crescimento das linhagens H2, *F. oxysporum* (FUS) e *G. terrestre* (LD) em meio nutriente contendo serragem e bagaço de cana como fontes de carbono na concentração de 4% por 30 dias sob condição microaeróbica.

A



B



C

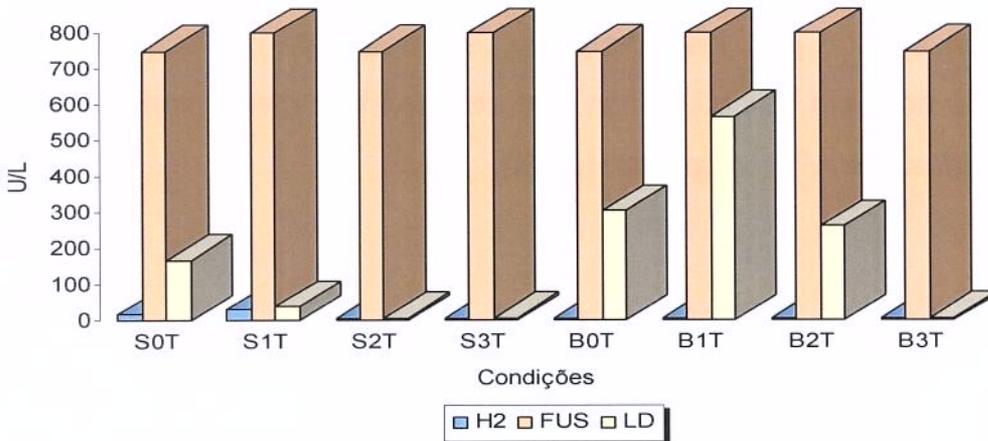


Figura 38. Atividades celulolíticas das linhagens crescidas por 30 dias sob condição microaeróbica em meio nutriente nas seguintes condições: 0T – sem tween 80; 1T – 0,5 mL/L tween 80; 2T – 1,0 mL/L tween 80; 3T – 2,0 mL/L tween 80; contendo serragem (S) ou bagaço de cana (B). A – Carboximetilcelulase, B – Avicelase e C - β -glicosidase. Linhagens: basidiomiceto H2, *F. oxysporum* (FUS) e *G. terrestre* (LD).

Observando-se os valores apresentados na Figura 38A, verificou-se que todos os microrganismos apresentaram maior atividade de CMCase quando adicionou-se tween 80 ao meio nutriente. A melhor atividade foi produzida pela linhagem *G. terrestre* (LD) (280 U/L) em meio contendo serragem como fonte de carbono com adição de 1,0 mL/L de tween 80, e quando crescida em meio contendo bagaço de cana (180 U/L) com adição de 1,0 e 2,0 mL/L de tween 80.

Os resultados de atividade de avicelase estão demonstrados na Figura 38B. Os melhores resultados foram obtidos com a linhagem H2 (300 U/L) em meio contendo bagaço de cana com adição de 1,0 mL/L de tween 80. As linhagens *F. oxysporum* (FUS) e *G. terrestre* (LD) apresentaram atividade também quando cultivadas em meio contendo bagaço de cana como fonte de carbono, mas com adição de 0,5 mL/L de tween 80 (250 U/L e 200 U/L, respectivamente).

A atividade de β -glicosidase pode ser observada na Figura 38C. A adição de tween 80 ao meio de cultivo não exerceu nenhum efeito positivo na produção de β -glicosidase por *F. oxysporum* (FUS).

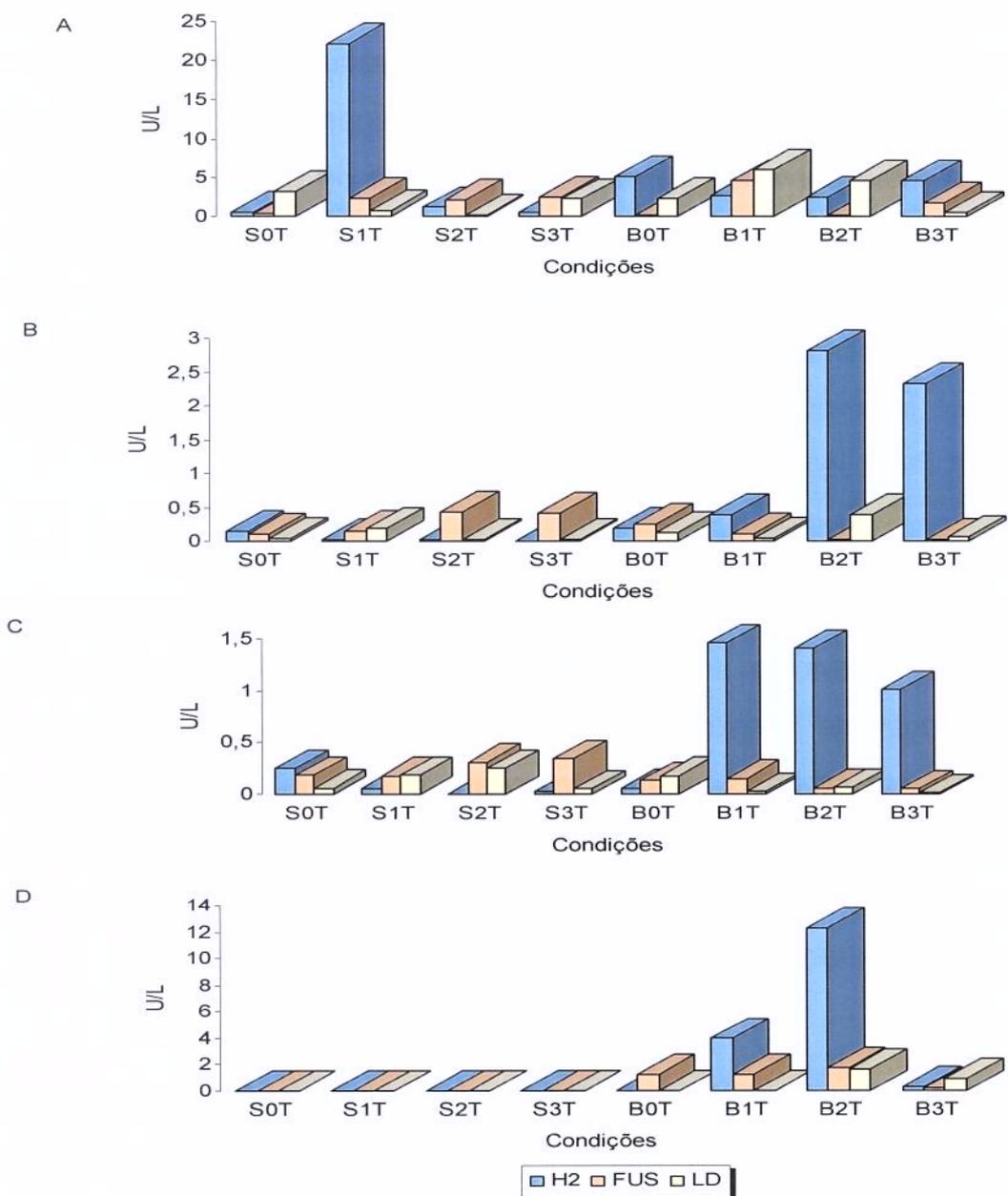


Figura 39. Atividades ligninolíticas das linhagens crescidas por 30 dias sob condição microaeróbica em meio nutriente nas seguintes condições: : 0T – sem tween 80; 1T – 0,5 mL/L tween 80; 2T – 1,0 mL/L tween 80; 3T – 2,0 mL/L tween 80; contendo serragem (S) ou bagaço de cana (B). A – Lignina Peroxidase, B – Lacase, C – Peroxidase e D – Manganês Peroxidase. Linhagens: basidiomiceto H2, *F. oxysporum* (FUS) e *G. terrestre* (LD).

Na Figura 39A está representada a atividade de LiP, onde pode-se observar que todas as linhagens apresentaram produção desta enzima. A atividade máxima de LiP foi obtida com a linhagem H2 (21 U/L) após crescimento em meio contendo serragem como fonte de carbono, com adição de 0,5 mL/L de tween 80. Em meio contendo bagaço de cana a linhagem que apresentou a melhor atividade foi a *G. terrestre* (LD) (5,0 U/L) com adição de 0,5 mL/L de tween 80. A linhagem *F. oxysporum* (FUS) apresentou maior produção de LiP em meio contendo bagaço de cana com adição de tween 80 quando comparado com meio sem adição de tween 80.

A enzima lacase foi observada na três linhagens estudadas nas condições propostas. Analisando-se a Figura 39B, verificou-se que a linhagem H2 apresentou produção de lacase quando crescida em meio contendo bagaço de cana como fonte de carbono, quando comparado com meio sem adição de tween 80, sendo os valores máximos (2,8 U/L e 2,0 U/L) obtidos com adição de 1,0 mL/L e 2,0 mL/L, respectivamente. Em meio contendo serragem os melhores resultados foram obtidos com a linhagem *F. oxysporum* (FUS).

Analisando-se os resultados da Figura 39C, verificou-se que a enzima peroxidase foi produzida pelas três linhagens testadas nas diferentes condições de cultivo. De uma forma geral a linhagem H2 apresentou resultados superiores em meio contendo bagaço de cana como fonte de carbono com adição de tween 80, quando comparado com meio sem adição de tween 80, sendo o máximo de atividade obtido com adição de 0,5 mL/L (1,3 U/L). A linhagem *F. oxysporum* (FUS) quando cultivada em meio contendo serragem apresentou maior atividade de peroxidase em meio com adição de tween 80, do que no meio sem tween 80.

De acordo com a Figura 39D, pode-se verificar que as linhagens não apresentaram atividade de MnP em meio contendo serragem como fonte de carbono. A máxima atividade foi obtida com a linhagem H2 (12 U/L) após crescimento em meio contendo bagaço de cana como fonte de carbono, com adição de 1,0 mL/L de tween 80.

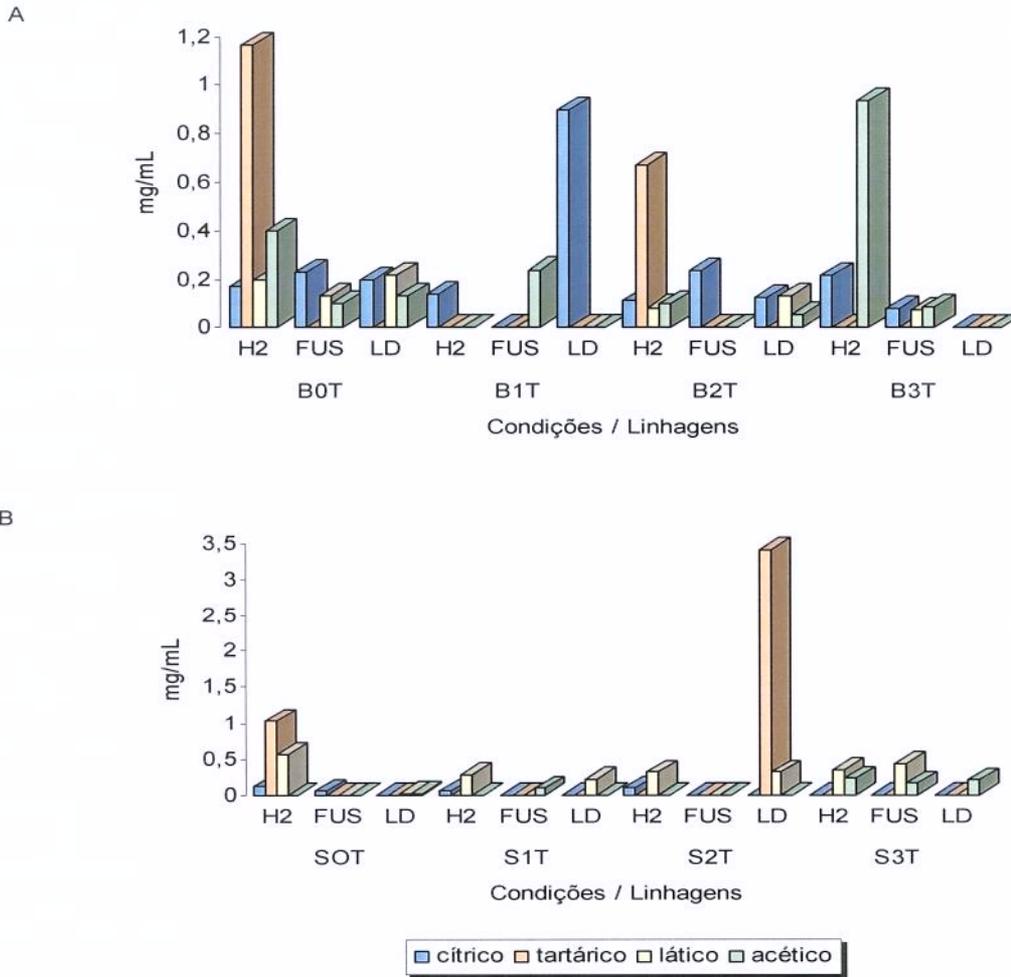


Figura 40. Produtos de fermentação produzidos pelas linhagens crescidas por 30 dias sob condição microaeróbica em meio nutriente nas seguintes condições: 0T – sem tween 80; 1T – 0,5 mL/L tween 80; 2T – 1,0 mL/L tween 80; 3T – 2,0 mL/L tween 80; contendo A) bagaço de cana (B) ou B) serragem (S). Linhagens: basidiomiceto H2, *F. oxysporum* (FUS) e *G. terrestre* (LD).

