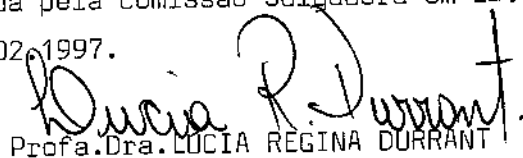


UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS

**ESTUDO DOS SISTEMAS CELULOLÍTICO E
FERMENTATIVO DE FUNGOS MICROAERÓBIOS
FACULTATIVOS**

PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por ÉRIKA CRISTINA PAVARINA e aprovada pela Comissão Julgadora em 25.02.1997.


Profa.Dra. LUCIA REGINA DURRANT

Presidente da Banca

ERIKA CRISTINA PAVARINA
Farmacêutica

Profª. Drª. LUCIA REGINA DURRANT
Orientadora

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

Campinas / 1997



UNIDADE	BC
N.º CHAMADA	UNICAMP
	P288e
V.	12
TOMBO	30058
PROC.	281197
C	☐
D	☒
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	10/05/97
N.º CPD	

CM-00099118-6

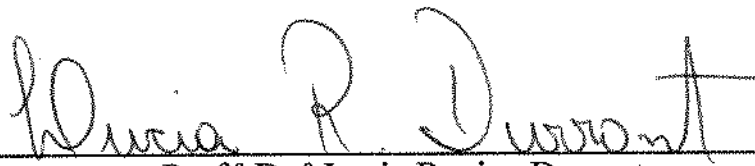
FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA F.E.A. - UNICAMP

P288e Pavarina, Erika Cristina
Estudo dos sistemas celulolítico e fermentativo de fungos
microaeróbios facultativos / Erika Cristina Pavarina. --
Campinas, SP: [s.n.], 1997.

Orientador: Lucia Regina Durrant
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de
Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos.

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

BANCA EXAMINADORA



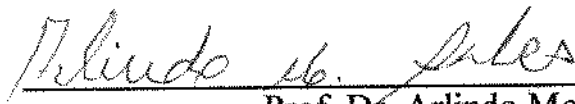
Prof.^a Dr.^a Lucia Regina Durrant

(ORIENTADORA)



Prof.^a Dr.^a Hélia Harumi Sato

(MEMBRO)



Prof. Dr. Arlindo Moreira Sales

(MEMBRO)

Prof. Dr. Fumio Yokoya

(MEMBRO)

“...Um tempo em que aprendi a transformar o medo em respeito, o respeito em confiança. Descobri como é bom chegar quando se tem paciência. E para se chegar, onde quer que seja, aprendi que não é preciso dominar a força, mas a razão. É preciso, antes de mais nada, querer.”

Amyr Klink

*“Agradeço a Deus pela proteção e amor,
sou grata por Sua presença constante em minha vida.”*

Aos meus pais e irmão, Edmir, Marlene e Carlos
pelo amor, dedicação, compreensão e constante incentivo;

dedico

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

Ao Conselho Nacional de Pesquisa Científica, 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;

Ao meu namorado e amigo Oswaldo, pelo amor, estímulo e encorajamento a continuar caminhando;

À família e amigos, pela cumplicidade total, apoio e carinho;

À Lara Sette, pela valiosa colaboração e amizade;

Ao Hamilton Bavutti, pela demonstração de amizade e apoio constante durante todo convívio;

À Daniela e Tânia , pela grande contribuição na parte experimental e amizade;

Ao pessoal do laboratório, em especial à Andrea, Eliane e Raquel pelo apoio recebido, atenção e amizade;

Ao pessoal do Departamento de Bioquímica do Instituto de Tecnologia de Alimentos, em especial à Vera Baldini, pelo grande carinho e incentivo a carreira científica;

À Margareth, pela dedicada atenção e competência;

Ao pessoal do microcentro, da biblioteca (FEA) e ao Jonas do xerox que muito contribuíram para realização deste trabalho;

ÍNDICE GERAL

ÍNDICE DE TABELAS.....	iii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	iv
ÍNDICE DE APÊNDICE.....	v
RESUMO.....	vi
SUMMARY.....	vii
 1. INTRODUÇÃO.....	 1
 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	 4
2.1. Fontes Naturais e Composição do Material Celulósico.....	4
2.1.1. Estrutura da Celulose.....	6
2.2. Sistema Enzimático.....	9
2.2.1. Substratos para Medida de Atividades Celulolíticas.....	14
2.3. Microrganismos Envolvidos na Degradação da Celulose.....	15
2.3.1. Produção de Celulases por Fungos.....	17
2.3.1.1. Fungos Aeróbicos.....	17
2.3.1.2. Fungos Anaeróbicos.....	18
2.3.2. Produção de Celulases por Bactérias.....	19
2.3.2.1. Bactérias Aeróbicas.....	19
2.3.2.2. Bactérias Anaeróbicas.....	19
2.4. Aplicação das Celulases.....	20
2.5. Produção de Etanol.....	23
 3. MATERIAL E MÉTODOS.....	 29
3.1. Reagentes e Equipamentos	29
3.2. Microrganismos Utilizados e Manutenção.....	29

3.3. Meio de Cultura Basal.....	30
3.4. Inóculo.....	30
3.5. Produção de Celulases e Condições de Cultivo.....	31
3.6. Obtenção das Enzimas.....	33
3.7. Determinações das Atividades Enzimáticas.....	33
3.7.1. Atividade de Carboximetilcelulase.....	33
3.7.2. Atividade de Avicelase.....	34
3.7.3. Atividade de Xilanase.....	34
3.7.4. Atividade de β -glicosidase.....	34
3.8. Produtos de Fermentação.....	35
3.9. Utilização do Substrato.....	35
3.10. Determinações Analíticas.....	35
3.10.1. Determinação de Açúcares.....	35
3.10.2. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.....	36
 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	 37
4.1. Seleção dos Microrganismos.....	37
4.2. Produção de Celulases.....	37
4.2.1. Influência da Fonte de Carbono.....	42
4.3. Utilização do Substrato.....	52
4.4. Produtos de Fermentação.....	53
 5. CONCLUSÕES.....	 62
 6. BIBLIOGRAFIA.....	 64
 7. APÊNDICE.....	 71

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Ensaio para determinação de atividade celulolítica.....	14
Tabela 2. Microrganismos produtores de celulases.....	16
Tabela 3. Utilização dos substratos após duas transferências.....	52
Tabela 4. Tempo de retenção dos padrões.....	53
Tabela 5. Produtos de fermentação produzidos pelo microrganismo H ₂ em diferentes fontes de carbonos.....	55
Tabela 6. Produtos de fermentação produzidos pelo microrganismo <i>Trichocladium canadense</i> (Q ₁₀) em diferentes fontes de carbonos..	56
Tabela 7. Produtos de fermentação produzidos pelo microrganismo LH ₅ em diferentes fontes de carbonos.....	57
Tabela 8. Produtos de fermentação produzidos pelo microrganismo 20 em diferentes fontes de carbonos.....	58
Tabela 9. Produtos de fermentação produzidos pelo microrganismo <i>Geotrichum</i> sp (LD) em diferentes fontes de carbonos.....	59

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Biomassa lignocelulósica de resíduo agrícola.....	6
Figura 2. Estrutura da celulose.....	7
Figura 3. Estrutura da madeira.....	9
Figura 4. Sinergismo entre endoglucanases, celobiohidrolases e β -glicosidases no sistema celulase de fungos.....	13
Figura 5. Diagrama das transformações do etanol em outros compostos químicos e petroquímicos.....	24
Figura 6. Atividade enzimática: carboximetilcelulase em meio papel de filtro.....	38
Figura 7. Atividade enzimática: avicelase em meio papel de filtro.....	39
Figura 8. Atividade enzimática: xilanase em meio papel de filtro.....	40
Figura 9. Atividade enzimática: β -glicosidase em meio papel de filtro.....	41
Figura 10. Atividade enzimática em meio papel de filtro sob agitação.....	42
Figura 11. Atividade enzimática em meio Avicel.....	43
Figura 12. Atividade enzimática em meio xilana.....	44
Figura 13. Atividade enzimática em meio bagaço de cana.....	45
Figura 14. Atividade enzimática em meio serragem.....	46
Figura 15. Atividade enzimática em meio bagaço de cana sob agitação.....	47
Figura 16. Atividade enzimática em meio serragem sob agitação.....	48
Figura 17. Atividade enzimática em meio bagaço de cana sob agitação / microaerofilia.....	49
Figura 18. Atividade enzimática em meio serragem sob agitação/microaerofilia.	50
Figura 19. Atividade enzimática em meio papel de filtro sob agitação / microaerofilia.....	51
Figura 20. Perfil cromatográfico da produção de etanol quando o microrganismo <i>Geotrichum</i> sp (LD) foi inoculado em meio papel de filtro sob condição agitação (6 dias) / microaerofilia (7 dias).....	54

ÍNDICE DE APÊNDICE

1. Tabelas das atividades enzimáticas.....	71
1.1. Aeróbica / sem agitação / 7 dias.....	71
1.2. Aeróbica / sem agitação / 15 dias.....	72
1.3. Aeróbica / sem agitação / 22 dias.....	73
1.4. Aeróbica / sem agitação / 30 dias.....	74
1.5. Microaerofílica / 7 dias.....	75
1.6. Microaerofílica / 15 dias.....	75
1.7. Microaerofílica / 22 dias.....	76
1.8. Microaerofílica / 30 dias.....	76
1.9. Aeróbica / sob agitação / 4 dias.....	77
1.10. Aeróbica / sob agitação / 6 dias.....	77
1.11. Aeróbica / sob agitação / 10 dias.....	78
1.12. Microaerofílica / meio Avicel / 20 dias.....	78
1.13. Microaerofílica / meio Avicel / 35 dias.....	78
1.14. Microaerofílica / meio xilana / 20 dias.....	79
1.15. Microaerofílica / meio xilana / 35 dias.....	79
1.16. Microaerofílica / meio bagaço de cana / 20 dias.....	79
1.17. Microaerofílica / meio bagaço de cana / 35 dias.....	80
1.18. Microaerofílica / meio serragem / 20 dias.....	80
1.19. Microaerofílica / meio serragem / 35 dias.....	80
1.20. Agitação / meio bagaço de cana / 6 dias.....	81
1.21. Agitação / meio serragem / 6 dias.....	81
1.22. Agitação/microaerofília / meio papel de filtro / 13 dias.....	82
1.23. Agitação/microaerofília / meio bagaço de cana / 13 dias.....	82
1.24. Agitação/microaerofília / meio serragem / 13 dias.....	82

RESUMO

A celulose é o principal constituinte da parede celular das plantas terrestres e é uma das maiores fontes de carbono renováveis. O sistema enzimático que desintegra a celulose compreende, as endoglucanases (CMCase), exoglucanases e β -glicosídates. Neste trabalho foram utilizados 10 microrganismos isolados de amostras de solo, sendo que após análise das atividades enzimáticas (celulolíticas e ligninolíticas), 5 linhagens foram selecionadas e utilizadas em estudos de produção de enzimas que promovem a degradação de materiais celulósicos e provável fermentação destes materiais a etanol. Celulose microcristalina, xilana, papel de filtro e resíduos agroindustriais foram utilizados como fonte de carbono em um meio específico contendo sais minerais, vitaminas e como agente redutor cisteína. A maior atividade de avicelase foi obtida com o microrganismo H₂ após crescimento em meio contendo xilana sob condição microaerofílica. A linhagem H₂ também apresentou alta atividade de carboximetilcelulase, quando crescido em meio bagaço de cana sob condição microaerofílica, e o máximo de atividade xilanase foi obtido quando a linhagem F.20 foi crescida em meio xilana sob condição microaerofílica. A maior produção de β -glicosídate foi obtida pelo microrganismo LH₅ após crescimento em meio serragem sob condição microaerofílica. Os microrganismos F.20, *Geotrichum* sp (LD) e LH₅ produziram etanol sob condição de agitação e posterior microaerofilia quando crescidos nos meios contendo papel de filtro, bagaço de cana e serragem. Enquanto que os microrganismos H₂ e *Trichocladium canadense* (Q₁₀) apresentaram produção de etanol após crescimento em meio contendo xilana sob condição microaerofílica. Os monômeros de celulose e hemicelulose foram utilizados como fonte de carbono para verificar a capacidade de utilização destes substratos pelos microrganismos selecionados. A linhagem F.20 apresentou desenvolvimento ótimo da massa micelial para a maioria dos substratos utilizados.