De acordo com as Figuras 40A e B a maioria das linhagens produziram ácido cítrico e ácido láctico nas condições testadas. O ácido tartárico foi produzido pela linhagem H2 nas duas diferentes fontes de carbono testadas (1,17 mg/mL – bagaço de cana e 1,03 mg/mL – serragem), em meio de cultivo sem adição de tween 80. Verifica-se também na Figura 40A que a linhagem *G. terrestre* (LD) apresentou produção de ácido cítrico (1,0 mg/mL) quando cultivada em meio contendo bagaço de cana com adição de tween 80 (0,5 mL/L) quando comparada com meio sem adição de tween 80. As linhagens *F. oxysporum* (FUS) e *G. terrestre* (LD) apresentaram produção de ácido acético e ácido láctico, respectivamente, em meio contendo serragem como fonte de carbono com adição de tween 80, quando comparado com meio sem adição de tween 80 (Figura 40B). As Figuras 40A e B também mostra que com a adição de 1,0 ml de tween 80, todas as linhagens apresentaram produção de ácido cítrico nas duas fontes de carbono testadas. A linhagem *G. terrestre* (LD) apresentou maior produção de ácido tartárico (3,8 mg/mL) e ácido láctico (0,3 mg/mL) em meio contendo serragem com adição de tween 80, quando comparado com meio sem adição de tween 80 (Figura 40B). A linhagem H2 apresentou maior produção de ácido acético nos dois meios de cultivo com adição de 2,0 mL de tween 80, quando comparado com meio sem adição de tween 80. Quanto as linhagens *G. terrestre* (LD) e *F. oxysporum* (FUS), estas também apresentaram maior produção deste ácido quando crescidas em meio contendo serragem como fonte de carbono com adição de tween 80 (Figura 40B).

O etanol foi produzido pelas linhagens *F. oxysporum* (FUS) e H2 em diferentes condições de cultivo como pode ser observado na Tabela 12. A maior produção de etanol foi obtida após cultivo da linhagem H2 em meio contendo serragem (4%) como fonte de carbono e adição de 0,5 mL de tween 80.

Tabela 12: Produção de etanol após crescimento das linhagens em meio nutriente contendo adição de tween 80

Linhagem	Fonte de Carbono	Concentração de tween 80	mg/mL
<i>F. oxysporum</i> (FUS)	Bagaço de cana 4%	Sem tween 80	0,077
H2	Serragem 4%	0,5 mL tween 80	0,14
H2	Serragem 4%	1,0 mL tween 80	0,06

Todas as linhagens testadas foram capazes de apresentar atividades celulolíticas e ligninolíticas. As linhagens foram crescidas em duas fontes de carbono diferentes (bagaço de cana e serragem) em meio sem adição de tween 80 e com adição de três diferentes concentrações de tween 80 (0,5; 1,0 e 2,0 mL/L). De acordo com STERNBERG (1976), o tween 80 é um surfactante que age na membrana celular aumentando a secreção de enzimas. O aumento na produção enzimática, entretanto varia entre os microrganismos e também entre as diferentes enzimas produzidas no mesmo organismo.

A linhagem H2 apresentou máximo de atividade enzimática de lacase, peroxidase, manganês-peroxidase e avicelase, quando crescida em meio contendo bagaço de cana como fonte de carbono, com adição de tween 80, e em meio contendo serragem apresentou o máximo de atividade de lignina-peroxidase, quando comparado com meio sem adição de tween 80. Com relação a linhagem *G. terrestre* (LD), esta apresentou atividade de carboximetilcelulase quando crescida em meio contendo serragem e atividade de β -glicosidase quando cultivada em meio contendo bagaço de cana como fonte de carbono com tween 80. Já a linhagem H2 apresentou melhor produção de etanol em presença de 0,5 e 1,0 mL/L de tween 80 em meio contendo serragem como fonte de carbono, quando comparado com meio sem adição de

tween 80. Estes resultados estão de acordo com STERNBERG (1976), pois foi verificado aumento de produção enzimática pela maioria das linhagens avaliadas neste estudo.

Alguns autores (ASTHER et al., 1987, LESTAN et al., 1993) estudaram o aumento na liberação enzimática na presença de certos surfactantes como por exemplo, tween 80, em cultura submersa e imobilizada de *P. chrysosporium*. Quando as culturas foram suplementadas com tween 80, os valores de MnP detectados foram duas vezes maiores que os obtidos no controle (sem adição de tween 80). Os níveis de atividade de MnP foram mantidos ao longo do cultivo, o qual pode estar correlacionado com a boa estabilidade das isoenzimas produzidas (COUTO et al., 2000). O mecanismo pelo qual os surfactantes (ex. tween 80) aumentam a liberação de enzimas extracelulares em fungos filamentosos não está bem estabelecido. Alguns autores sugerem que o tween 80 promove tanto o aumento como saída dos compostos da célula através da modificação da permeabilidade da membrana plasmática (ASTHER et al., 1987, COUTO et al., 2000).

PAVARINA & DURRANT (2001b) verificaram o efeito da adição de tween 80 ao meio de cultivo, onde foi possível observar que o basidiomiceto linhagem H2 após 30 dias de cultivo em meio contendo bagaço de cana (4%) como fonte de carbono sob condição microaeróbica foi capaz de produzir 2,8 U/L da enzima lacase usando seringaldazine como substrato (adição de 1,0 mL/L de tween 80 ao meio nutriente), os valores apresentados são maiores que os obtidos por SZKLARZ (1989), que cultivou *C. versicolor* (ATCC) por 19 dias em meio contendo glicose (5g/L) como fonte de carbono. Esta linhagem foi capaz de produzir 0,91 U/L da enzima lacase também utilizando seringaldazine como substrato.

4.8.2. Determinação dos produtos de fermentação produzidos após adição nutrientes suplementares ao meio de cultivo

O efeito dos nutrientes suplementares está apresentado na Figura 41.

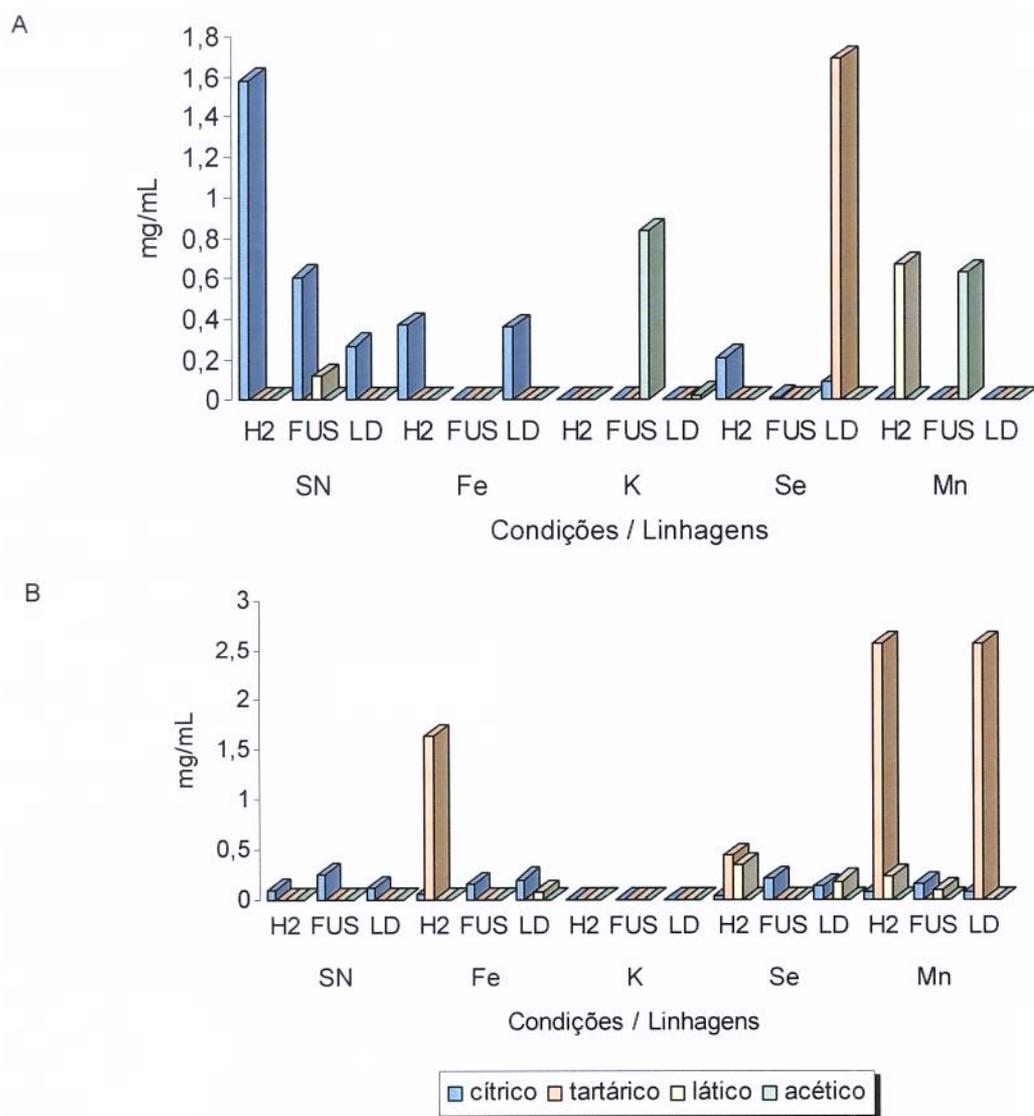


Figura 41. Produtos de fermentação produzidos pelas três linhagens crescidas por 30 dias sob condição microaeróbica em meio nutriente nas seguintes condições: SN – sem suplementos; Fe – Citrato Férrico Amoníaco; K - KNO_3 ; Se - Na_2SeO_3 e Mn - MnO_2 , contendo: A) bagaço de cana ou B) serragem na concentração final de 4%. Linhagens: basidiomiceto H2, *F. oxysporum* (FUS) e *G. terrestre* (LD).

Em meio sem adição de nutrientes suplementares (Figura 41), verificou-se que todas as linhagens produziram ácido cítrico. Comparando o efeito da adição de suplementos, verificou-se que quando as linhagens foram crescidas em meio adicionado de íons férricos, nota-se que a linhagem H2 apresentou maior produção de ácido tartárico (1,6 mg/mL), quando cultivada em meio contendo serragem como fonte de carbono (Figura 41B). Em meio contendo nitrato de potássio, a linhagem *F. oxysporum* (FUS) apresentou produção de ácido acético (1,0 mg/mL), em meio contendo bagaço de cana como fonte de carbono (Figura 41A). A maioria das linhagens estudadas apresentaram produção de ácido cítrico nas duas fontes de carbono testadas (bagaço de cana e serragem) com adição de íons selênio. A linhagem *G. terrestre* (LD) apresentou produção de ácido tartárico (1,68 mg/mL) após crescimento em meio contendo bagaço de cana (Figura 41A). Quanto ao efeito da adição de manganês, em meio contendo serragem como fonte de carbono, verificou-se que as linhagens H2 e *G. terrestre* (LD) (2,58 mg/mL e 2,57 mg/mL, respectivamente) apresentaram produção de ácido tartárico (Figura 41B).

O etanol foi produzido pelas linhagens *F. oxysporum* (FUS) e H2 em diferentes condições de cultivo como pode ser observado na Tabela 13. A maior produção de etanol foi obtida após cultivo da linhagem H2 em meio contendo bagaço de cana (4%) como fonte de carbono e adição de dióxido de manganês.

Tabela 13: Produção de etanol após crescimento das linhagens em meio nutriente contendo adição de nutrientes suplementares

Linhagem	Fonte de Carbono	Nutriente	mg/mL
<i>F. oxysporum</i> (FUS)	Bagaço de cana 4%	Dióxido de manganês	0,12
H2	Bagaço de cana 4%	Dióxido de manganês	0,34
H2	Serragem 4%	Dióxido de manganês	0,21

De acordo com os resultados obtidos pode-se observar que todas as linhagens foram capazes de produzir os diferentes ácidos orgânicos nas condições testadas, destacando-se a produção de ácido tartárico pelas linhagens *G. terrestre* (LD) (meio adicionado de íons selênio e dióxido de manganês) e H2 (meio com íons férrico e dióxido de manganês). As linhagens H2 e *F. oxysporum* (FUS) apresentaram produção de etanol em meio contendo bagaço de cana e dióxido de manganês. Entre os diferentes íons testados o mais promissor parece ser o dióxido de manganês, uma vez que, as linhagens apresentaram melhor produção de ácidos orgânicos após adição deste íon. A adição de MnO_2 provavelmente imita os processos ocorridos naturalmente; a acumulação de manganês, depositada com MnO_2 , pode ser observada em áreas de intensa degradação de lignina por muitos fungos de degradação branca (BLANCHETTE, 2000). Isto indica que o manganês pode ser importante na degradação da lignina, confirmando os resultados obtidos aqui. Possivelmente, este suplemento (MnO_2) atua como ativador do sistema fermentativo das linhagens, pois de acordo com COUTO (2000) a adição de MnO_2 no cultivo de *P. chrysosporium* aumentou a produção das enzimas manganês peroxidase e lacase, atuando com indutor do sistema enzimático do fungo.

4.8.3. Determinação dos produtos de fermentação produzidos pelas linhagens após adição de diferentes concentrações de cisteína no meio de cultivo

A influência da adição de cisteína está apresentada na Figura 42.

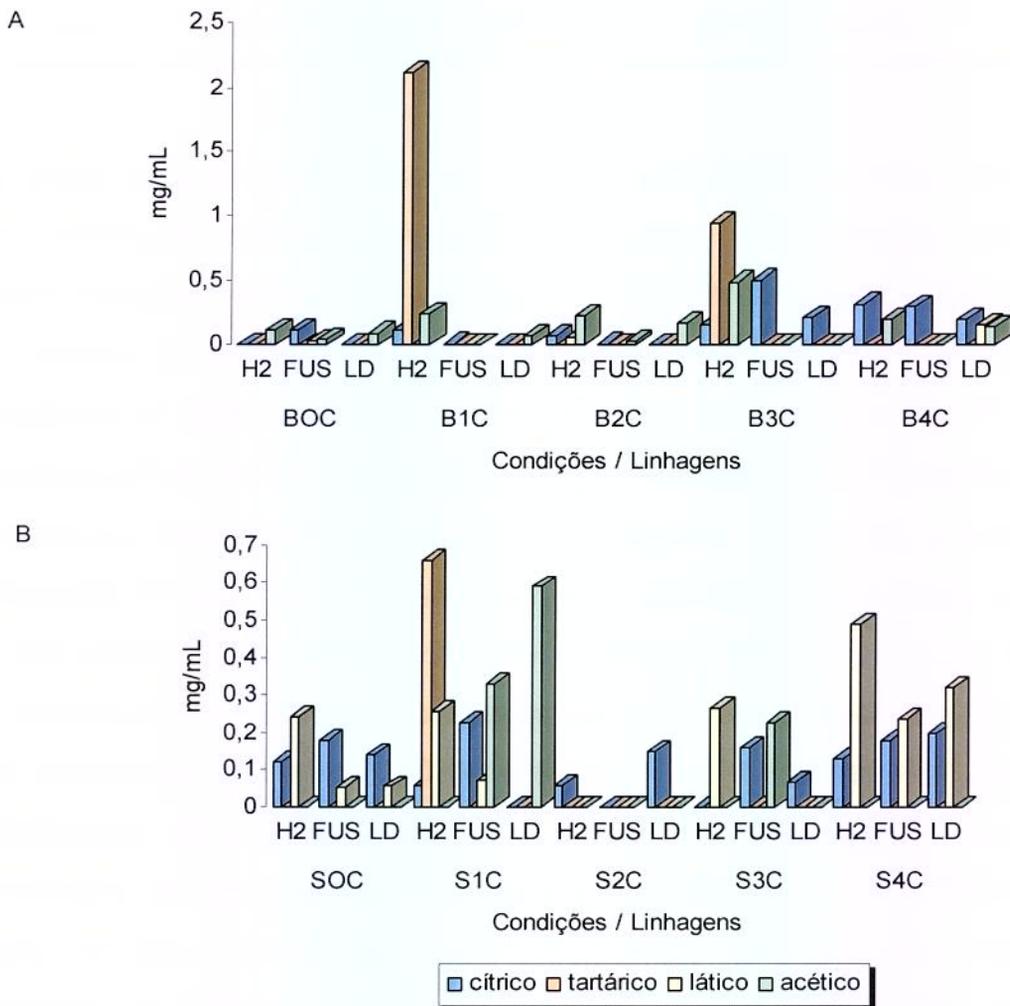


Figura 42. Produtos de fermentação produzidos pelas linhagens crescidas por 30 dias sob condição microaeróbica em meio nutriente nas seguintes condições: 0C – sem cisteína; 1C - 0,025% de cisteína; 2C - 0,05% de cisteína; 3C - 0,1% de cisteína e 4C - 0,15% de cisteína, contendo: A) bagaço de cana (B) ou B) serragem (S) na concentração final de 4%. Linhagens: basidiomiceto H2, *F. oxysporum* (FUS) e *G. terrestre* (LD).

As linhagens apresentaram produção de ácido acético após crescimento em meio contendo bagaço de cana sem adição de cisteína (Figura 42A). Todas as linhagens quando crescidas em meio contendo serragem (Figura 42B) sem cisteína apresentaram produção de ácido cítrico e láctico. Após adição de 0,025% de cisteína verificou-se a produção de ácido tartárico pela linhagem H2 (0,65 mg/mL), e produção de ácido acético pelas linhagens *F. oxysporum* (FUS) (0,4 mg/mL) e *G. terrestre* (LD) (0,8 mg/mL) quando crescidas em meio contendo serragem como fonte de carbono (Figura 42B). Com adição de 0,05% de cisteína as linhagens H2 (0,08 mg/mL) e *G. terrestre* (LD) (0,2 mg/mL) apresentaram produção de ácido acético quando cultivadas em meio contendo bagaço de cana como fonte de carbono (Figura 42A). A linhagem H2 apresentou maior produção de ácido tartárico (0,6 mg/mL) em meio contendo bagaço de cana como fonte de carbono com adição de 0,10% de cisteína (Figura 42A). As linhagens *F. oxysporum* (FUS) (0,05 mg/mL) e *G. terrestre* (LD) (0,025 mg/mL) apresentaram maior produção de ácido cítrico quando crescidas em meio contendo serragem com 0,10% de cisteína (Figura 42B). Após adição de 0,15% de cisteína, pode-se verificar que em meio contendo serragem todas as linhagens apresentaram maior produção de ácido láctico, quando comparada com meio sem cisteína, sendo a produção máxima obtida pela linhagem H2 (0,5 mg/mL) (Figura 42B).

O etanol foi produzido pela linhagem H2 em diferentes condições de cultivo como pode ser observado na Tabela 14. A maior produção de etanol foi obtida após cultivo da linhagem H2 em meio contendo bagaço de cana (4%) como fonte de carbono e sem adição de cisteína.

Tabela 14: Produção de etanol após crescimento das linhagens em meio nutriente contendo diferentes concentrações de cisteína.

Linhagem	Fonte de Carbono	Concentração de cisteína	mg/mL
H2	Bagaço de cana 4%	Sem cisteína	0,125
H2	Bagaço de cana 4%	0,15 % de cisteína	0,076

De acordo com DUBE (1990), altas concentrações de cisteína podem alterar a produção de certos produtos de fermentação. Analisando os resultados observou-se que em meio contendo bagaço de cana como fonte de carbono a presença de cisteína no meio de cultivo teve efeito negativo sob a produção de etanol pelas linhagens H2 e *F. oxysporum* (FUS). Apenas a linhagem H2 apresentou produção de etanol em meio com adição de cisteína (0,15%). A mesma linhagem apresentou produção de ácido tartárico em meio contendo 0,025% e 0,10% de cisteína. O ácido láctico foi produzido por todas as linhagens após adição de 0,15% de cisteína ao meio nutriente.

4.9. Crescimento microaeróbico em meio complemento, determinação das atividades lignocelulolíticas em reação e em gel (zimograma), produção de biomassa fúngica e produtos de fermentação

As Figuras 43-48 apresentam os resultados obtidos após cultivo das linhagens H2, *F. oxysporum* (FUS) e *G. terrestre* (LD) em meio contendo adição de MnO₂ e tween 80, e ausência de cisteína. Esta formulação foi baseada nos resultados obtidos na etapa 4.8. Para a concentração de 4% foram avaliados os crescimentos com 20, 30, 40, 60 e 90 dias. Quando utilizou-se concentrações maiores como, 10 e 20% testou-se apenas 60 e 90 dias.

4.9.1. Atividades enzimáticas

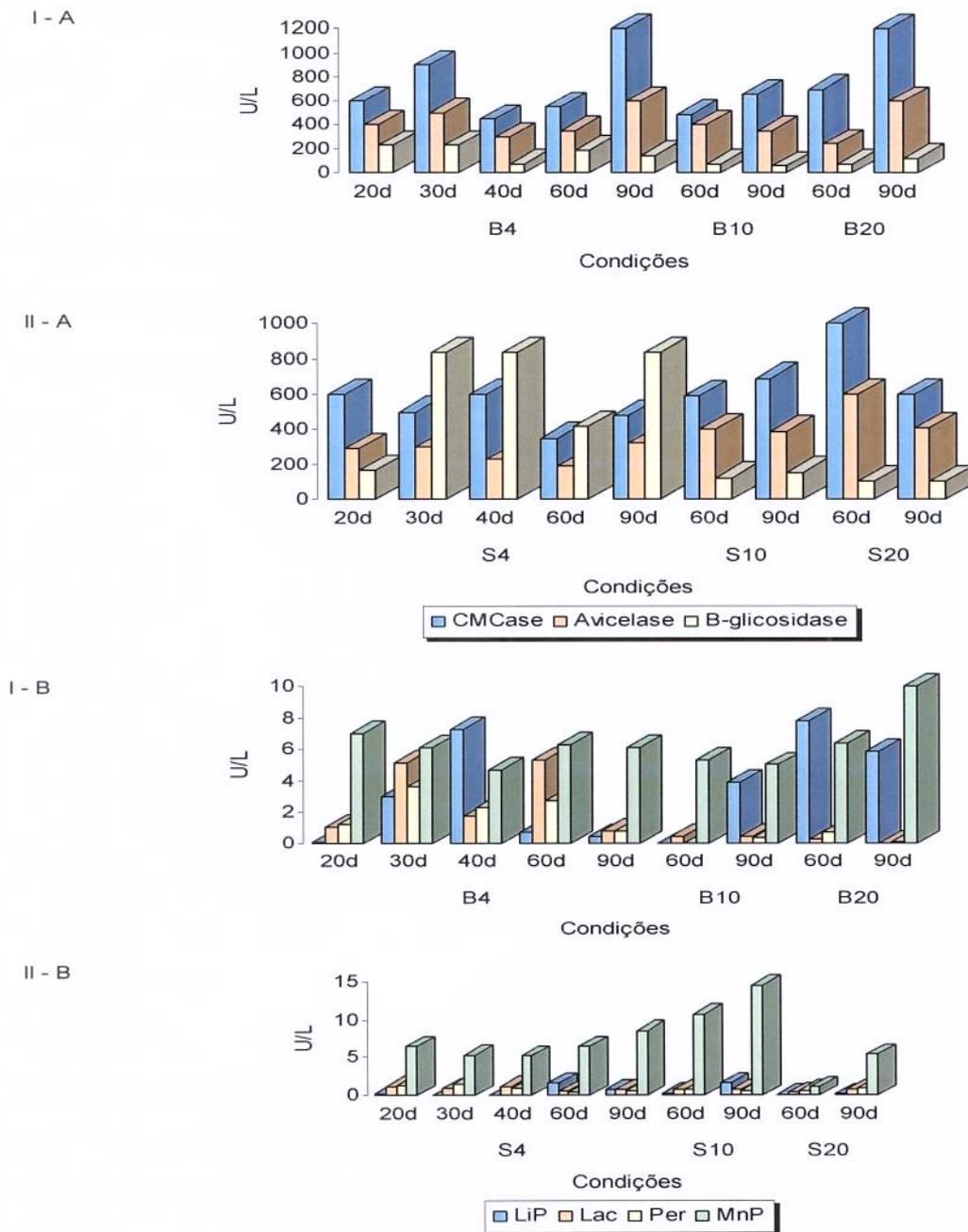


Figura 43. Atividades enzimáticas do basidiomiceto H2 quando crescido por 20, 30, 40, 60 e 90 dias (20d, 30d, 40d, 60d e 90d), sob condição microaeróbica em meio complemento contendo: I) bagaço de cana ou II) serragem nas concentrações de 4% (B4 e S4), 10% (B10 e S10) e 20% (B20 e S20). A – carboximetilcelulase (CMCase), avicelase e β -glicosidase, B – lignina peroxidase (LiP), lacase (Lac), peroxidase (Per) e manganês peroxidase (MnP).