SUMMARY

Cellulose is the main constituent of the cell walls of terrestrial plants and is one of the biggest renewable carbon sources. The enzymatic system that degrades cellulose comprises the endoglucanases (CMCase), exoglucanases and β -glucosidases. In this work were used ten microorganisms isolated from soil samples and after the analysis of enzymatic activities (cellulolytic and lignicellulolytic), 5 microorganisms were selected and used in studies of the production of enzymes that promote the degradation of cellulosic materials and the production of ethanol. Avicel, xylan, Whatman n°1 paper and agroindustrial wastes were used as carbon sources in a specific medium containing mineral salts, vitamins and cystein as a reducing agent. The best activity of avicelase was achieved with the microorganism H₂ after growth in a medium containing xylan under microaerophylic conditions. The microorganism H₂ also presented higher carboxymethylcellulase activity when incubated in sugar-cane bagasse medium under microaerophylic conditions, and a maximum value of xylanase activity was achieved with the microorganism F.20 when grown in xylan medium under microaerophylic conditions. The higher production of β -glucosidase was achieved with the strain LH₅ after growing in a sawdust medium under microaerophylic conditions. The microorganisms F.20, LH₅ and *Geotrichum* sp (LD) produced ethanol under the combined shaking followed by microaerophylic conditions when grown in Whatman n°1, sugar-cane bagasse and sawdust media. On the other hand, the strains H₂ and *Trichocladium canadense* (Q₁₀) presented ethanol production when grown in xylan medium under microaerophylic conditions. Cellulose and hemicellulose monomers were used as the carbon sources. The strain F.20 showed optimum development of mycelial mass for almost all the substrates utilized.

I. INTRODUÇÃO

A celulose é a matéria prima renovável mais abundante na terra. Ocorre predominantemente em associação física com a hemicelulose e a lignina, resultando assim o termo “lignocelulósico”, o qual designa o material orgânico renovável mais abundante e viável de conversão biológica, química e fisiológica em produtos de interesse econômico.

O ciclo da matéria orgânica é de muita importância para os seres vivos e conseqüentemente para a vida na terra. O processo fotossintético produz anualmente 1.5×10^{11} toneladas de material orgânico derivado de plantas, sendo composto, basicamente, por celulose, hemicelulose e lignina, juntamente com uma certa quantidade de cinzas representando os minerais. Estes polímeros de origem vegetal são usados como fonte de energia por inúmeros microrganismos que ocupam diversos habitats.

A biomassa lignocelulósica representa a maior fração do material vegetal. Exemplos comuns de biomassa lignocelulósica incluem resíduos agrícolas e de processamento industrial, como efluentes de 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 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 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 celulose requer um sistema celulolítico eficiente. A bioconversão de materiais celulósicos tem sido impedida pelo alto custo de produção destas enzimas. Por este motivo, o isolamento de novos microrganismos produtores de enzimas celulolíticas e estudos relacionados com a sua produção e também com a fermentação direta de material celulósico são bastante importantes.

Algumas linhagens de fungos como *Fusarium oxysporum*, *Neurospora crassa* e *Monilia* foram identificadas como organismos potenciais para decomposição e fermentação de resíduos celulósicos a etanol em um processo de única etapa.

Os fungos capazes de fermentar a celulose diretamente possuem potencial de aplicação na produção de açúcares a partir de celulose, ou de produtos de fermentação, tais como etanol, acetato, ácido láctico e outros, e também na produção de enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas. Podendo ainda ser utilizados em processos de digestão anaeróbica de material lignocelulósico, tais como resíduos agrícolas e resíduos sólidos de aterros municipais para produção de fontes alternativas de energia.

Com o intuito de se obter um melhor conhecimento das características metabólicas de fungos microaeróbios facultativos e visando a possibilidade de futura aplicação na fermentação de material lignocelulósico este trabalho teve como objetivos:

1. Estudo das linhagens fúngicas capazes de crescer sob condições de baixa oxigenação;
2. Seleção das linhagens mais ativas nestas condições;
3. Determinação das atividades celulolíticas e xilanolíticas produzidas;
4. Determinação dos produtos de fermentação;
5. Determinação da utilização de açúcares tais como glicose, xilose, manose, arabinose, frutose, galactose.

II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Fontes Naturais e Composição do Material Celulósico

A celulose 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 o composto biológico terrestre mais abundante encontrado na Terra. É 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 (Goksoyr e Eriksen, 1980). Na natureza a celulose não é encontrada na sua forma pura, ou seja, está sempre associada com outros polissacarídeos (hemicelulose, pectina) e lignina (Cowling e Kirk, 1976). 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 são compostos de celulose, hemicelulose e lignina (Cowling e Kirk, 1976).

Os resíduos agrícolas contém cerca de 20 a 60% de celulose, 20 a 30% de hemicelulose e 15 a 30% de lignina. O bagaço de cana, farelo de trigo e de arroz, por exemplo, contém cerca de 25 a 40% de celulose e o restante de hemicelulose (20-35%) e lignina (15-30%). 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 (Cowling e Kirk, 1976 e Janshekar e Fiechter, 1983).

As hemiceluloses são heteropolímeros lineares compostos de D-xilose, L-arabinose, D-manose, D-glicose, D-galactose, e D-ácido glucurônico. As xilanas são as hemiceluloses mais abundantes, possuem uma ligação β -1,4 xilopirranose principal, conectada com grupos laterais de acetato, arabinofuranose, e o-metil ácido glucurônico (Biely, 1985 e Erikson et al., 1990). As hemiceluloses envolvem as microfibrilas da celulose e ocupam os espaços entre as fibrilas (Erikson et al., 1990). Certos grupos arabinofuranosil podem ser esterificados por ácidos aromáticos como ácido ferúlico e p-cumarílico, podendo participar da ligação cruzada lignina-hemicelulose (Shoseyov e Doi, 1990).

A lignina é um dos três compostos básicos da biomassa. É um polímero tridimensional de origem fenólica com alto peso molecular, formado por unidades de álcool coníferílico, siríngico e cumarílico. Nos tecidos vegetais, a lignina tem funções de preservação atuando como um cimento entre fibras individuais, e junto com a hemicelulose, a matriz da lignina se entrelaça com a microfibrila celulósica para formar uma barreira protetora aos microrganismos desconhecidos. A lignina é altamente ramificada, é resistente à biodegradação e tenta proteger a celulose e a hemicelulose da hidrólise enzimática (Gold et al., 1989).

Como mostra a figura 1, a maior fração destes materiais, tipicamente na ordem de 35-50%, é um polímero de glicose conhecido como celulose que é um composto orgânico encontrado com muita frequência na natureza e é um dos principais constituintes da parede celular da maioria das plantas vegetais. Na ordem de 20-35%, é encontrada a hemicelulose, que também é um polímero de

açúcar, complexo, onde os tipos e as distribuições destes açúcares variam dependendo, em particular, da fonte da biomassa, sendo o açúcar de cinco carbonos; xilose, a fração predominante da hemicelulose que é encontrada na parede celular de vegetais. A terceira grande fração, na ordem de 15 a 25%, é a lignina, um polímero fenil-propano de composição complexa que não pode ser quebrado para formar moléculas de açúcar. Outros componentes como óleos, proteínas e cinzas são encontrados na ordem de 5-10% na estrutura de biomassa lignocelulósica (Wyman, 1994).

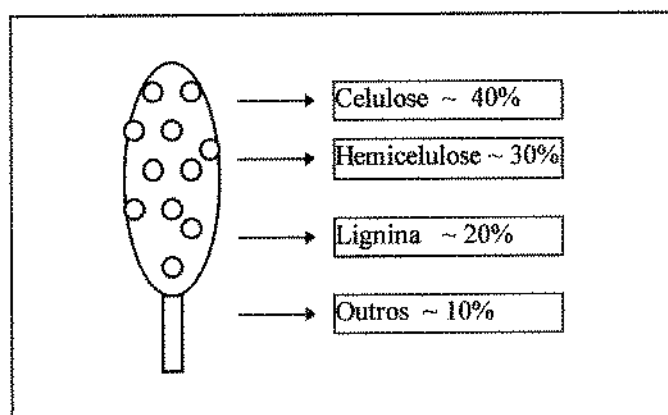


Figura 1. Biomassa Lignocelulósica de Resíduo Agrícola

2.1.1. Estrutura da Celulose

Quimicamente, a celulose é um polímero linear, composto de unidades de D-anidro-glicopiranosídeo unidas por ligações β -1,4-glicosídicas como esquematizada na figura 2-A, sendo a celobiose sua unidade básica. 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 (Coughlan, 1992) e o grau de polimerização (D.P.) foi

reportado entre 15 - 14.000 (Cowling e Brown, 1969). Shitola e Neimo (1975), assumiram um valor de D.P. de 10.000 para celulose nativa.

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; Béguin e Aubert, 1992), como é apresentado na figura 2-B.

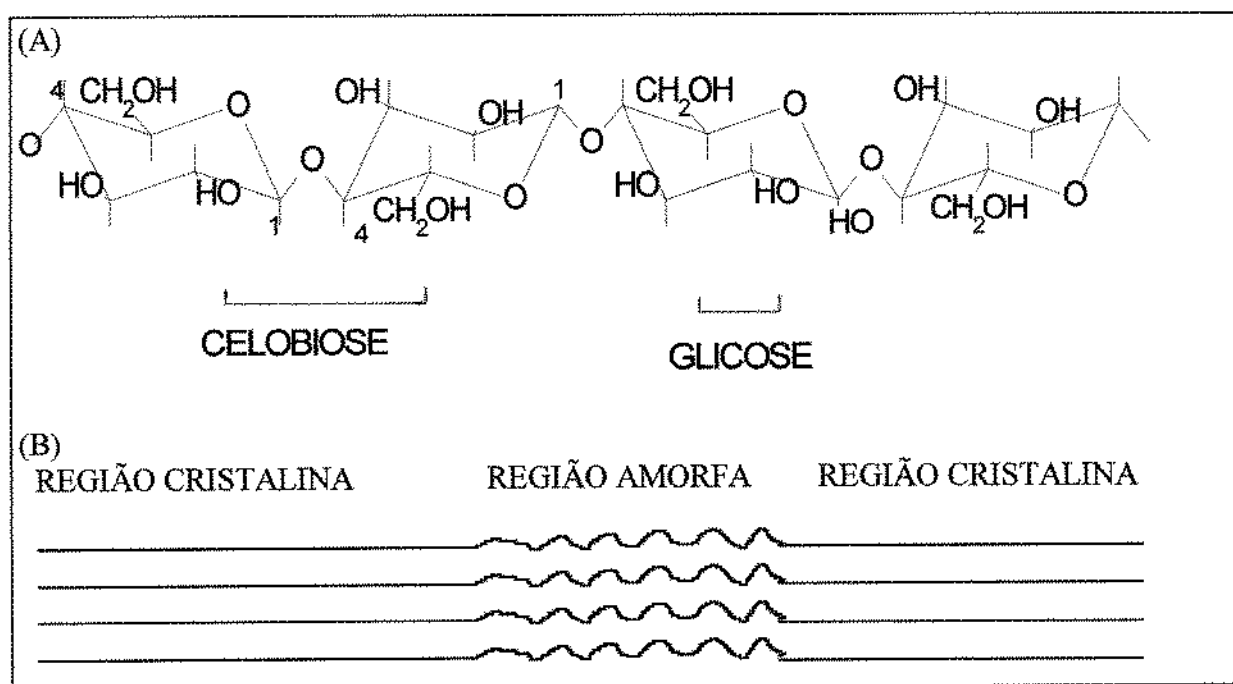


Figura 2. Estrutura da celulose. (A) Ligações β -glicosídicas. (B) Estrutura esquemática de uma fibrila (Béguin e Aubert, 1992).

Estas fibrilas tornam a unir-se por ligações de hidrogênio e forças de Van de Walls intercadeias, resultando na formação de um polímero insolúvel denominado de microfibrila (Coughlan, 1992). A menor unidade de fibra da celulose é a fibrila elementar; 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 (Knapp, 1985).

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; Coughlan, 1985). Envolvendo a estrutura cristalina e infiltrando-se na região amorfa, existem hemiceluloses e cadeias isoladas de celulose (Montgomery, 1983).

A célula da madeira é uma estrutura de multicamadas. A primeira camada; externa, é chamada de 'parede primária'. Esta primeira parede é formada de microfibrilas orientadas transversalmente ao longo do eixo da fibra. A próxima camada, é denominada 'parede secundária', contendo três subcamadas, S1, S2 e S3. Cada uma destas subcamadas é formada por um estágio de crescimento particular da célula e, por esta razão, cada unidade contém uma estrutura (ex. microfibrilas) com uma orientação diferente que resulta em aspecto laminado. A mais importante das subcamadas é a S2, a qual contém as maiores concentrações de celulose e praticamente forma a parede secundária. No interior da parede secundária aparece o lúmen, um conjunto de células vivas que contém a substância intracelular. Quando a célula está morta, esta porção vem a ser um espaço côncavo (buraco) e é usado pela planta para o transporte de fluídos ou água. Os outros componentes da fibra, como as hemiceluloses e ligninas, estão localizadas entre as microfibras. A lignina é também encontrada em grande quantidade na lamela média ou nos espaços entre as fibras. Em termos de estrutura, as paredes primárias e secundárias diferem na orientação das fibrilas de celulose (Knapp, 1985; Béguin e Aubert, 1992). A figura 3 representa a estrutura da madeira, retirando um fragmento é possível visualizar a celulose, a matriz lignina-hemicelulose e a hemicelulose.

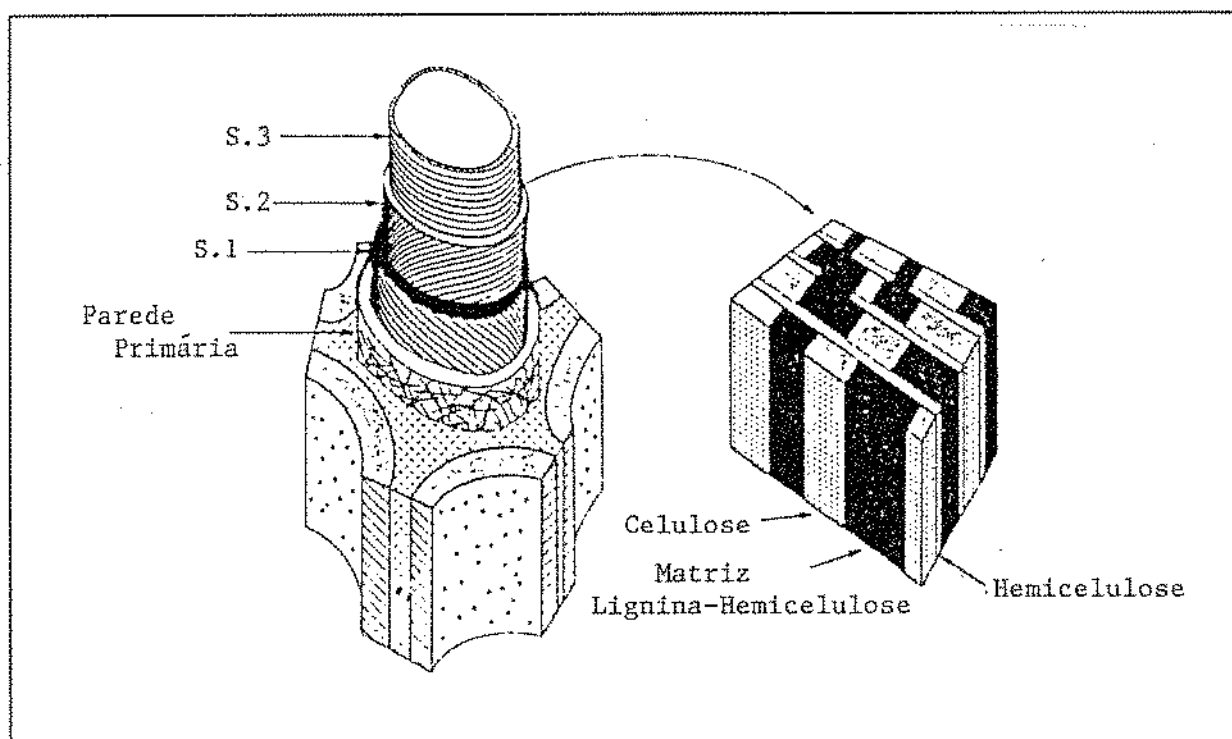
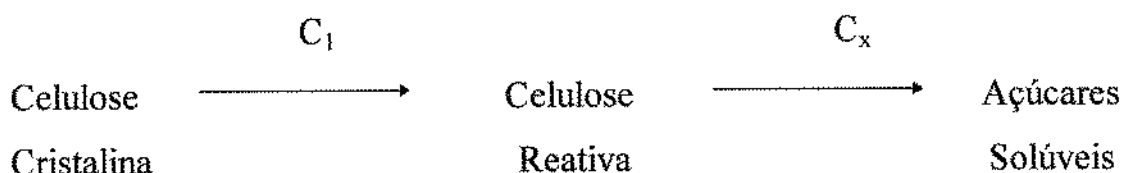


Figura 3. Estrutura da Madeira. S.1-S.3, são subcamadas da parede secundária (Béguin e Aubert, 1992).

2.2. Sistema Enzimático

O sistema celulase é um complexo enzimático no qual várias enzimas atuam para hidrolisar a celulose (Mandels, 1982). Embora as celulasas sejam produzidas por um certo número de microrganismos, somente alguns apresentam-se como bons candidatos para alta produção de enzima em um meio de cultura. Em muitos casos, o interesse prático do uso das celulasas está relacionado com a sua capacidade sacarificante, isto significa que o sistema celulase deve conter todas as três enzimas (endoglucanase, exoglucanase e β -glicosidase) em quantidades apropriadas. Como consequência, os fungos que pertencem aos grupos ascomicetos e deuteromicetos, possivelmente juntos com muitos basidiomicetos de degradação branca, são os candidatos preferidos (Goksoyr e Eriksen, 1980; Wood, 1985).

Desde as primeiras avaliações do modo de ação das enzimas celulolíticas “in vitro”, pesquisas extensivas tem sido desenvolvidas com enzimas celulolíticas de uma variedade de microrganismos. O maior avanço nos estudos da atividade das celulasas foi atingido por introdução do conceito $C_1 - C_x$ (Reese et al., 1950), o qual utilizou culturas filtradas de alguns microrganismos celulolíticos capazes de hidrolisar derivados de celulose nativa. Reese et al. (1950), sugeriram que C_1 era um composto capaz de formar cadeias de celulose menores e lineares a partir de celulose nativa, e estas cadeias poderiam ser hidrolisadas por C_x , a qual também hidrolisa derivados de celulose solúvel, (sendo as celulasas propriamente ditas). Seguindo esta concepção, a C_1 foi considerada um ‘fator prehidrolítico’, não necessariamente enzimático. Esta hipótese está demonstrada no esquema a seguir:



Selby (1968), sugeriu que C_1 atuava removendo ligações de hidrogênio entre cadeias de celulosas adjacentes tornando-as viáveis para o ataque da enzima C_x . Atualmente usa-se apenas os nomes abreviados, exoglucanases para β -1,4-D-glucano-celobiohidrolase (E.C. 3.2.1.91), e endoglucanase para β -1,4-D-glucano- 4-glucanohidrolase (E.C. 3.2.1.4).

A primeira ação da enzima para hidrólise efetiva da celulose nativa requer uma operação seqüencial das celulasas, isto é, endoglucanases (antes denominadas C_x), exoglucanases (C_1) e celobiasas (β -glicosidase), como mostra a figura 4. A endoglucanase é uma endoenzima que rompe aleatoriamente a cadeia de celulose, por exemplo a CMCase (carboximetilcelulase). 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 da celulose cristalina. A β -glicosidase é uma enzima específica para celobiose tendo como produto final a glicose (monômero de açúcar). 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 sozinhas são capazes de realizar a hidrólise (Wood e McCrae, 1979). Wood e Bhat, 1988; Béguin e Aubert, 1992 resumiram desta maneira:

- Endo-1,4- β -D-glucanase ou (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 é atacada 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.

- Exo-1,4- β -D-glucanase: 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. A maioria das celobiohidrolases 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.
- Celobiase ou 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 elas 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 intenso quanto maior for o grau de polimerização. A celobiase não é considerada uma celulase específica, pois ela apenas ajuda a ação das celulases pela remoção dos resíduos de celobiose que são inibitórios.