Na Figura 43A verificou-se que a linhagem H2 apresentou produção de CMCase (1.200 U/L) após cultivo em meio contendo bagaço de cana 20% com 90 dias (Figura 43-IA), e atividade de β -glicosidase (1.000 U/L), quando cultivada em meio contendo serragem 4% como fonte de carbono, com 30, 40 e 90 dias (Figura 43-IIA). Observando-se a Figura 44B verificou-se que a mesma apresentou atividade de LiP (8 U/L), quando crescida em meio contendo bagaço de cana (20%) como fonte de carbono com 60 dias de cultivo (Figura 43-IB), e atividade de MnP (15 U/L), quando crescida em serragem 10% com 90 dias de cultivo (Figura 43-IIB).

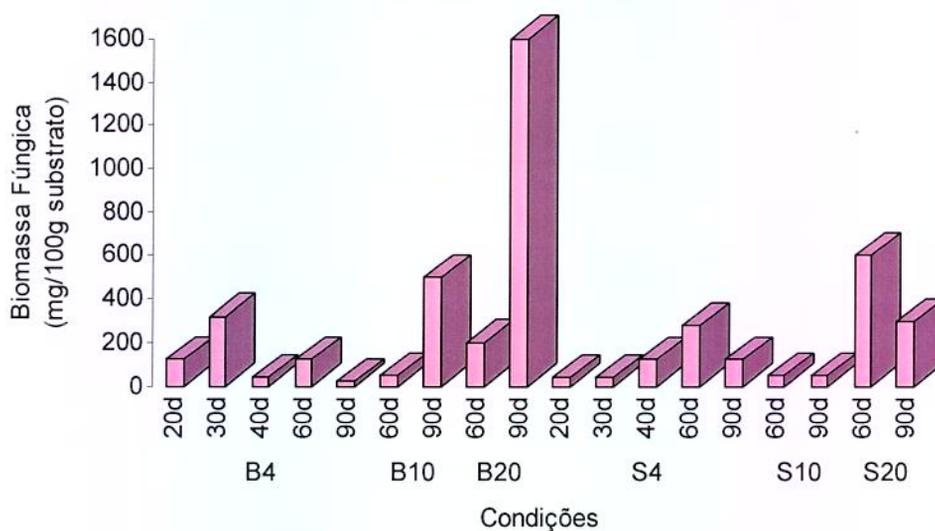


Figura 44. Biomassa fúngica do basidiomiceto H2 quando crescido por 20, 30, 40, 60 e 90 dias (20d, 30d, 40d, 60d e 90d), sob condição microaeróbica em meio complemento contendo bagaço de cana ou serragem nas concentrações de 4% (B4 e S4), 10% (B10 e S10) e 20% (B20 e S20).

De acordo com a Figura 44, a linhagem H2 apresentou 1.600 mg de biomassa fúngica/100 g de substrato quando cultivada em meio contendo bagaço de cana 20% com 90 dias de cultivo e 4% com 30 dias.

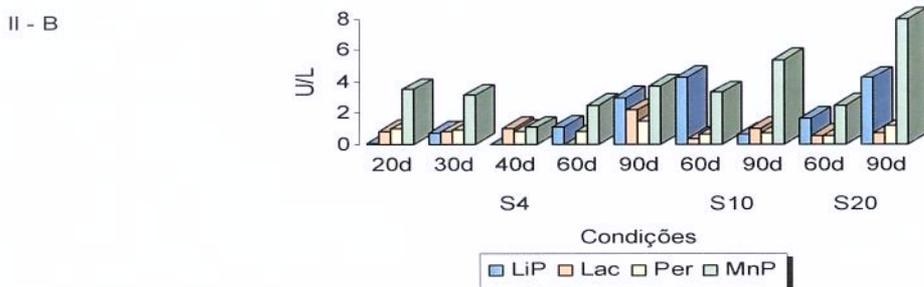
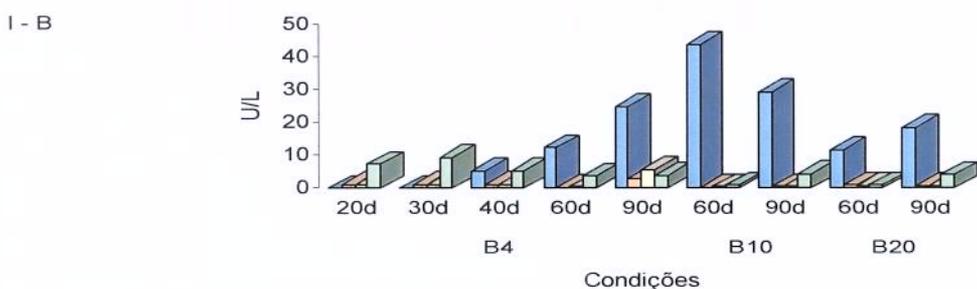
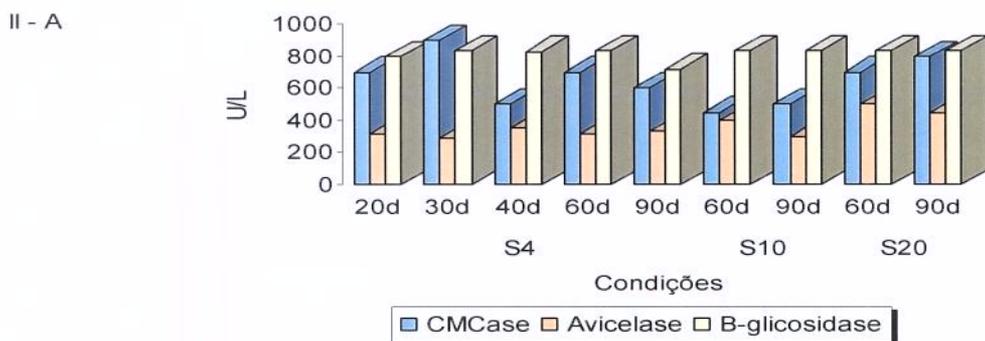
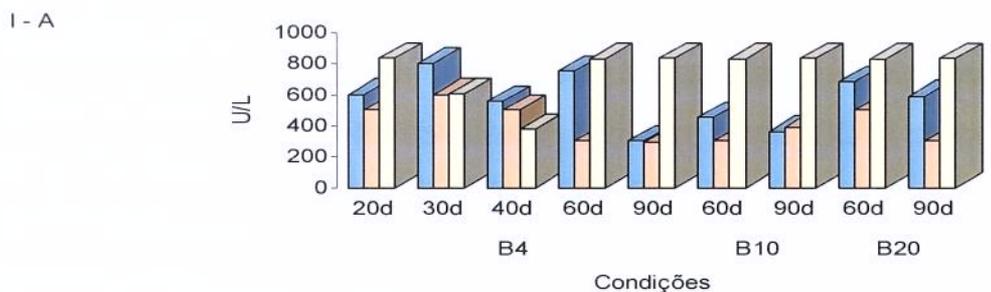


Figura 45. Atividades enzimáticas da linhagem *F. oxysporum* quando crescida por 20, 30, 40, 60 e 90 dias (20d, 30d, 40d, 60d e 90d), sob condição microaeróbica em meio complemento contendo: I) bagaço de cana ou II) serragem nas concentrações de 4% (B4 e S4), 10% (B10 e S10) e 20% (B20 e S20). A – carboximetilcelulase (CMCase), avicelase e β -glicosidase, B – lignina peroxidase (LiP), lacase (Lac), peroxidase (Per) e manganês peroxidase (MnP).

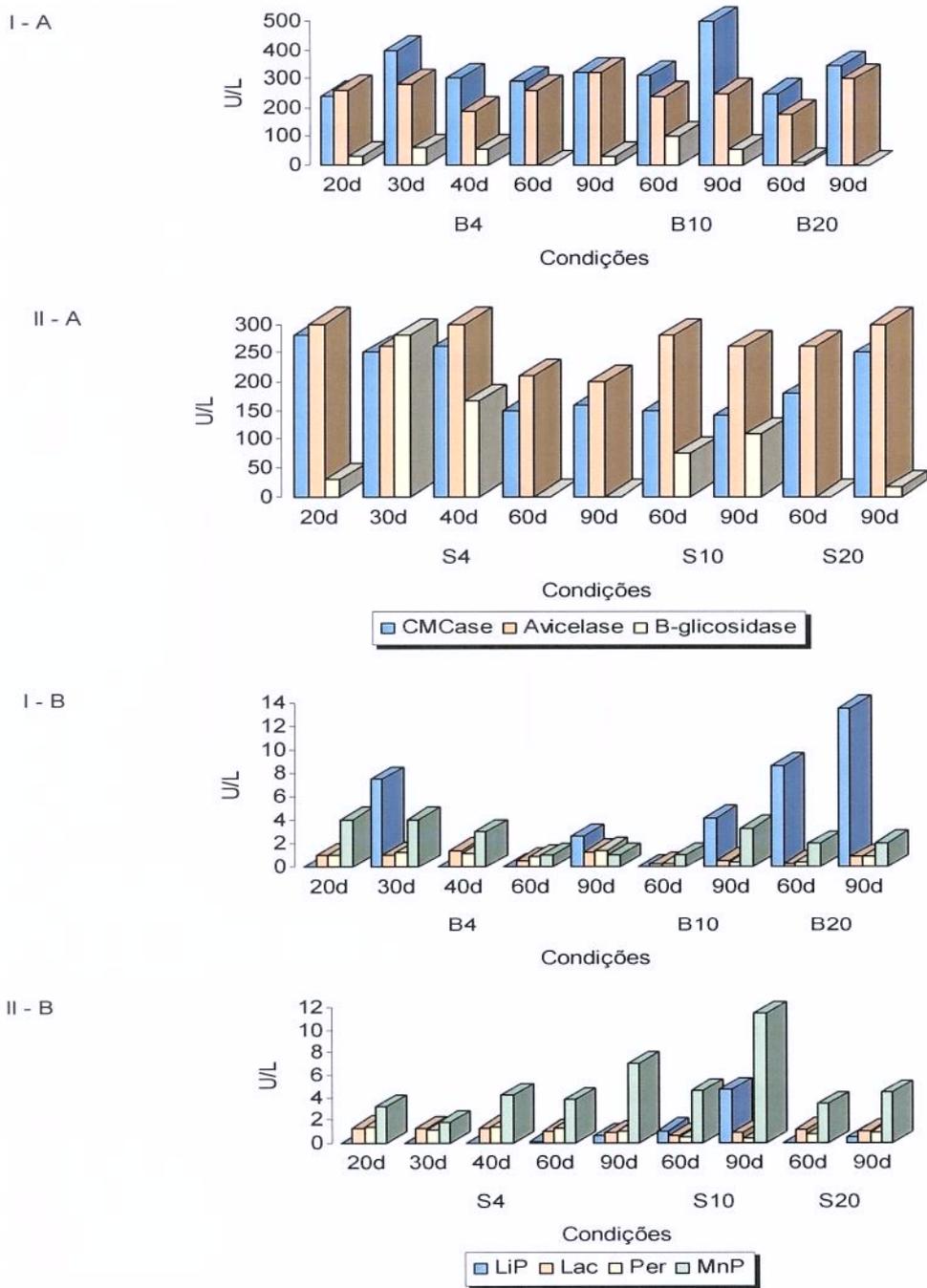


Figura 47. Atividades enzimáticas da linhagem *G. terrestris* quando crescida por 20, 30, 40, 60 e 90 dias (20d, 30d, 40d, 60d e 90d), sob condição microaeróbica em meio complemento contendo: I) bagaço de cana ou II) serragem nas concentrações de 4% (B4 e S4), 10% (B10 e S10) e 20% (B20 e S20). A – carboximetilcelulase (CMCase), avicelase e β -glicosidase, B – lignina peroxidase (LiP), lacase (Lac), peroxidase (Per) e manganês peroxidase (MnP).

A linhagem *G. terrestre* (LD) apresentou atividade de CMCase (500 U/L), com 90 dias de cultivo em meio contendo bagaço de cana como fonte de carbono na concentração de 10% (Figura 47-IA). De acordo com a Figura 47B pode-se verificar que a linhagem *G. terrestre* (LD) apresentou produção de todas as enzimas ligninolíticas nas diferentes condições testadas. A produção máxima de LiP (14 U/L), ocorreu com 90 dias de crescimento em meio contendo bagaço de cana na concentração de 20% (Figura 47-IIB).

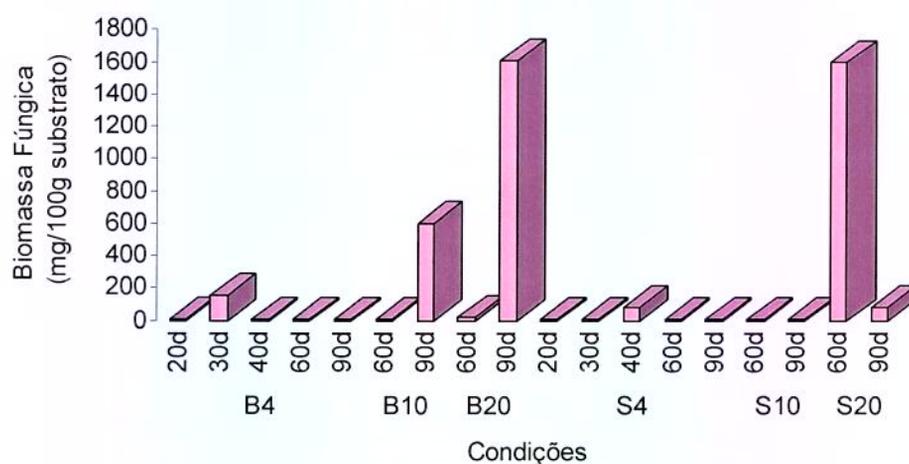


Figura 48. Biomassa fúngica da linhagem *G. terrestre* quando crescida por 20, 30, 40, 60 e 90 dias (20d, 30d, 40d, 60d e 90d), sob condição microaeróbica em meio complemento contendo bagaço de cana ou serragem nas concentrações de 4% (B4 e S4), 10% (B10 e S10) e 20% (B20 e S20).

Na Figura 48, pode-se verificar que o valor máximo de proteína (1.600 mg/100 g substrato), foi obtido com 90 dias de cultivo em meio contendo bagaço de cana na concentração de 20%.

4.9.2. Determinação das bandas de atividade enzimática em gel

Após avaliação dos resultados obtidos no item 4.9.1 foi possível selecionar as linhagens que apresentaram as melhores atividades enzimáticas e em quais condições de cultivo isso ocorreu.

4.9.2.1. Lacase

As linhagens que apresentaram os melhores resultados da atividade de lacase, apresentados nas Figuras 43B, 45B e 47B foram escolhidas para a realização do zimograma desta enzima (Tabela 15). Para este teste foi utilizada amostra nativa (conforme item 3.12)

Tabela 15: Amostras utilizadas no zimograma da enzima lacase

Linhagem	Fonte de Carbono	Dias de cultivo
<i>F. oxysporum</i> (FUS)	Serragem 4%	90 dias
<i>F. oxysporum</i> (FUS)	Bagaço de cana 4%	90 dias
<i>G. terrestre</i> (LD)	Serragem 4%	20 dias
<i>G. terrestre</i> (LD)	Serragem 4%	30 dias
<i>G. terrestre</i> (LD)	Serragem 4%	40 dias
H2	Bagaço de cana 4%	20 dias
H2	Bagaço de cana 4%	20 dias
H2	Bagaço de cana 4%	30 dias
H2	Bagaço de cana 4%	60 dias
H2	Bagaço de cana 4%	90 dias

Visualizando-se os géis foi possível verificar o aparecimento de banda azul mais intensa com a linhagem *F. oxysporum* (FUS) em meio contendo serragem (4%) e bagaço de cana (4%) com 90 dias de crescimento, e linhagem H2 em meio contendo serragem (4%) com 30, 60 e 90 dias, indicando a presença de atividade de lacase.

4.9.2.2. Manganês Peroxidase

As linhagens que apresentaram os melhores resultados da atividade de manganês peroxidase, apresentados nas Figuras 43B, 45B e 47B foram escolhidas para a realização do zimograma desta enzima (Tabela 16). Para este teste foi utilizada amostra nativa (conforme item 3.12).

Tabela 16: Amostras utilizadas no zimograma da enzima manganês peroxidase

Linhagem	Fonte de Carbono	Dias de cultivo
<i>F. oxysporum</i> (FUS)	Bagaço de cana 4%	20 dias
<i>F. oxysporum</i> (FUS)	Bagaço de cana 4%	30 dias
<i>F. oxysporum</i> (FUS)	Bagaço de cana 4%	40 dias
<i>F. oxysporum</i> (FUS)	Serragem 20%	90 dias
H2	Serragem 4%	90 dias
H2	Serragem 10%	60 dias
H2	Bagaço de cana 10%	60 dias
H2	Serragem 10%	90 dias
H2	Bagaço de cana 20%	90 dias
<i>G. terrestre</i> (LD)	Serragem 10%	90 dias

Visualizando-se os géis foi possível verificar o aparecimento de banda verde mais intensa com a linhagem *F. oxysporum* (FUS) em meio contendo bagaço de cana (4%) com 30 e 40 dias de crescimento, e linhagem H2 em meio contendo serragem (10%) e em meio contendo bagaço de cana (20%) 90 dias de cultivo, indicando a presença da enzima manganês peroxidase.

4.9.2.3. β -glicosidase

As linhagens que apresentaram os melhores resultados da atividade de β -glicosidase, apresentados nas Figuras 43A, 45A e 47A foram escolhidas para a realização do zimograma desta enzima (Tabela 15). Para este teste foi utilizada amostra nativa (conforme item 3.12).

Tabela 15: Amostras utilizadas no zimograma da enzima β -glicosidase

Linhagem	Fonte de Carbono	Dias de cultivo
H2	Serragem 4%	30 dias
H2	Serragem 4%	34 dias
H2	Serragem 4%	60 dias
<i>F. oxysporum</i> (FUS)	Bagaço de cana 20%	60 dias
<i>F. oxysporum</i> (FUS)	Bagaço de cana 4%	90 dias
<i>F. oxysporum</i> (FUS)	Serragem 10%	60 dias
<i>F. oxysporum</i> (FUS)	Serragem 10%	90 dias
<i>F. oxysporum</i> (FUS)	Bagaço de cana 20%	90 dias
<i>F. oxysporum</i> (FUS)	Serragem 20%	90 dias
<i>F. oxysporum</i> (FUS)	Serragem 4%	90 dias

Visualizando-se os géis foi possível verificar o aparecimento de banda amarela mais intensa com a linhagem *F. oxysporum* (FUS) em meio contendo bagaço de cana (10%) com 60 e 90 dias de crescimento, em meio contendo bagaço de cana (20%) e serragem (20%) com 90 dias de crescimento e linhagem H2 em meio contendo serragem (4%) com 30 e 40 dias de cultivo, indicando a presença da enzima β -glicosidase.

REZENDE et al. (2002), utilizaram bagaço de cana como substrato para produção de xilanase e carboximetilcelulase sob condição aeróbica pelo fungo *T. harzianum*. O máximo de atividade de xilanase (27 U/mL) e CMCase (0,26 U/mL) foi obtido em meio contendo bagaço de cana como fonte de carbono na concentração final de 14%, sendo que maiores concentrações de bagaço de cana (20 – 28%) diminuíram a produção das enzimas. De acordo com PERSON et al. (1991), é mais difícil extrair as enzimas tanto maior for a concentração do substrato, uma vez que as enzimas estão fortemente ligadas. Esta pode ser a explicação para diminuição da atividade das enzimas ligninolíticas em meio contendo bagaço de cana na concentração final de 20% pela linhagem *F. oxysporum* (FUS), estudada neste trabalho.

KERN (1990) observou que a adição de MnO_2 em culturas submersas do fungo *P.chrysosporium* aumentou a produção e estabilidade das ligninases. A adição de MnO_2 aumentou notavelmente a atividade de MnP (7 vezes maior que o controle sem adição do íon). Isto indica que o MnO_2 presente no meio de cultivo atua como indutor desta enzima (COUTO et al., 2000). Segundo LESTAN et al. (1993), a presença de tween 80 em culturas submersas do fungo *P.chrysosporium* aumentou a produção da enzima MnP (2 vezes maior que o controle sem adição de tween). Os resultados obtidos neste trabalho estão de acordo com aqueles reportados na literatura, pois foi possível verificar que as

linhagens estudadas apresentaram maior produção de atividade enzimática após a utilização do meio complemento (adição de MnO_2 e tween 80, e ausência de cisteína), quando comparados com os resultados obtidos utilizando-se meio sem adição destes compostos. Estes suplementos podem também ter atuado como indutores do sistema enzimático das linhagens estudadas (H2, *F. oxysporum* e *G. terrestre*), conforme os resultados obtidos nos estudos de COUTO et al. (2000).

O crescimento de um fungo em um substrato insolúvel como a celulose é muito mais complicado que o crescimento em um simples carboidrato solúvel. Os resíduos agro-industriais (bagaço de cana e serragem) são substratos complexos os quais são degradados em açúcares solúveis e finalmente em glicose por uma série de reações catalizadas por um complexo de enzimas. Muitas destas reações estão envolvidas na mudança de forma de celuloses mais cristalinas e resistentes para formas menos cristalinas e mais susceptíveis. Somente os produtos finais solúveis podem ser absorvidos pelos fungos e utilizados para o crescimento. Na natureza os fungos crescem inicialmente em material solúvel, após o consumo deste material, a hemicelulose e a celulose amorfa são atacadas. Somente quando todos os outros substratos são consumidos que as enzimas são produzidas para degradar a celulose cristalina (MANDELS, 1986). Este fato explica os diferentes comportamentos encontrados para cada enzima produzida nos substratos utilizados neste trabalho pelas linhagens avaliadas, onde maiores atividades das enzimas celulolíticas foram obtidas em meio contendo bagaço de cana pelas linhagens H2 e *F. oxysporum* (FUS). Maiores atividades das enzimas ligninolíticas foram obtidas em meio contendo serragem pelas linhagens H2 e *G. terrestre* (LD).

4.9.3. Produtos de Fermentação

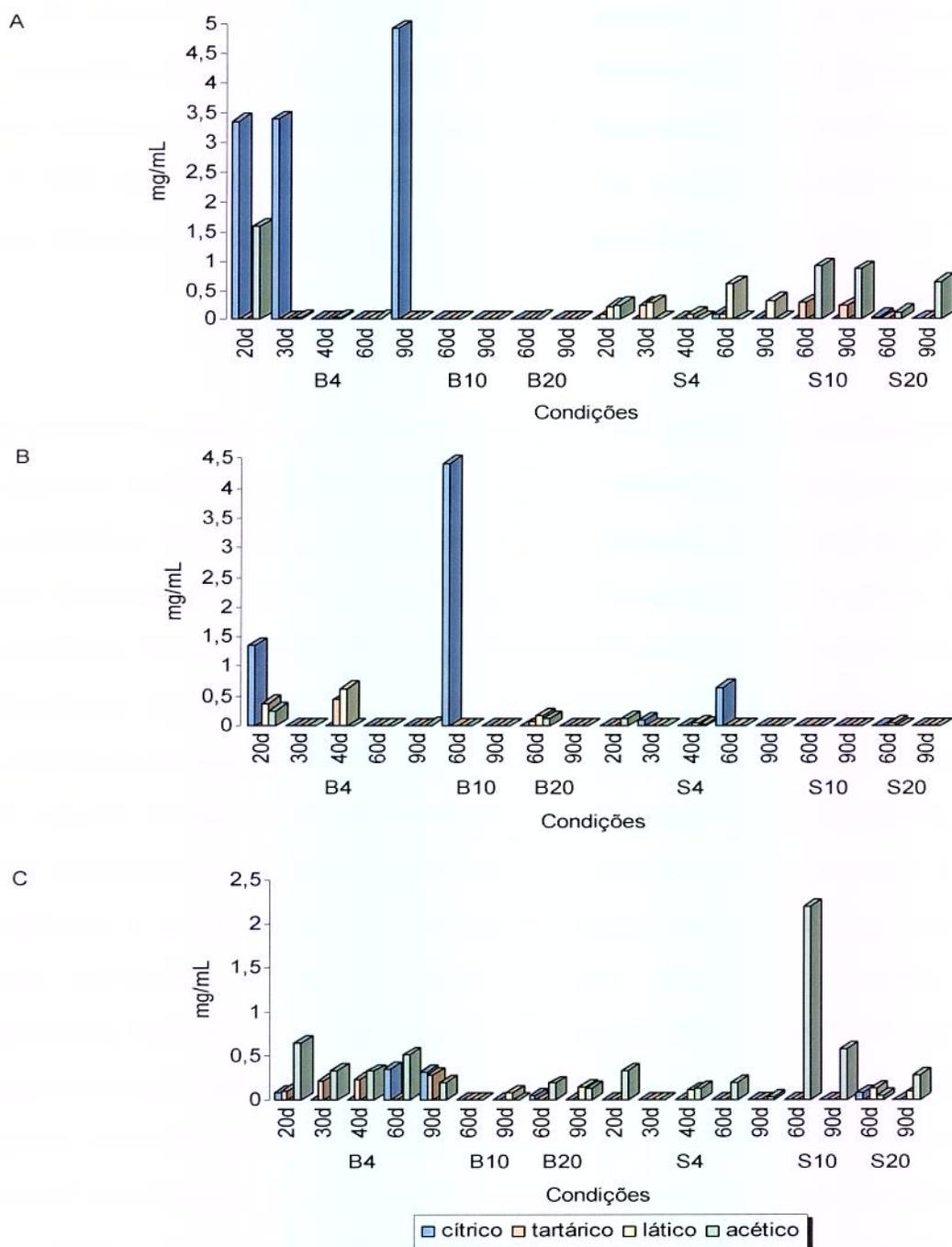


Figura 49. Produtos de fermentação produzidos pelas linhagens quando crescidas por 20, 30, 40, 60 e 90 dias (20d, 30d, 40d, 60d e 90d), sob condição microaeróbica em meio complemento contendo bagaço de cana nas concentrações de 4% (B4), 10% (B10) e 20% (B20) ou serragem nas concentrações de 4% (S4), 10% (S10) e 20% (S20). Linhagens: A) basidiomiceto H2, B) *F. oxysporum* (FUS) e C) *G. terrestre* (LD).