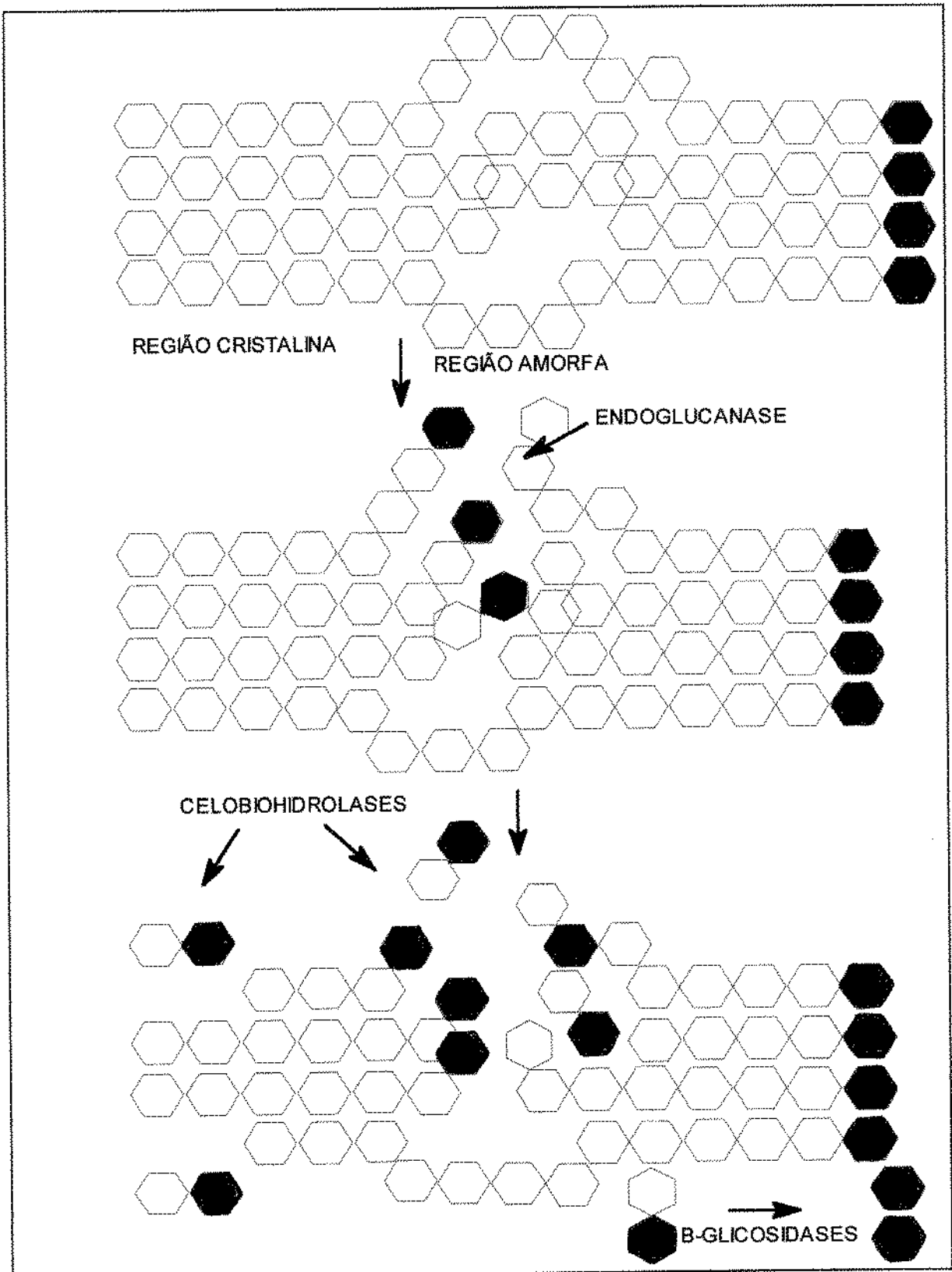


Figura 4. Sinergismo entre endoglucanases, celobiohidrolases (exoglucanases), e β -glicosidases no sistema celulase de fungos. Resíduos de glicose são indicados por hexágonos. Finais redutores são apresentados em preto (Béguin e Aubert, 1992).

2.2.1. Substratos para Medida de Atividades Celulolíticas

Foram desenvolvidos alguns ensaios relativamente específicos para os diferentes componentes do complexo celulolítico que estão listados na tabela 1. Estes ensaios, baseiam-se principalmente na determinação de açúcares redutores liberados a partir da hidrólise enzimática do substrato celulósico. Dependendo da cristalinidade do substrato, o ensaio serve para quantificar endo ou exoglucanase.

Tabela 1. Ensaio para determinação de atividades celulolíticas

ENZIMA	SUBSTRATO UTILIZADO	PRODUTO MEDIDO
Complexo celulolítico	algodão	açúcares redutores
	avicel	açúcares redutores
	papel de filtro	açúcares redutores
	ágar celulose	clarificação do ágar
Endoglucanase	carboximetilcelulose	açúcares redutores
	hidroxietilcelulose	perda da viscosidade
	celooligossacarídeos	açúcares redutores
Exocelobiohidrolase	celulose amorfa	açúcares redutores
	celooligossacarídeos	celobiose
	p-nitrofenil- β -D-celobiosídeo	p-nitrofenol
Exocelobiohidrolase	celulose amorfa	açúcares redutores
	celooligossacarídeos	glicose
β -glicosidase	celooligossacarídeos	açúcares redutores
	celobiose	glicose
	p-nitrofenil- β -D-glucosídeo	p-nitrofenol

Fonte: Mandels et al., 1976; Coughlan, 1985.

A atividade de endoglucanase pode ser medida utilizando-se substratos como celulose tratada quimicamente (com ácido fosfórico) ou fisicamente (triturada em moinho de bolas), e com celulose de baixo grau de substituição (carboximetilcelulose), pois apresentam regiões amorfas (Robson e Chambliss, 1989; Enari e Paavola, 1987; Mandels et al., 1976; Coughlan, 1985).

A atividade de endoglucanase também pode ser determinada pelo decréscimo na viscosidade, ou aumento da fluidez da solução do substrato (Robson e Chambliss, 1989; Mandels et al., 1976; Coughlan, 1985).

A atividade da β -glucosidase pode ser medida pela liberação de *p*-nitrofenol a partir do substrato *p*-nitrofenil- β -D-glicosídeo ou pela liberação de glicose a partir de celobiose ou celooligosacarídeos (de até sete unidades de glicose) (Enari e Paavola, 1987; Mandels et al., 1976; Coughlan, 1985).

2.3. Microrganismos Envolvidos na Degradação da Celulose

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 (Knaap, 1985).

Os microrganismos celulolíticos são encontrados entre grupos taxonômicos extremamente variados. Estes microrganismos incluem fungos, actinomicetos, e bactérias (Wood, 1985). 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 (Ljungahl e Eriksson, 1985; Béguin e Aubert, 1994). Os principais microrganismos produtores de celulasas estão listados na tabela 2.

Tabela 2. Microrganismos produtores de celulasas

GRUPO	ORGANISMO
Bactérias	<i>Acetivibrio cellulolyticus</i> , <i>Bacteroides cellulosolvens</i> , <i>B. succinogenes</i> , <i>Cellulomonas</i> sp., <i>Cellvibrio fulvus</i> , <i>C. gilvus</i> , <i>C. vulgaris</i> , <i>C. thermocellum</i> , <i>C. thermomonospora</i> , <i>Pseudomonas fluorescens</i> , <i>Ruminococcus albus</i>
Actinomicetos	<i>Streptomyces griseus</i> , <i>Thermoactinomyces</i> sp., <i>Thermonospora curvata</i> , <i>T. fusca</i>
Fungos	<i>Agaricus bisporus</i> , <i>Aspergillus fumigatus</i> , <i>A. niger</i> , <i>A. terreus</i> , <i>Botryodiplodia theobromae</i> , <i>Chaetomium thermophilum</i> , <i>Eupenicillium javanicum</i> , <i>Fusarium solanii</i> , <i>Hemicola insolens</i> , <i>Macrophomina phaseolina</i> , <i>Myrothecium verrucaria</i> , <i>Mycellophthora thermophila</i> , <i>Pellicularia filamentosa</i> , <i>Penicillium citrinum</i> , <i>Penicillium funiculosum</i> , <i>P. trenis</i> , <i>P. janthinellum</i> , <i>P. variabile</i> , <i>Pestalotiopsis westerdijkii</i> , <i>Polyporus adustus</i> , <i>P. versicolor</i> , <i>Poria</i> sp., <i>Sporotrichum cellulophilum</i> , <i>S. dimorphosporum</i> , <i>S. pruinosum</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>

Fonte: Ljungahl e Eriksson, 1985.

2.3.1. Produção de Celulases por Fungos

2.3.1.1. Fungos Aeróbicos

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 (Knapp, 1985).

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 e McCrae, 1972), *Penicillium funiculosum* (Borchert e Buchholzs, 1987), *Fusarium solanii* (Enari e Paavola, 1987) e *Neurospora crassa* (Yazdi et al., 1990). Estes fungos produzem grande quantidade de endoglucanases e quantidade variável de β -glucosidase, mas pouca exoglucanase.

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

2.3.1.2. Fungos Anaeróbicos:

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 flora 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).

Durrant et al. (1995) reportaram o isolamento, usando condições de cultura anaeróbica, de duas linhagens (H_2 e Q_{10}) morfológica e fisiologicamente distintas de fungos celulose fermentantes. A linhagem H_2 pertence a classe dos Basidiomicetos e a linhagem Q_{10} foi identificada como *Trichocladium canadense*. Ambas as linhagens cresceram e utilizaram celulose mais rapidamente quando incubadas sob condições microaerofílicas, e a linhagem H_2 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 nos fluidos sobrenadantes da cultura (Durrant, 1996a). Muitos fungos possuem um papel importante na degradação anaeróbica da celulose em solos e sedimentos, e futuros estudos são necessários para explorar suas contribuições potenciais.

2.3.2. Produção de Celulases por Bactérias

Ao contrário dos fungos, o sistema enzimático das bactérias é predominantemente intracelular. Uma estrutura de alto peso molecular, associada a célula, o celulosoma, parece ser responsável pela aderência da bactéria ao substrato onde as 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, 1985). Em geral as bactérias produzem pouca ou nenhuma atividade de exo- β -1,4-glucanase e a enzima celobiose-fosforilase (celobiose-ortofosfato- α -D-glucosiltransferase, E.C. 2.4.1.F.20) produzida intracelularmente, parece substituir a função da β -glicosidase fúngica (Ljungdhal e Eriksson, 1985).

2.3.2.1. Bactérias Aeróbicas

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* tem sido estudadas em detalhes (Béguin e Aubert, 1994).

2.3.2.2. Bactérias Anaeróbicas

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

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 (Robson e Chambliss, 1989). Entre as bactérias anaeróbias produtoras de celulasas, as do gênero *Clostridium* são as mais estudadas (Lynd et al. 1989).

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 redutores devem futuramente ser transferido para aceptores apropriados como sulfato e dióxido de carbono (Lynd et al. 1989).

2.4. Aplicação das Celulasas

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

Sob o ponto de vista prático, muitos processos envolvendo celulasas e hemicelulasas podem ser considerados.

No setor de processamento de alimentos, a celulose 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 (Wood et al., 1988). As preparações de celulasas e hemicelulasas são utilizadas para clarificação de sucos de frutas, podendo também ajudar na extração do suco e óleo de frutas e sementes da polpa. As celulasas e hemicelulasas são utilizadas também no processamento de ração animal. O processamento têxtil é outra área onde a celulase tem sido sucessivamente colocada em uso. As celulasas 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 (Béguin 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 é 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 (Béguin e Aubert, 1994).

As leveduras do gênero *Saccharomyces* ou bactérias como *Zymomonas mobilis* são capazes de utilizar glicose e produzir altas concentrações de etanol (Woodward, 1987). O fungo *Fusarium oxysporum* fermenta diretamente a celulose, isto é, o processo de hidrólise e fermentação ocorrem em uma única operação (Christakopóulos et al., 1989, 1990 e 1991). O fungo *Trichocladium canadense* (Q₁₀) e o basidiomiceto H₂ foram cultivados em papel de filtro moído

sob condições aeróbicas, microaerofilicas e anaeróbicas e o etanol foi o maior produto de fermentação não gasoso encontrado (Durrant, 1996a, 1996b). 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 proteicos); e a segunda, pelo crescimento do microrganismo (levedura) na glicose obtida pela hidrólise enzimática do material lignocelulósico (Tanaka e Matsuno, 1985).

Além das aplicações citadas acima os microrganismos celulolíticos e suas enzimas possuem também aplicações industriais (Mandels, 1985, Wong et al., 1988 e Woodward, 1984):

* Uso do fungo anaeróbico:

- (a) Decomposição de esgotos e resíduos; Decomposição de esgotos com simultânea produção de enzimas e fermentação de produtos;
- (b) Produção de alimentos fermentados (ração animal);
- (c) Produção de enzimas (depolimerizantes).

* Uso de enzimas celulolíticas e xilanolíticas:

(a) 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; liberar 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;

(b) Produção de glicose, xilose e outros açúcares solúveis: melhorar a qualidade dos alimentos de não herbívoros, aumentando o teor de açúcar de 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;

(c) Aplicações especiais de xilanases: biopolpação e biobranqueamento de polpas Krafts em indústrias de papéis;

(d) Aplicações em alimentos: remoção de fibra bruta e conversão de fibra a açúcar.

A fermentação da glicose a solventes e combustíveis, particularmente etanol e butanol, pode promover uma substituição parcial do combustível fóssil. Este projeto foi iniciado durante a crise do petróleo na década de 70.

2.5. Produção de Etanol

O etanol obtido a partir da biomassa via conversão microbiana pode ser utilizado: (a) em cervejarias, e em bebidas destiladas como whisky, rum, etc.; (b) como solvente para propósitos laboratoriais e farmacêuticos; (c) como um antisséptico; (d) como um cosurfactante de microemulsões óleo em água; e (e) como combustível para automóveis, usualmente adicionado na gasolina. O aumento do nível de CO_2 na atmosfera e os possíveis efeitos tem também aumentando os estudos do uso de etanol como combustível de automóveis. A substituição de gasolina por etanol reduziria a poluição do ar (Stewart et al., 1984). A produção de etanol a partir de fontes renováveis de biomassa lignocelulósica pode diminuir a poluição do ar urbano, e reduzir a acumulação de dióxido de carbono (CO_2) na atmosfera (Lynd et al., 1991).

A economia do Brasil foi muito afetada devido a crise do petróleo em 1973, e como uma consequência direta o Programa Nacional do Alcool (PNA) foi

estabelecido em 1975. O principal propósito deste programa era reduzir a dependência do petróleo importado para veículos movidos a gasolina. Desde que a cana de açúcar começou a ser cultivada em larga escala em muitas partes do país, a fonte básica de etanol tem sido o caldo de cana de açúcar e o melaço. O Programa Nacional do Alcool (PNA) tem também estimulado o desenvolvimento de um grande número de indústrias subsidiárias para produção de pesticidas e fertilizantes químicos, e a partir de 1974 novas empresas começaram produzir derivados do álcool, a figura 5 mostra de um modo geral o uso do bioetanol (Laluce, 1991 e Nogueira et al., 1987).

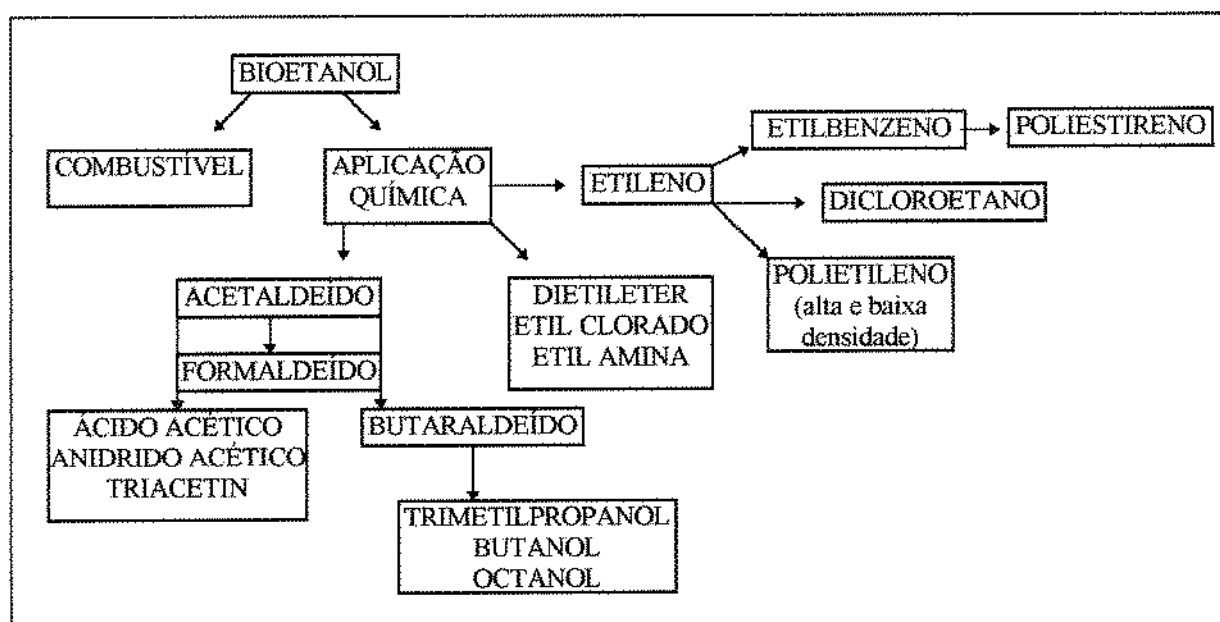


Figura 5. Diagrama das transformações do etanol em outros composto químicos e petroquímicos (Nogueira et al., 1987).

Sacarificação Simultânea e Conversão Biológica: A bioconversão da celulose a etanol 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 tentado usando diferentes celulasas e espécies microbianas produtoras de etanol para promover um processo eficiente. 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 (Singh e Kumar, 1991).

Atualmente a fermentação alcoólica tem sido desenvolvida em meio líquido por causa da solubilidade do reagente (açúcar) e produto (álcool). Entretanto, a extração do produto - etanol em uma fase não miscível pode resultar em benefícios cinéticos devido à inibição reduzida das reações de fermentação. Atualmente, Moritz e Duff (1996), reportaram o desenvolvimento de um processo de sacarificação simultânea e fermentação extrativa (SSEF), com levedura. A quantidade de água requerida para as reações SSEF foi menor do que a requerida por processo convencional (SSF). O SSEF pode aumentar a produtividade de etanol muito mais que a observada no processo convencional, ou seja, sacarificação simultânea e fermentação (SSF).

A celulose e a hemicelulose são hidrolisadas nos seus açúcares constituintes por ácidos ou enzimas microbianas, tendo como produto de hidrólise (dos materiais celulósicos) uma mistura de açúcares com glicose e xilose como maiores constituintes. 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 converter a fonte de carbono viável em produtos. Para direta conversão dos polissacarídeos celulósicos, um sistema biológico que hidrolisaria celulose e hemicelulose em seus açúcares, pentoses e hexoses, e converter estes açúcares simples em um único produto, como etanol, seria o ideal.

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., 1981).

Muitos fungos do gênero *Fusarium* (Christakopoulos et al., 1989, 1990 e 1991; Kumar et al., 1991), *Rhizopus* (Waksman e Foster, 1938), *Mucor* (Ueng e Gong, 1982), *Neurospora* (Rao et al. 1983; Deshpande et al., 1986), *Monilia* (Gong et al., 1981), *Polyporus* (Perlman, 1950) e *Paecilomyces* (Wu et al., 1986) conseguem converter glicose tão bem quanto xilose a etanol.

Algumas linhagens possuem a habilidade de converter celulose diretamente a etanol. Fungos como, *Monilia* (Gong et al., 1981), *Neurospora crassa* (Rao et al., 1983; Deshpande et al., 1986), e *Fusarium oxysporum* (Kumar et al., 1991) 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. Entretanto, o processo de produção de etanol por fungo filamentoso é impedido por necessitar de um longo período para alta taxa de conversão (Enari e Paavola, 1987).

Uma linhagem de *Fusarium oxysporum* isolada de cominho, foi testada em várias fontes de carbonos (glicose, xilose, celobiose e celulose) possuindo habilidade de fermentá-las diretamente a etanol. A maior porcentagem de produção teórica foi obtida com celulose como fonte de carbono. Para produção de etanol, o inóculo foi preparado aerobicamente e usado para inocular os frascos anaeróbicos (fermentação). As fontes de carbono foram utilizadas na concentração de 20 g/L, os experimentos foram desenvolvidos sob fermentação

anaeróbica, em pH 6, a 35°C por 6 dias; (a) fonte: glicose produziu 8.2 g/L etanol (80.2% produção teórica); (b) fonte: xilose produziu 5.0 g/L etanol (48.0% produção teórica); (c) fonte: celobiose produziu 8.9 g/L etanol (82.7% produção teórica) e, (d) fonte: celulose produziu 9.6 g/L etanol (89.2% produção teórica). Parâmetros como pH, temperatura e concentração de substrato, exerceram efeitos sobre a produção de etanol (Christakopoulos et al., 1989).

Christakopoulos et al. (1991), verificaram o efeito do índice de cristalinidade do farelo de trigo na direta conversão de celulose a etanol pelo microrganismo *Fusarium oxysporum*. O inóculo foi preparado aerobicamente e transferido para Erlenmeyers sob condições anaeróbicas, utilizados no processo de fermentação. Foi utilizado como fonte de carbono um meio contendo 0.15% de farelo de trigo. A concentração máxima de etanol (8.4 g de etanol / 30 g de farelo de trigo) foi obtida quando a índice de cristalinidade da celulose foi reduzido de aproximadamente 80% para 26.3%.