Na Figura 49A observou-se que a linhagem H2 apresentou produção de ácido cítrico (5,0 mg/mL), em meio contendo bagaço de cana na concentração de 4% com 90 dias de crescimento e produção de ácido láctico (0,6 mg/mL), após crescimento em meio contendo serragem (4%) com 60 dias de cultivo.

De acordo com a Figura 49B a linhagem *F. oxysporum* (FUS) apresentou produção de ácido cítrico (4,8 mg/mL), em meio contendo bagaço de cana na concentração de 10%, com 60 dias de cultivo e produção de ácido cítrico (0,6 mg/mL), quando cultivada em meio contendo como fonte de carbono serragem na concentração de 4%, com 60 dias de crescimento.

A linhagem *G. terrestre* (LD) apresentou produção de ácido acético após crescimento em meio contendo bagaço de cana (4%) em todos os dias de cultivo. O ácido acético (2,3 mg/mL) foi produzido na maioria das condições testadas pela linhagem *G. terrestre* (LD) sendo o máximo produzido em meio contendo serragem (10%) com 60 dias de crescimento (Figuras 59C e 50).

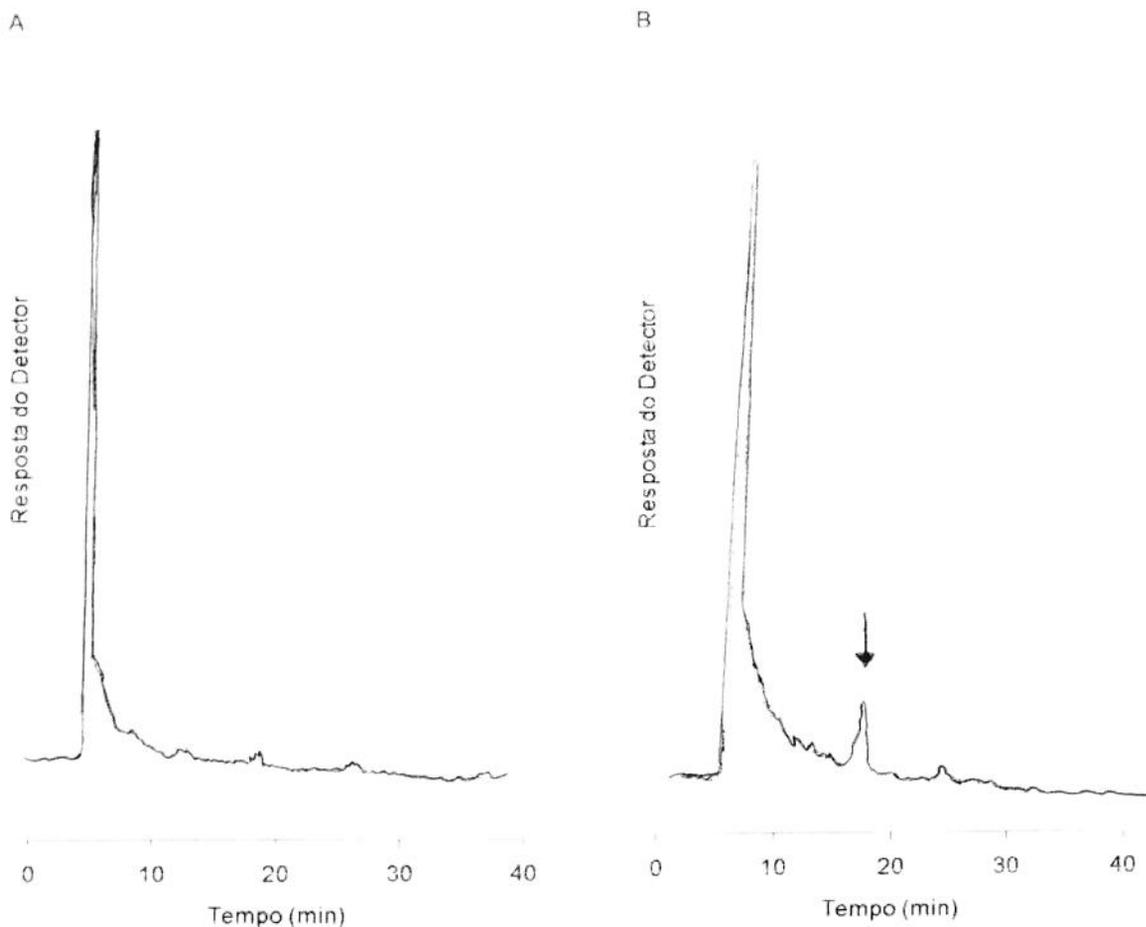


Figura 50. Perfil cromatográfico da produção de ácido acético quando a linhagem *G. terrestre* (LD) foi inoculada em meio contendo serragem 10%, 60 dias de cultivo, sob condição microaeróbica. A – Controle; B - linhagem *G. terrestre*. Condições cromatográficas: Coluna Supelcogel C61OH; Fase móvel: H_3PO_4 0,1%; Vazão: $0,5 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$; Detecção: UV 210 nm; Quantidade injetada: $20 \mu\text{L}$.

Os resultados de produção de etanol estão apresentados na Tabela 18 e na Figura 51, sendo que os melhores resultados obtidos para cada linhagem estão destacados em cinza. A linhagem H2 foi a que apresentou a melhor produção de etanol ($0,35 \text{ mg/mL}$) com 90 dias de crescimento em meio contendo serragem na concentração de 4%, seguida pela linhagem *F. oxysporum* (FUS) ($0,30 \text{ mg/mL}$) após crescimento em meio contendo bagaço de

cana (4%) com 30 dias de cultivo. A linhagem *F. oxysporum* (FUS) quando crescida em meio contendo serragem como fonte de carbono apresentou produção de etanol nas seguintes condições: 4% com 20, 30, 40, 60 e 90 dias; 10% com 60 e 90 dias de cultivo e 20% com 60 dias. Em meio contendo bagaço de cana (10%) a linhagem *G. terrestre* (LD) apresentou produção de etanol com 60 dias de crescimento (0,25 mg/mL).

Tabela 18: Produção de etanol após crescimento das linhagens em meio complemento.

Linhagem	Fonte de Carbono	Dias	mg/mL
H2	Bagaço de cana 4%	20 dias	0,147
H2	Bagaço de cana 4%	30 dias	0,186
H2	Bagaço de cana 4%	40 dias	0,072
H2	Bagaço de cana 4%	60 dias	0,046
H2	Bagaço de cana 20%	60 dias	0,033
<i>F. oxysporum</i> (FUS)	Bagaço de cana 4%	20 dias	0,055
<i>F. oxysporum</i> (FUS)	Bagaço de cana 4%	30 dias	0,30
<i>F. oxysporum</i> (FUS)	Bagaço de cana 4%	40 dias	0,091
<i>F. oxysporum</i> (FUS)	Bagaço de cana 4%	60 dias	0,083
<i>F. oxysporum</i> (FUS)	Bagaço de cana 4%	90 dias	0,032
<i>F. oxysporum</i> (FUS)	Bagaço de cana 10%	60 dias	0,087
<i>F. oxysporum</i> (FUS)	Bagaço de cana 20%	60 dias	0,037
<i>G. terrestre</i> (LD)	Bagaço de cana 4%	20 dias	0,084
<i>G. terrestre</i> (LD)	Bagaço de cana 4%	30 dias	0,063
<i>G. terrestre</i> (LD)	Bagaço de cana 4%	40 dias	0,055

Tabela 18 (cont.)

<i>G. terrestre</i> (LD)	Bagaço de cana 4%	60 dias	0,047
<i>G. terrestre</i> (LD)	Bagaço de cana 4%	90 dias	0,054
<i>G. terrestre</i> (LD)	Bagaço de cana 10%	60 dias	0,25
H2	Serragem 4%	30 dias	0,04
H2	Serragem 4%	40 dias	0,03
H2	Serragem 4%	90 dias	0,35
H2	Serragem 10%	60 dias	0,038
H2	Serragem 10%	90 dias	0,085
<i>F. oxysporum</i> (FUS)	Serragem 4%	20 dias	0,06
<i>F. oxysporum</i> (FUS)	Serragem 4%	30 dias	0,0947
<i>F. oxysporum</i> (FUS)	Serragem 4%	40 dias	0,04
<i>F. oxysporum</i> (FUS)	Serragem 4%	60 dias	0,0582
<i>F. oxysporum</i> (FUS)	Serragem 4%	90 dias	0,13
<i>F. oxysporum</i> (FUS)	Serragem 10%	60 dias	0,054
<i>F. oxysporum</i> (FUS)	Serragem 10%	90 dias	0,037
<i>G. terrestre</i> (LD)	Serragem 4%	40 dias	0,04
<i>G. terrestre</i> (LD)	Serragem 4%	60 dias	0,049
<i>G. terrestre</i> (LD)	Serragem 10%	60 dias	0,088

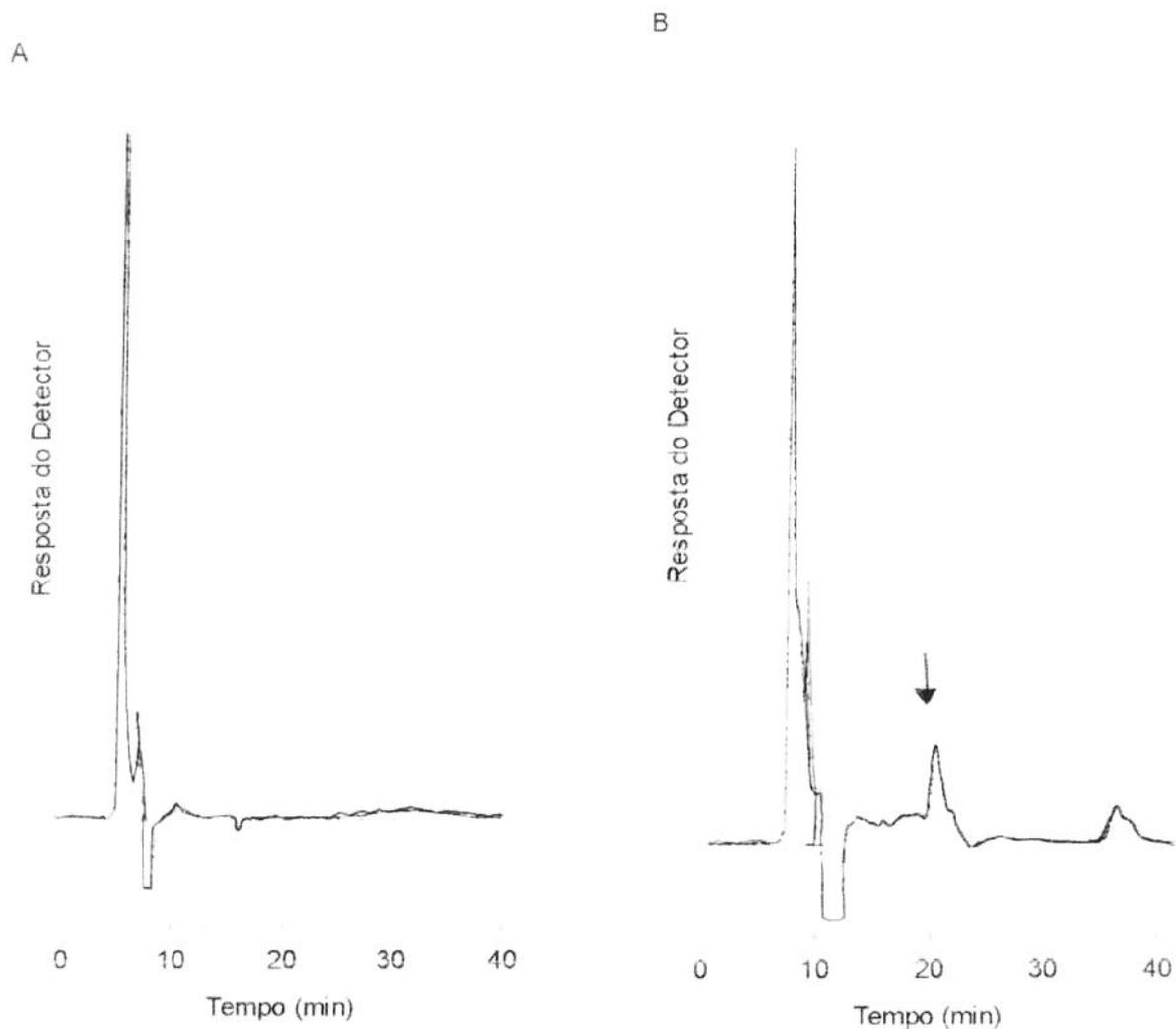


Figura 51. Perfil cromatográfico da produção de etanol quando a linhagem H2 foi inoculada em meio contendo serragem 4%, 90 dias de cultivo, sob condição microaeróbica. A – Controle; B - Basidiomiceto H2. Condições cromatográficas: Coluna Supelcogel C61OH; Fase móvel: H_3PO_4 0,1%; Vazão: $0,5 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$; Detecção: IR; Quantidade injetada: $20 \mu\text{L}$.