Carboidratos de sorgo foram simultaneamente sacarificados e fermentados a etanol por cultura mista de *F. oxysporum* e *S. cerevisiae* em um bioreator. O fungo *F. oxysporum* foi crescido aerobicamente para produção das enzimas necessárias para sacarificação da celulose e hemicelulose do sorgo. A linhagem *S. cerevisiae*, junto com o *F. oxysporum*, converteram os açúcares solúveis a etanol, obtendo uma produção ótima de 5.2 - 8.4 g etanol / 100 g de sorgo fresco, dependendo da época da colheita (Mamma et al., 1996)

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, sob condições anaeróbica, microaerofílica e aeróbica. Após degradação da celulose, as enzimas

lignocelulolíticas e os produtos de fermentação foram determinados. O etanol foi o maior produto de fermentação não gasoso 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.

III. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Reagentes e Equipamento

- Banho-maria, marca Eyela, modelo SB-650
- Centrífuga, marca Hitachi, modelo himac CR21
- Coluna Cromatográfica, Troca Iônica, Supelcogel C-610H, 30 cm x 7.8 mm ID
- Compressor, marca Millipore
- Cromatografo Líquido de Alta Eficiência, modelo LC-6A com detector ultravioleta modelo SPD-6A acoplado a integrador modelo CR-4A, marca Shimadzu
- Espectrofotômetro Ultravioleta, marca Spectronic, modelo 20
- Filtros para Fase Móvel, marca Millipore
- Peneira GRAN UTEST, abertura em mm (1.19)
- Reagentes grau para análise
- Reagentes grau cromatográfico
- Ultra purificador de água para uso em CLAE, marca Milli Q Plus
- Vortex, modelo Genil-2
- Equipamento de uso comum em laboratório: Balança analítica, autoclave, potenciômetro, estufa, câmara de fluxo laminar

3.2. Microrganismos Utilizados e Manutenção

Dez 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 (FOR) foi obtida no Departamento de Microbiologia da Universidade de Massachusetts em Amhest; a levedura *Geotrichum* sp (LD) foi isolada e identificada em nosso laboratório (Carvalho e Durrant, 1995); os deuteromicetos (F.20 e LH₅) e as demais linhagens (F.30, F.5, L71 e D7) foram isoladas de amostras de solo coletadas na região de Campinas. As linhagens foram mantidas em placas de Petri contendo meio ágar-GYP (ágar 1%, glicose 2%, extrato de levedura 0,5% e peptona 1%) sob refrigeração.

3.3. Meio de Cultura Basal

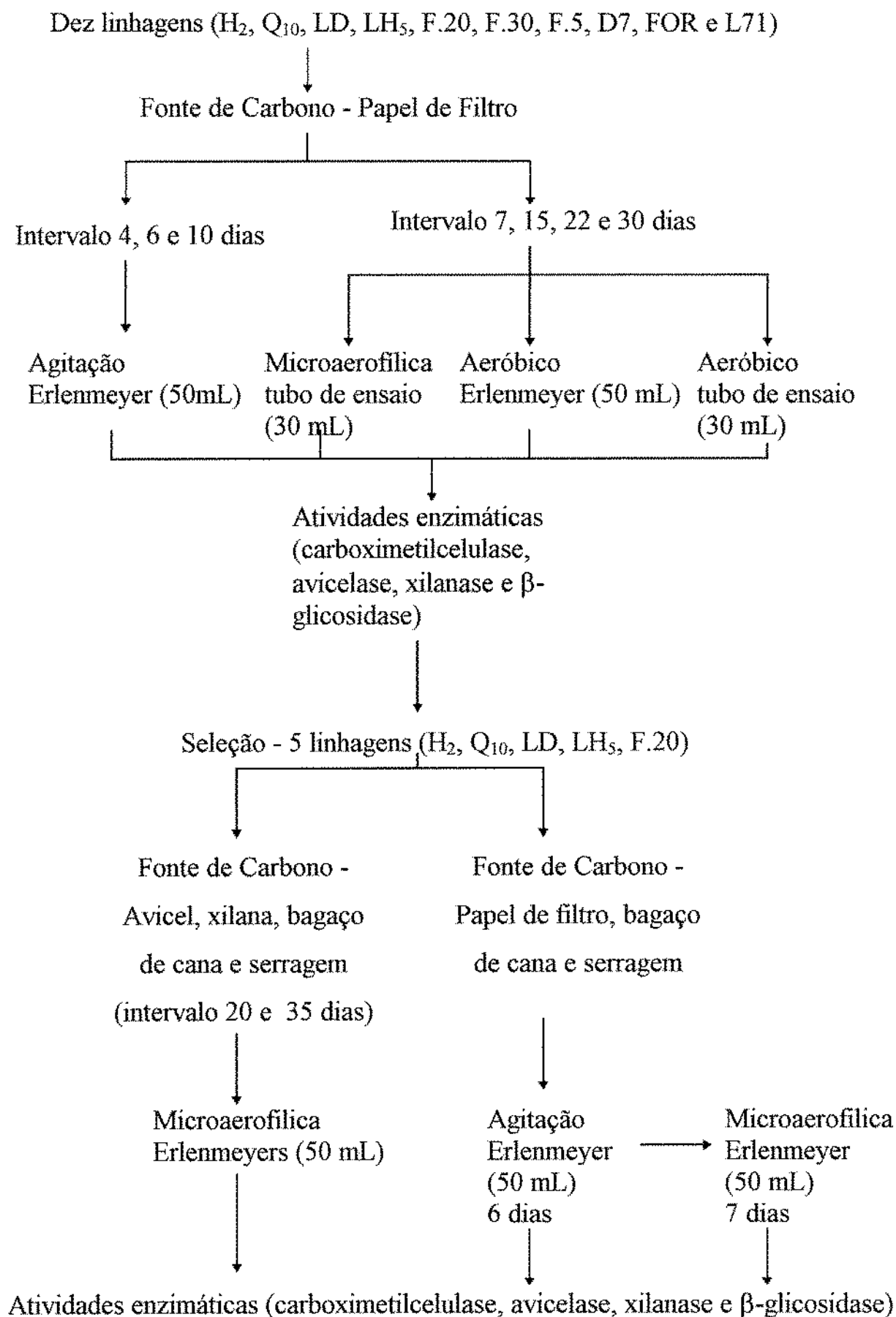
As linhagens foram inoculadas em um meio líquido definido contendo por litro: KH₂PO₄, 1.0 g; (NH₄)₂HPO₄, 0.5 g; CaCl₂, 0.3 g; L-cisteína HCl, 1.0 g; Solução Resazurina (0,1% peso/volume), 1.0 mL; Solução de minerais 1.0 mL, contendo - (tartarato de amônia, 0.22g/L; sulfato de manganês, 0.66g/L; sulfato de ferro, 0.15g/L; sulfato de cobalto, 0.10g/L; sulfato de zinco, 0.10 g/L; sulfato de cobre, 0.64g/L e sulfato de alumínio potássio, 10 mg/L); Solução de vitaminas 0.5 mL, contendo - (biotina, 2.0mg/L; ácido fólico, 2mg/L; tiamina HCl, 5.0mg/L; riboflavina, 5.0mg/L; piridoxina HCl, 10.0mg/L; cianocobalamina, 0.10mg/L, ácido nicotínico, 5.0mg/L; DL-pantotenato de cálcio, 5.0mg/L e ácido tiótico, 5.0mg/L).

3.4. Inóculo

Para cada Erlenmeyer (contendo 50 mL de meio) foi utilizado três quadradinhos de ágar-micélio (1,0 x 1,0 cm). Para cada tubo de ensaio grande com rosca (contendo 30 mL de meio) foi utilizado um quadradinho de ágar-micélio (1,5 x 1,5 cm).

3.5. Produção de Celulases e Condições de Cultivo

O meio líquido basal (descrito no item 3.3) contendo 0.5% (peso seco/vol.) de pasta de papel de filtro moído foi usado para cultivo das dez linhagens de fungos. As enzimas foram produzidas em quatro diferentes condições: tubos de ensaio com rosca (30 mL) sob condições aeróbicas; tubos de ensaio com rosca (30 mL) sob condições microaerofílicas sendo colocados em uma jarra hermeticamente fechada contendo placas de microaerobacter (Probac); Erlenmeyers (50 mL) sob condições aeróbicas, estas culturas foram incubadas por 7, 15, 22 e 30 dias a 30°C, e Erlenmeyers (50 mL) sob agitação, no período de 4, 6 e 10 dias a 30°C e 150 rpm. Após a análise das atividades celulolíticas e xilanolíticas (CMCase, avicelase, β -glicosidase e xilanase) (Pavarina e Durrant, 1996) e também das atividades ligninolíticas (lignina peroxidase, manganês peroxidase, lacase, álcool veratrílico oxidase e peroxidases) (Sette e Durrant, 1996) presentes nos dez microrganismos estudados, cinco linhagens foram selecionadas. No estudo de produção de celulases pelas cinco linhagens selecionadas foi utilizado mesmo meio líquido basal (descrito no item 3.3), porém utilizando-se as seguintes fontes de carbono: Avicel (celulose microcristalina) e xilana (Birchwood); e os seguintes resíduos agroindustriais: bagaço de cana (moído em moinho martelo, peneirado em mesh 1.19 mm) e serragem (mistura de cedrinho, pinheiro e peróba, peneirada em mesh 1.19 mm). Todas as fontes foram utilizadas na concentração de 0.5%. As enzimas foram produzidas em duas condições diferentes: Erlenmeyers (50 mL) sob condições microaerofílicas (os Erlenmeyers foram colocados em jarras hermeticamente fechadas contendo placas de microaerobacter), por um período de 20 e 35 dias e Erlenmeyers (50 mL) sob agitação (6 dias, 30°C e 150 rpm) e posterior microaerofilia (7 dias). Abaixo segue o fluxograma que resume as condições utilizadas para produção das enzimas celulolíticas e xilanolíticas.



3.6. Obtenção das Enzimas

Após o crescimento em papel de filtro, os fluidos sobrenadantes foram centrifugados a 9.000 rpm por 15 minutos a 5°C. Enquanto que as amostras crescidas nas demais fontes de carbono Avicel, xilana, bagaço de cana e serragem os fluidos sobrenadantes foram coletados filtrando-se o meio em lã de vidro, onde o micélio do fungo ficou retido e o filtrado obtido corresponde ao extrato enzimático bruto. Estes extratos foram mantidos em freezer (-20°C) até a determinação das atividades enzimáticas e produtos de fermentação.

3.7. Determinações das Atividades Enzimáticas

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

Nas determinações de carboximetilcelulase e avicelase, a glicose foi utilizada como padrão e para xilanase e β -glucosidase foi utilizada xilose e o-nitrofenol, respectivamente. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como o número de μ moles de açúcar redutor ou μ moles de o-nitrofenol produzido por minuto por mL de enzima (UI/mL), sob as condições do ensaio.

3.7.1. Atividade de Carboximetilcelulase (CMCase)

O extrato enzimático (1.0 mL) foi adicionado à 1.0 mL de solução 1% de carboximetilcelulose (CMC de baixa viscosidade, Sigma, C8758) em tampão acetato 0.05M, pH 5.0, previamente incubada a 50°C, misturado e deixado agir

por 30 minutos. Os açúcares redutores liberados foram determinados pelo método do ácido-3,5-dinitrosalicílico (DNS) conforme Miller et al. (1960), descrito no item 3.10.

3.7.2. Atividade de Avicelase

Foi realizado da mesma maneira que para CMCase, apenas substituindo-se a solução de CMC pela suspensão 1% de Avicel (celulose microcristalina) em tampão acetato 0.05M, pH 5.0. Após incubação a 50°C, por 30 minutos, os açúcares redutores liberados foram determinados pelo método de DNS.

3.7.3. Atividade de Xilanase

A determinação foi realizada da mesma forma que para CMCase, mas utilizando uma suspensão 1% de xilana (Birchwood, Sigma, X0502) em tampão acetato 0.05M, pH 5.0. A reação foi realizada a 50°C durante 30 minutos, medindo-se os açúcares redutores liberados pelo método de DNS.

3.7.4. Atividade de β -glicosidase

A atividade da β -glicosidase (aril- β -D-glicosidase) foi determinada incubando 1.0 mL de o-nitrofenil- β -D-Glucopiranosideo 5mM em tampão acetato 0.05M, pH 5.0, e 0.5 mL de extrato enzimático por 15 min., a 50°C. O o-nitrofenol produzido, foi medido espectrofotometricamente a 410 nm, depois da adição de 2.0 mL NaCO₃ 1M

3.8. Produtos de Fermentação

Os produtos de fermentação foram determinados utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Etanol, ácido cítrico, ácido tartárico, ácido málico, ácido succínico, ácido láctico, ácido fórmico, ácido propiônico e ácido pirúvico foram usados como padrões para comparação e identificação. As condições utilizadas estão descritas no item 3.10.

3.9. Utilização do Substrato

A habilidade dos isolados em utilizar vários compostos solúveis como fonte de carbono foi determinada verificando-se visualmente o aumento do desenvolvimento micelial (massa celular) após três transferências consecutivas a cada 15 dias em um meio líquido contendo substrato potencial: D-glucose; D-xilose; D-manose; L-arabinose; D-frutose e D-galactose. A concentração final do substrato foi de 0.5% (peso seco/vol.).

3.10. Determinações Analíticas

3.10.1. Determinação de açúcares

As determinações de açúcares redutores foram realizadas pelo método do ácido-3,5-dinitrosalicílico (DNS) descrito por Miller et al. (1960), utilizando-se uma curva padrão de glicose (para as determinações de CMCase e Avicelase) e xilose (para a determinação de xilanase). O reagente DNS (2.0 mL) foi adicionado a solução contendo os açúcares (2.0 mL). Esta mistura foi agitada e colocada em banho maria em ebulição por 5 minutos. Em seguida foi realizada a leitura em espectrofotômetro a 550 nm.

3.10.2. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

A detecção dos produtos de fermentação por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) após crescimento dos microrganismos foi realizada utilizando os seguintes padrões de comparação: Etanol, ácido cítrico, ácido tartárico, ácido málico, ácido succínico, ácido láctico, ácido fórmico, ácido propiônico e ácido pirúvico. O equipamento utilizado foi Shimadzu, modelo LC-6A com detector ultravioleta no comprimento de onda de 210 nm, nas seguintes condições: fase móvel H_3PO_4 0.1%, com fluxo de 0.5 mL/min a 30°C; fase estacionária poliestirenodivinilbenzeno; tipo da coluna utilizada foi supelcogel C610H, e o volume injetado de 20 μL .

IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Seleção dos Microrganismos:

Entre as dez linhagens de fungos lignocelulolíticos escolhidas para este estudo foram selecionadas cinco linhagens que apresentaram maior produção de enzimas celulolíticas após crescimento em meio líquido, contendo papel de filtro como fonte de carbono, nas condições aeróbica (tubos e Erlenmeyers) e microaerofílica (tubos) nos intervalos de 7, 15, 22 e 30 dias; e agitação (Erlenmeyer) nos intervalos 4, 6 e 10 dias; os resultados obtidos estão apresentados nas figuras 6, 7, 8, 9 e 10.

Os microrganismos escolhidos foram o fungo *Trichocladium canadense* (Q₁₀), a levedura *Geotrichum* sp (LD), o basidiomiceto (H₂) e os fungos imperfeitos deuteromicetos, linhagens F.20 e LH₅.

4.2. Produção de Celulases

As atividades enzimáticas obtidas, não serão comparadas com outros valores da literatura devido a dificuldade nestas comparações. Este fato pode ser atribuído aos diferentes tipos de substratos utilizados, sua solubilização, diferentes maneiras de expressar a atividade enzimática, e a diferença entre os equipamentos utilizados pelos laboratórios, entre outros fatores (Mandels et al., 1976; Enari e Paavola, 1987).

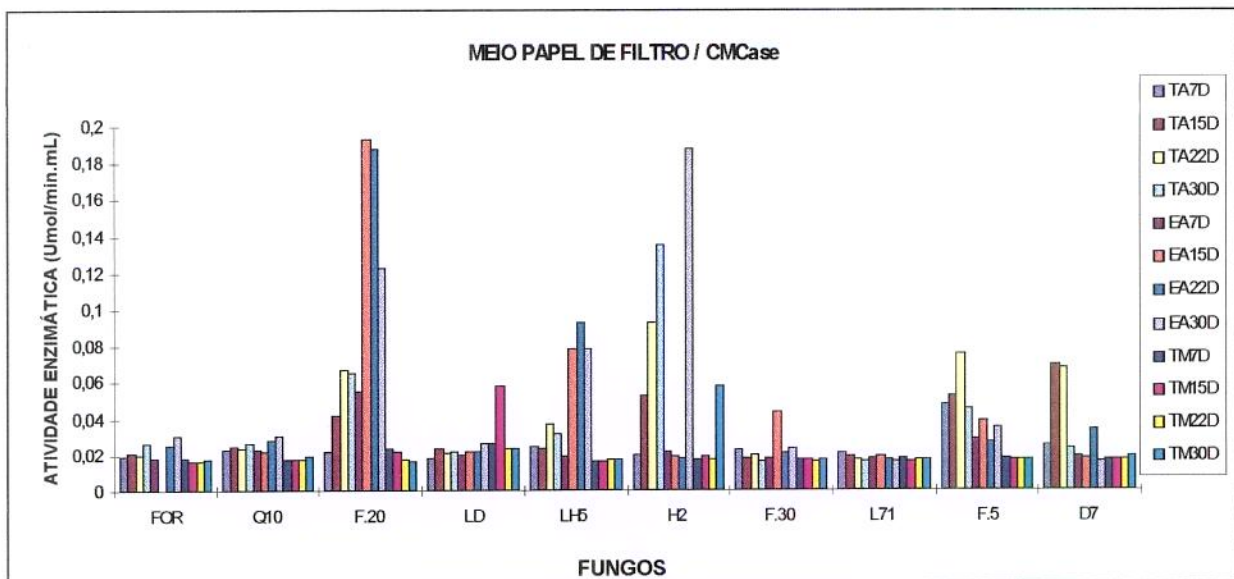


Figura 6. Atividade enzimática: carboximetilcelulase. Microrganismos *Fusarium oxysporum* (FOR), *Trichocladium canadense* (Q₁₀), *Geotrichum* sp (LD), basidiomiceto (H₂), deuteromicetos (F.20 e LH₅) e os não identificados (F.30, L71, F.5 e D7). Crescidos em meio papel de filtro. Nas seguintes condições (TA7D) tubos aeróbicos 7 dias, (TA15D) tubos aeróbicos 15 dias, (TA22D) tubos aeróbicos 22 dias, (TA30D) tubos aeróbicos 30 dias; (EA7D) Erlenmeyers aeróbicos 7 dias, (EA15D) Erlenmeyers aeróbicos 15 dias, (EA22D) Erlenmeyers aeróbicos 22 dias, (EA30D) Erlenmeyers aeróbicos 30 dias; (TM7D) tubos microaerofílicos 7 dias, (TM15D) tubos microaerofílicos 15 dias, (TM22D) tubos microaerofílicos 22 dias, (TM30D) tubos microaerofílicos 30 dias.

Observando-se os valores da atividade enzimática carboximetilcelulase apresentados na figura 6 verificamos que na condição Erlenmeyers sob aeração as linhagens H₂ (0.19 $\mu\text{mol/min.mL}$, 30 dias) e F.20 (0.19 $\mu\text{mol/min.mL}$, 15 dias e 0.18 $\mu\text{mol/min.mL}$, 22 dias), produziram atividade superior aos demais. Podemos verificar portanto que de uma forma geral os microrganismos quando crescidos em tubos e Erlenmeyers sob condições de aeração 15, 22 e 30 dias apresentaram bons resultados para atividade de carboximetilcelulase. Sob a condição microaerofílica a produção de carboximetilcelulase apresentou valores muito baixo para todos os microrganismos.

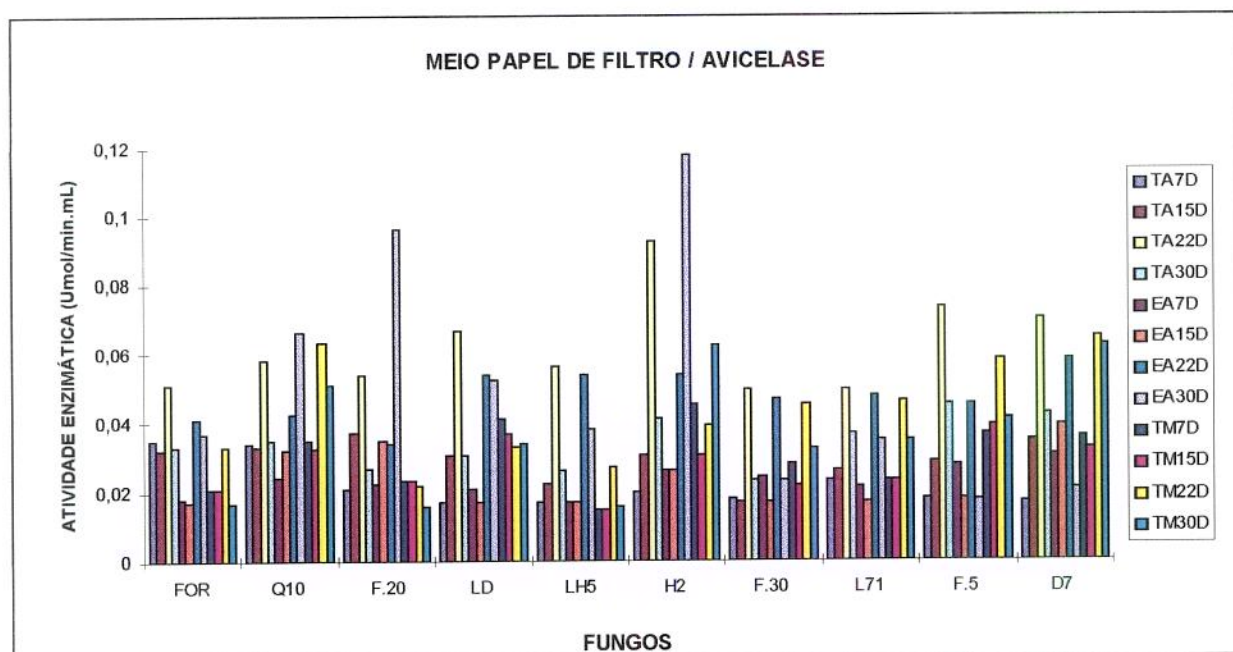


Figura 7. Atividade enzimática: avicelase. Microrganismos *Fusarium oxysporum* (FOR), *Trichocladium canadense* (Q₁₀), *Geotrichum* sp (LD), basidiomiceto (H₂), deuteromicetos (F.20 e LH₅) e os não identificados (F.30, L71, F.5 e D7). Crescidos em meio papel de filtro. Nas seguintes condições (TA7D) tubos aeróbicos 7 dias, (TA15D) tubos aeróbicos 15 dias, (TA22D) tubos aeróbicos 22 dias, (TA30D) tubos aeróbicos 30 dias; (EA7D) Erlenmeyers aeróbicos 7 dias, (EA15D) Erlenmeyers aeróbicos 15 dias, (EA22D) Erlenmeyers aeróbicos 22 dias, (EA30D) Erlenmeyers aeróbicos 30 dias; (TM7D) tubos microaerofílicos 7 dias, (TM15D) tubos microaerofílicos 15 dias, (TM22D) tubos microaerofílicos 22 dias, (TM30D) tubos microaerofílicos 30 dias.