Foi relatado que *Fusarium oxysporum* possui capacidade de crescer sob diferentes condições de aeração, em meio contendo pentose e também de degradar celulose (CHRISTAKOPOULOS et al., 1991). A principal desvantagem apresentada por este fungo filamentoso é que seu processo de conversão e

fermentação da celulose e de seus produtos de hidrólise é lento. CHRISTAKOPOULOS (1995) estudou a influência de diferentes fontes de carbonos e fontes de nitrogênio na produção das enzimas carboximetilcelulase e β -glicosidase pelo microrganismo *F. oxysporum*. Em meio contendo bagaço de cana (2%) como fonte de carbono e fosfato de amônia como fonte de nitrogênio a linhagem produziu 25 U/mL de carboximetilcelulase e 2,1 U/mL de β -glicosidase, sob agitação. Estes resultados foram superiores aos obtidos neste trabalho onde, após ter crescido *F. oxysporum* em meio contendo bagaço de cana (4% e 20%) sob condição microaeróbica por 60 dias, essa linhagem apresentou 800 U/L (4%) e 700 U/L (10%) de carboximetilcelulase e 1.000 U/L (4%) e 1.000 U/L (20%) de β -glicosidase.

Após análise dos resultados descritos no item 4.9.3. foi possível observar que as linhagens apresentaram maior produção dos ácidos orgânicos e etanol nas diferentes condições avaliadas, isto se deve a influência dos nutrientes (MnO_2 e tween 80, e ausência de citeína), presentes no meio de cultivo utilizado, pode-se dizer que estes compostos podem ter exercido um efeito positivo na produção de ácidos orgânicos e etanol, assim como o efeito positivo destes compostos na produção enzimática.

5. CONCLUSÃO

➤ As linhagens H2, *F. oxysporum*, *G. terrestre*, LH5, F.1039 e F.870, apresentaram melhores resultados das atividades enzimáticas após cultivo em meio nutriente enquanto comparado com os meios peptona, levedura e extratos;

➤ Na concentração final de 2% as linhagens, apresentaram maior produção enzimática sob condição aeróbica enquanto comparada com condição microaeróbica;

➤ As linhagens H2, *F. oxysporum*, *G. terrestre* e LH5 apresentaram de uma forma geral maior produção enzimática após crescimento em meio contendo ácido lignosulfônico e xilana como fonte de carbono sob as condições de oxigenação testadas;

➤ Com relação a porcentagem de degradação de celulose e lignina, verificou-se que as linhagens foram capazes de degradar as diferentes fontes de carbono;

➤ Todas as linhagens cresceram nos substratos nas três condições avaliadas. Quando comparadas as três condições combinadas de oxigenação, verificou-se que na condição C (7 dias agitação e 14 dias microaeróbico) a maioria das linhagens apresentaram produção máxima de enzima;

➤ As linhagens H2, *F. oxysporum*, *G. terrestre*, *T. canadense* e LH5 apresentaram produção enzimática nas duas concentrações (4% e 10%) quando cultivadas em bagaço de cana ou serragem;

➤ Houve aumento na produção enzimática pelas linhagens após adição de tween 80 e crescimento nutrientes suplementares (ex. MnO_2) ao meio de cultivo;

➤ A presença de cisteína pode ter efeito negativo na produção dos ácidos orgânicos e etanol;

➤ Foi possível verificar que as linhagens apresentaram melhor produção enzimática e produtos de fermentação devido adição de tween 80, MnO_2 e ausência de cisteína no meio de cultivo, sob condição microaeróbica, nas

diferentes concentrações de substrato. A linhagem H2 apresentou máximo de atividade CMCase (1200 U/L, bagaço de cana 20%, 90 dias), MnP (15 U/L, serragem 10%, 90 dias) e lacase (5 U/L, bagaço de cana 4%, 60 dias). A linhagem *F. oxysporum* apresentou atividade máxima de β -glicosidase (1000 U/L, em serragem e bagaço de cana), LiP (45 U/L bagaço de cana 10%, 60 dias). A linhagem *G. terrestre* apresentou maior produção de ácido acético (2,3 mg/mL, serragem 10%, 60 dias).

➤ Os resultados aqui reportados indicam que estas linhagens tem alto potencial de degradação de material lignocelulósico, convertendo estes resíduos agro-industriais em bioprodutos importantes.

6. BIBLIOGRAFIA

- AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS – ASTM. Standard practice for determining resistance of synthetic polymeric materials to fungi. G21-90, 1990.
- ARORA, D.J. & GILL, P.K. Effects of various media and supplements on laccase production by some white rot fungi. **Biores. Technol.** 77:89-91, 2001.
- ASTHER, M., CORRIEU, G. , DRAPON, R. & ODIER, E. Effect of tween 80 and oleic acid on ligninase by *Phanerochaete chrysosporium* INA-12. **Enz. Microb. Technol.** 9:245-249, 1987.
- BEGUIN, P. & AUBERT, J.P. Cellulases. In: **Encyclopedia of Microbiology**. J. Lederberg (ed.). Academic Press. New York, N.Y., vol.1. pp.467-477, 1992.
- BEGUIN, P. & AUBERT, J.P. The biological degradation of cellulose. **FEMS Microbiol. Rev.** 13:25-58, 1994.
- BHAT, M.K. & BHAT, S. Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications. **Biotechnol. Adv.** 15: 583-620, 1997.
- BHAT, M.K. Cellulase and related enzymes in biotechnology. **Biotechn. Adv.** 18:355-383, 2000.
- BLANCHETTE, R.A. A review of microbial deterioration found in archaeological wood from different environment. **Intern. Biodeter. Biodegrad.** 46:189-204, 2000.
- BORCHERT, A. & BUCHHOLZS, K. Enzymatic hydrolysis of cellulosic materials. **Process Biochem.** 173-180, 1987.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of micrograms quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.** 72, 248-254, 1976.

- BRIGHAM, J., ADNEY, W.S. & HIMMEL, M.E. Hemicellulases: Diversity and applications, in **Handbook on bioethanol: production and optimization**, Chapter 7, Wyman, C.E., ed., Taylor and Francis, USA, pp:119-142, 1996.
- BUSWELL, J. A. & ODIER, E. Lignin biodegradation. **Crit. Rev. Biotechnol.** 6:1-60, 1987.
- BUSWELL, J. A., CAI, Y. & CHANG, S. Effect of nutrient nitrogen and manganese on manganese peroxidase and laccase production by *Lentinula edodes*. **FEMS Microbiol Letters.** 128:81-88, 1995.
- CAI, W. & TIEN, M. Lignin-degrading peroxidases of *Phanerochaete chrysosporium*. **J. Biotechnol.** 30:70-90, 1993.
- CAMERON, M. D.; TIMOFEEVSKI, S. & AUST, S. D. Enzymology of *Phanerochaete chrysosporium* with respect to the degradation of recalcitrant compounds and xenobiotics. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 54:751-758, 2000.
- CAVENDON, K., LESCHINE, S.B. & CANALE-PAROLA, E. Cellulase system of a free living mesophilic *Clostridium* (strain 7) **J. Bacteriology** 172:4222-4230, 1990.
- CHRISTAKOPOULOS, P.; MACRIS, B.J. & KEKOS, D. Direct conversion of straw to ethanol by *Fusarium oxysporum*: effect of cellulase and β -glucosidase. **Enz. Microbiol. Technol.** 13: 272-274, 1991.
- CHRISTAKOPOULOS, P.; KEKOS, D.; KOLISIS, F.N. & MACRIS, B.J. Controlling simultaneous production of endoglucanase and β -glucosidase by *Fusarium oxysporum* in submerged culture. **Biotechnol. Lett.** 17:883-888, 1995.
- COLLINS, P.J., FIELD, J.A. TEUNISSEN, P. & DOBSON, A.D.W. Stabilization of lignin peroxidases in white rot fungi by tryptophan. **Appl. Environ. Microbiol.** 63:2543-2548, 1997.

- COUGHLAN, M.P. Enzymic hydrolysis of cellulose: an overview. **Bioresource Technology**. 39:107-115, 1992.
- COUGHLAN, M.P. & HAZLEWOOD, G.P. **Hemicellulose and Hemicelulases**, Portland Press, London, 152 p., 1993.
- COUTO, S.R., RIVELA, I., MUNOZ, M.R & SANROMAN, A.. Stimulation the ligninolytic enzyme production and the ability to decolourise Poly R-478 in semi-solid-state cultures of *Phanerochate chrysosporium*. **Biores. Technol.** 74:159-164, 2000.
- DE-JONG, E., CAZEMIER, A. E., FIELD, J. A. & BONT, J. A. M. Physiological role of chlorinated aryl alcohols biosynthethized *de novo* by the white rot fungus *Bjerkandera* sp. strain BOS55. **Appl. Environ. Microbiol.** 60: 271 - 277, 1994.
- DEMIRBRAS, A. Biomass resource facilities and biomass conversion processing for fuels and chemicals. **Energ. Convers. Manag.** 42:1357-1378, 2001.
- DESHPANDE, V., KESKAR, S., MISHRA, C. & RAO, M. Direct conversion of cellulose / hemicellulose to ethanol by *Neurospora crassa*. **Enz. Microb. Technol.** 8:149-152, 1986.
- DUBE, H. C. **An Introduction to Fungi**, Vikas Publishing House, 608p., 1990.
- DURRANT, L. R. Biodegradation of lignocellulosic materials by soil fungi isolated under anaerobic conditions. **Intern. Biodeter. Biodegrad.** 189–195, 1996a.
- DURRANT, L.R. Ethanol production from cellulase by two lignocellulolytic soil fungi. **Appl. Bioch. and Biotechn.** 57/58:399-406, 1996b.
- DURRANT, L. R.; CANALE-PAROLA, E. & LESCHINE, S. B. Facultatively anaerobic cellulolytic fungi from soil. *In: The Significance and Regulation of Soil Biodiversity*. H.P. Collins, G.P. Robertsons e M.J. Klug (eds). Kluwer Academic. The Netherlands, pp.161-167, 1995.

- EGGERT, C., TEMP, U. & ERIKSSON, K.E.L. The ligninolytic system of the white rot fungus *Pyconoporus cinnabarinus*: Purification and characterization of the laccase. **Appl. Environ. Microbiol.** 62:1151-1158, 1996.
- ENARI, T. & PAAVOLA, M. Enzymatic hydrolysis of cellulose: is the current theory of the mechanisms of hydrolysis valid? **CRC - Critical Rev. in Biotech.** 5:67-87, 1987.
- ERIKSSON, K.-E. L., BLANCHETTE, R. A. & ANDER, P. Biodegradation of lignin. *In: Microbiol and enzymatic degradation of wood and wood components.* Springer-Verlag KG, Berlin. 407 p., 1990.
- FALCONI, F.A. Bioconversão de compostos fenólicos por fungos ligninolíticos. Campinas, Tese de Mestrado em Ciência de Alimentos – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 108 p., 1998.
- FENGEL, D. & WAGENER, G. **Wood: Chemistry, ultrastructure, reaction.** Walter de Gruyter, New York, 1983.
- FU, S.Y., YU, H. & BUSWELL, J.A., Effect of nutrient nitrogen and manganese peroxidase and laccase production by *Pleurotus sajor caju*. **FEMS Microbiol. Letters** 147:133-137, 1997.
- GLENN, J.K. & GOLD, M.H. Purification and characterization of an extracellular Mn (II)-dependent peroxidase from lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. **Arch. Biochem. Biophys.** 242:329-341, 1985.
- GLENN, J.K., MORGAN M.A. MAYFIEKD, M.B., KUWAHARA, M. & GOLD, M.H. An extracellular H₂O₂-requering enzyme preparation involved in lignin biodegradation by the white-rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 114:1077-1083, 1983.

- GOLD, M.H., WARIISHI, H. & VALLI, K. Extracellular peroxidases involved in lignin degradation by the white-rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. **ACS Symp. Ser.** 389:127-140, 1989.
- GONG, C.-S.; CHEN, L.F.; FLICKINGER, M.C. & TSAO, G.T. Conversion of the hemicellulose carbohydrates. **Adv. in Biochem. Eng.** 20:93-117, 1981a.
- GONG, C.-S.; MAUN, C.M. & TSAO, G.T. Direct fermentation of cellulose to ethanol by a cellulolytic filamentous fungus *Monilia* sp. **Biotech. Lett.** 3:77-82, 1981b.
- GUNNER, H.B. & ALEXANDER, M. Anaerobic growth of *Fusarium oxysporum*. **Journal of Microbiology**, 1309 - 1316, 1964.
- HAMMEL, K.E. & MOEN, M.A. Depolymerization of a synthetic lignin *in vitro* by lignin peroxidase. **Enzyme Microb. Technol.** 13:15-18, 1991.
- HARKIN, J.M. & OBST, J.R. Syringaldazine, an effective reagent for detecting laccase and peroxidase in fungi. **Experientia.** 29: 381-387, 1973.
- HIGUCHI, T. Biodegradation mechanism of lignin by white-rot basidiomycetes. **J. Biotechnol.** 30:1-8, 1993.
- HIGUCHI, T. Lignin biochemistry: biosynthesis and biodegradation. **Wood. Sci. Technol.** 24:23-63, 1990.
- KERN, H.W. Production and stability of lignin peroxidases of *Phanerochaete chrysosporium* cultivated in glycerol in the presence of solid manganese IV oxide. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 33:582-588, 1990.
- KIRK, T.K. & FARRELL, R.L. Enzymatic "combustion": the microbial degradation of lignin. **Annu. Rev. Microbiol.** 41:465-505, 1987.
- KIRK, T.K., CROAN, S., TIEN, M., MURTAGH, K.E. & FARRELL, R.L. Production of multiple ligninase by *Phanerochaete chrysosporium*: effect of selected

- growth conditions and use of a mutant strain. **Enzyme Microbiol. Technol.** 8:27-32, 1986.
- KNAPP, J.S. Biodegradation of celluloses and lignin. *In: Comprehensive Biotechnology* (M. ed.). Pergamon Press Inc., N.Y., vol. 3. pp. 835-846, 1985.
- KUBICEK, C.P. The cellulose proteins of *Trichoderma reesei*: Structures, multiplicity, mode of action and regulation of formation. **Adv. in Biochem. Engineering/Biotechnology.** 45:1-27, 1992.
- KUWAHARA, M., GLENN, J.K., MORGAN, M.A. & GOLD, M.H. Separation and characterization of two extracellular H₂O₂ dependent oxidases from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. **FEBS Lett.** 169:247-150, 1984.
- LACKNER, R.E., SREBOTNIK, E. & MESSNER, K. Oxidative degradation of high molecular weight chlorolignin by manganese peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 178:1092-1098, 1991.
- LEE, J. Biological conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. **J. Biotechnol.** 56:1-24, 1997.
- LESTAN, D., CERNILEC, M., STRANCAR, A. & PERDIH, A. Influence of some surfactants and related compounds on ligninolytic activity of *Phanerochaete chrysosporium*. **FEMS Microbiol. Lett.** 106:17-22, 1993.
- LIN, L-L. & THOMSON, J.A. An analysis of the extracellular xylanases and cellulases of *Butyrivibrio fibrisolvens* H17c. **Process Biochem.** 84:197-204, 1991.
- LINKO, M.; POUTANEN, K. E. VIIKARI, L. New Developments in the Application of Enzymes for Biomass Processing. **Enzyme Systems for**

- Lignocellulose Degradation.** (M. P. Coughlan ed.). pp.331-346. Elsevier-London., 1992.
- MANDELS, M. Cellulases. **Ann. Report. on Ferm. Process.** 5:35-73, 1982.
- McCARTHY, A.J. Lignocellulose degrading actinomycetes. **FEMS Microbiol. Rev.** 46:145-163, 1987.
- MESSNER, R. & KUBICEK, C.P. Carbon source control of cellobiohydrolase I and II formation by *Trichoderma reesei*. **Appl. Env. Microbiol.** 57:630-635, 1991.
- MILLER, G.L.R.; BLUM, R.; GLENNON, W. E. & BURTON, A.L. Measurement of Carborylcellulose Activity. **Anal. Biochem.** 2:127-132, 1960.
- MOUCHACCA, J. Thermophilic fungi: Biodiversity and taxonomic status **Crypt. Mycol.** 18:19-69, 1997.
- NIKOLOV, T., BAKALOVA, N., PETROVA, S., BENADOVA, R., SPASOV & KOLEV, D. An effective method for bioconversion of delignified waste-cellulose fibers from the paper industry with a cellulase complex, **Biores. Technol.** 71:1-4, 2000.
- NIKU-PAAVOLA, M.L., RANUA, M., SUURNAKKI, A. & KANTELINEN, A. **Biores. Technol.** 50:73-77, 1995.
- ORPIN, C. G. Genetic approaches to the improvement of lignocellulose degradation in the rumen. *In: Biochemistry and Genetics of Cellulose Degradation.* , J.-P. Aubert; P. BEGUIN, e J. Millet (eds). Academic Press. London and New York, FEMS Symposium 43:172-179, 1988.
- PANDEY, A., SOCCOL, C.R., NIGAM, P. & SOCCOL, V. New developments in solid state fermentation: I-bioprocesses and products. **Biores. Technol.** 74:69-80, 2000.

- PAVARINA, E.C. Estudo dos sistemas celulolítico e fermentativo de fungos microaeróbios facultativos. Campinas. Tese de Mestrado em Ciência de Alimentos - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 82p, 1997.
- PAVARINA, E.C., SETTE, L.D., ANAZAWA, T.A. & DURRANT, L.R. Enzymes produced by soil fungi following microaerobic growth on lignocellulosic materials. **Appl. Biochem. and Biotechnol.** 82:153-163, 1999.
- PAVARINA, E.C. & DURRANT, L.R. Growth of lignocellulosic-fermenting fungi on different substrates under low oxygenation conditions. **Appl. Biochem. and Biotechnol.** 2001a (no prelo)
- PAVARINA, E.C. & DURRANT, L.R. Efeito do Tween 80 no metabolismo de fungos microaeróbios capazes de degradar resíduos lignocelulósicos. **Anais do II Workshop sobre Biodegradação.** Embrapa. 2001b
- PERSON, I., TJERNELD, F., HAHN-HAGERDAL, B. Fungal cellulolytic enzyme production: A review. **Proc. Biochem.** 26:65-74, 1991.
- PHILIPPIDIS, G.P. in **Handbook on bioethanol: production and optimization**, Chapter 12, Wyman, C.E., ed., Taylor and Francis, USA, pp: 253-286, 1996.
- PITSON, S.M., SEVIOUR, R.J. & McDOUGALL, B.M. Purification and characterization of an extracellular B-glucosidase from filamentous fungi *Acremonium persicium* and its probable role in B-glucan degradation. **Enz. Microbiol. Technol.** 21:182-190, 1997.
- POHLSCHRÖDER, M., LESCHINE, S.B. & CANALE-PAROLA, E. Multicomplex cellulase-xylanase system of *Clostridium papyrosolvens* C7. **J. Bacteriology** 176:70-76, 1994.
- RAGHUKUMAR, C., D'SOUZA, T.M., THORN, R.G. & REDDY, C.A. Lignin modifying enzymes of *Flavodon flavus*, basidiomycete isolated from a coastal marine environment. **Appl. Environ. Microbiol.** 65:2103-2111, 1999.

- REINHAMMAR, B. Laccase. *In: Copper Proteins and Copper Enzymes*, R. Lontie (ed.), Boca Raton, CRC Press, 3: 2 - 35, 1984.
- REZENDE, M.I., BARBOSA, A.M., VASCONCELOS, A.F.D. & ENDO, A.-S. Xylanase production by *Trichoderma harzianum* rifai by solid state fermentation on sugar cane bagasse. **Braz. J. Microbiol.** 33(1):1-11, 2002.
- SETTE, L.D. Estudo do sistema ligninolítico produzido por fungos sob diferentes condições de oxigenação. Campinas. Tese de mestrado em Ciência de Alimentos – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 82 p, 1997.
- SHOSEYOV, O & DOI, R.H. Essential 170 KDa subunit for degradation of crystalline cellulose by *Clostridium cellulovorans* cellulose. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 87:2192-2195, 1990.
- SINGH, A. & KUMAR, P.K.R. *Fusarium oxysporum*: Status in bioethanol production. **Crit. Rev. in Biotechnol.** 11:129-147.
- STERNBERG, D. Production of cellulase by *Trichoderma*. **Biotechn. Bioeng. Symp.** 6:35 –53, 1976.
- SZKLARZ, G.D., ANTIBUS, R.K., SINSABAUGH, R.L. & LINKINS, A.E. Production of phenol - oxidases and peroxidases by wood-rotting fungi. **Mycol.** 81: 234 - 240, 1989.
- TEUNISSEN, M.J. & OP DEN CAMP, H.J. Anaerobic fungi and their cellulolytic and xylanolytic enzymes. **Antonie Van Leeuwenhoek.** 63:63 -76, 1993.
- TEUNISSEN, M.J. KORT, G.V.M., OP DEN CAMP, H.J., VELT, J.H.H. Production of cellulolytic and xylanolytic enzymes during growth of the anaerobic fungus *Piromyces* sp. on different substrates. **Journ. Gen. Microbiol.** 138:1657-1664, 1992.

- THURSTON, C. F. The structure and function of fungal laccases. **Microbiol.** 140:19-26, 1994.
- TIEN, M. & KIRK, T.K. Lignin-degrading enzyme from the hymenomycete *Phanerochaete chrysosporium* burds. **Science.** 221: 661-663, 1983.
- TIEN, M & KIRK, T.K. Lignin-degrading enzyme from *Phanerochaete chrysosporium*: purification, characterization, and catalytic properties of a unique H₂O₂-requiring oxygenase. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 81:2280 - 2284, 1984.
- TUOMELA, M., VIKMAN, M., HATAKKA, A., ITAVAARA, M. Biodegradation of lignin in a compost environment: a review. **Biores. Technol.** 72:169-173, 2000.
- TUOR, U., WARIISHI, H., SCHOEMAKER, H.E. & GOLD, M.H. Oxidation of phenolic arylglycerol- β -aryl ether lignin model compounds by manganese peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*: oxidative of an α -carbonyl model compound. **Biochem.** 31: 4986 - 4995, 1992.
- TUOR, U., WINTERHALTER, K., & FIECHTER, A. Enzymes of white-rot fungi involved in lignin degradation and ecological determinants for wood decay. **J. Biotechnol.** 41:1-17, 1995.
- UENG, P.P. & GONG, C.S. Ethanol production from pentoses and sugar cane bagasse hemicellulose hydrolysate by *Mucor* and *Fusarium* species. **Enz. Microb. Technol.** 4:169-171, 1982.
- VALLI, K., WARIISHI, H. & GOLD, M.H Degradation of 2,7-dichlorodibenzo-p-dioxin by the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. **J. Bacteriol.** 174: 2131 - 22137, 1992.
- VAN SOEST, P.J. Use of detergents in the analysis of fibrous feed II. A rapid method for the determination on fiber and lignin. **J. Assoc. Off. Analyt. Chem.** 46:829-835, 1963.

- VAN SOEST, P.J. & WINE, R.H. Use of detergents in the analysis of fibrous feed IV. Determination of plant cell wall constituents. **J. Assoc. Off. Analyt. Chem.** 50:550-555, 1967.
- WARIISHI, H. & GOLD, M.H. Lignin peroxidase compound III: mechanism of formation and decomposition. **J. Biol. Chem.** 265:2070-2077, 1991.
- WARIISHI, H., VALLI, K. & GOLD, M.H. Manganese (II) oxidation by manganese peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*: kinetic mechanism and role of chelators. **J. Biol. Chem.** 267: 23688 - 23695, 1992.
- WILLIAMS, A.G. & ORPIN, C.G. Polysaccharide-degrading enzymes formed by anaerobic rumen fungi grown on a range of carbohydrate substrates. **Can. Journ. Microbiol.** 33:418-426, 1987.
- WOOD, T.M. & McCRAE, S.I. **Advances in Chemistry Series**. R. F. Gould (ed.). American Chemical Society Publications. Washington, D.C. vol. 181. pp.181-210, 1979.
- WU, J.-F., LASTICK, S.M. & UPDEGRAFF, D.M. Ethanol production from sugars derived from plant biomass by a novel fungus. **Nature**. 321:887-888, 1986.
- WYK, J.P.H. Saccharification of paper products by cellulase from *Penicillium funiculosum* and *Trichoderma reesei*. **Biomass Bioenergy** 16:239-242, 1999.
- WYMAN, C.E. Ethanol from lignocellulosic biomass: Technology, economics and opportunities, **Biores. Technol.** 50:3-16, 1994.
- WYMAN, C.E. Ethanol production from lignocellulosic biomass: Overview, in **Handbook on bioethanol: production and optimization**, Chapter 1, Wyman, C.E., ed., Taylor and Francis, USA, pp: 1-18, 1996.