A atividade enzimática avicelase produzida pelas dez linhagens está representada na figura 7, sendo a melhor atividade produzida pelo fungo H₂ (0.12 $\mu\text{mol/min.mL}$), seguido pelo fungo F.20 (0.09 $\mu\text{mol/min.mL}$), ambos na condição Erlenmeyers aeróbicos 30 dias. Os microrganismos apresentaram um perfil semelhante na produção de avicelase em relação aos tubos sob condição aeróbica, sendo que as melhores atividades para todos os microrganismos foram obtidas com 22 dias de crescimento, o microrganismo H₂ (0.09 $\mu\text{mol/min.mL}$) apresentou o valor máximo. Sob condições tubos microaerofílicos 22 dias os microrganismos D7 (0.065 $\mu\text{mol/min.mL}$) e *Trichocladium canadense* (Q₁₀) (0.063 $\mu\text{mol/min.mL}$) destacaram-se entre os demais.

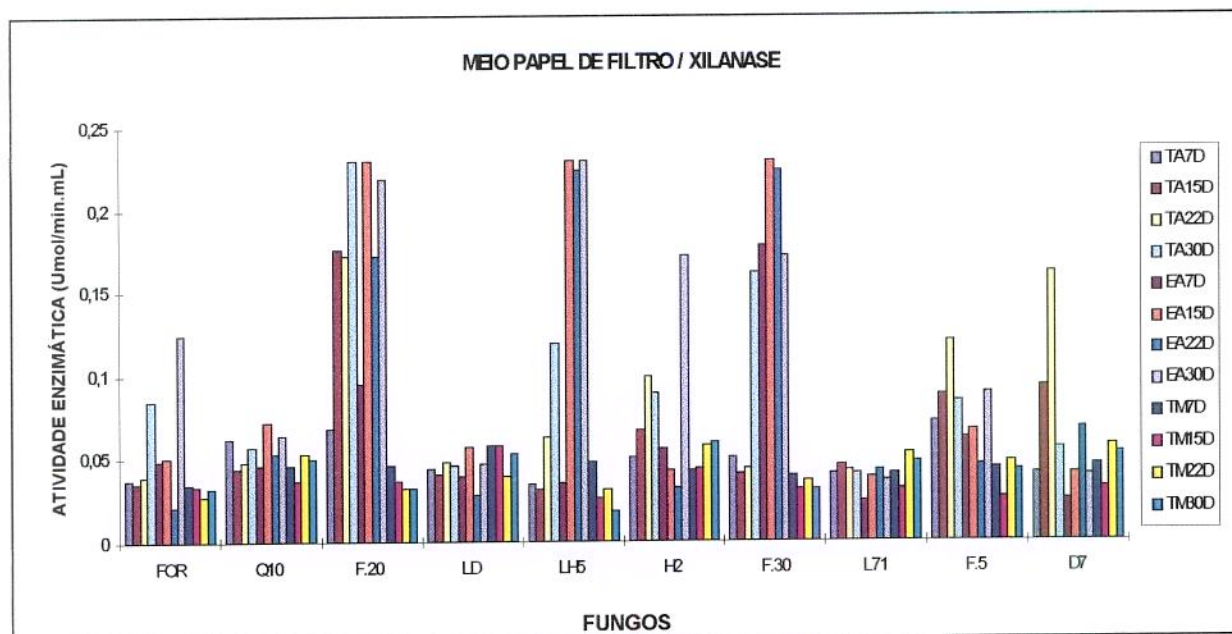


Figura 8. Atividade enzimática: xilanase. Microrganismos *Fusarium oxysporum* (FOR), *Trichocladium canadense* (Q₁₀), *Geotrichum* sp (LD), basidiomiceto (H₂), deuteromicetos (F.20 e LH₅) e os não identificados (F.30, L71, F.5 e D7). Crescidos em meio papel de filtro. Nas seguintes condições (TA7D) tubos aeróbicos 7 dias, (TA15D) tubos aeróbicos 15 dias, (TA22D) tubos aeróbicos 22 dias, (TA30D) tubos aeróbicos 30 dias; (EA7D) Erlenmeyers aeróbicos 7 dias, (EA15D) Erlenmeyers aeróbicos 15 dias, (EA22D) Erlenmeyers aeróbicos 22 dias, (EA30D) Erlenmeyers aeróbicos 30 dias; (TM7D) tubos microaerofílicos 7 dias, (TM15D) tubos microaerofílicos 15 dias, (TM22D) tubos microaerofílicos 22 dias, (TM30D) tubos microaerofílicos 30 dias.

Na figura 8 podemos observar que os melhores resultados para atividade enzimática de xilanase foram obtidos na condição Erlenmeyer sob aeração com as linhagens F.20 (0.23 $\mu\text{mol/min.mL}$, 15 dias), F.30 (0.23 $\mu\text{mol/min.mL}$, 15 dias), LH₅ (0.23 $\mu\text{mol/min.mL}$, 15 dias e 30 dias) e com o microrganismo F.20 (0.23 $\mu\text{mol/min.mL}$) na condição tubos aeróbicos 30 dias. Sob a condição microaerofílica os microrganismos *Geotrichum* sp (LD) (0.06 $\mu\text{mol/min.mL}$, 7 dias e 15 dias), H₂ (0.06 $\mu\text{mol/min.mL}$, 22 dias e 30 dias) e D7 (0.06 $\mu\text{mol/min.mL}$, 22 dias) apresentaram os melhores resultados. Em relação as demais atividades enzimáticas a atividade de xilanase foi a que apresentou os valores mais altos, para a maioria dos microrganismos.

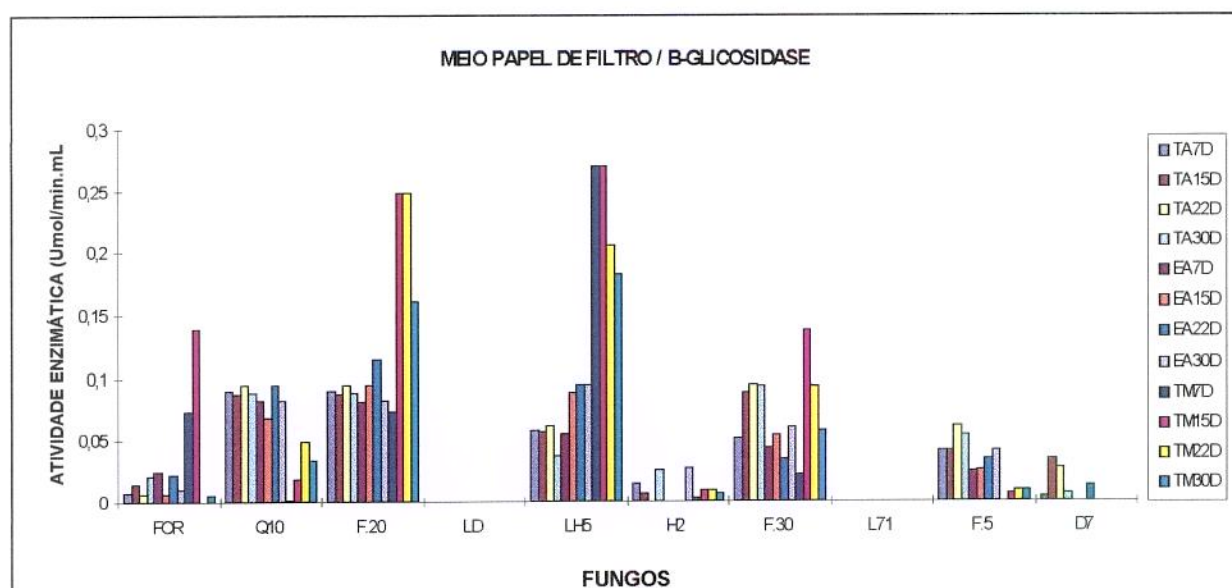


Figura 9. Atividade enzimática: β -glicosidase. Microrganismos *Fusarium oxysporum* (FOR), *Trichocladium canadense* (Q₁₀), *Geotrichum* sp (LD), basidiomiceto (H₂), deuteromicetos (F.20 e LH₅) e os não identificados (F.30, L71, F.5 e D7). Crescidos em meio papel de filtro. Nas seguintes condições (TA7D) tubos aeróbicos 7 dias, (TA15D) tubos aeróbicos 15 dias, (TA22D) tubos aeróbicos 22 dias, (TA30D) tubos aeróbicos 30 dias; (EA7D) Erlenmeyers aeróbicos 7 dias, (EA15D) Erlenmeyers aeróbicos 15 dias, (EA22D) Erlenmeyers aeróbicos 22 dias, (EA30D) Erlenmeyers aeróbicos 30 dias; (TM7D) tubos microaerofílicos 7 dias, (TM15D) tubos microaerofílicos 15 dias, (TM22D) tubos microaerofílicos 22 dias, (TM30D) tubos microaerofílicos 30 dias.

A atividade enzimática β -glicosidase pode ser observada na figura 9, sendo os microrganismos LH₅ (0.27 $\mu\text{mol}/\text{min.mL}$, 7 dias e 15 dias), F.20 (0.25 $\mu\text{mol}/\text{min.mL}$, 15 dias e 22 dias), F.30 (0.14 $\mu\text{mol}/\text{min.mL}$, 15 dias) e *Fusarium oxysporum* (FOR) (0.14 $\mu\text{mol}/\text{min.mL}$, 15 dias) os que apresentaram os melhores resultados sob condição tubos microaerofílicos. Os microrganismos L71, D7, H₂ e *Geotrichum* sp (LD) apresentaram valores baixos de atividade β -glicosidase em todas as condições quando comparados com os demais microrganismos. Condições aeróbicas parecem não favorecer a produção de β -glicosidase. Os microrganismos LH₅ e F.20 destacam-se por apresentarem alta produção de β -glicosidase.

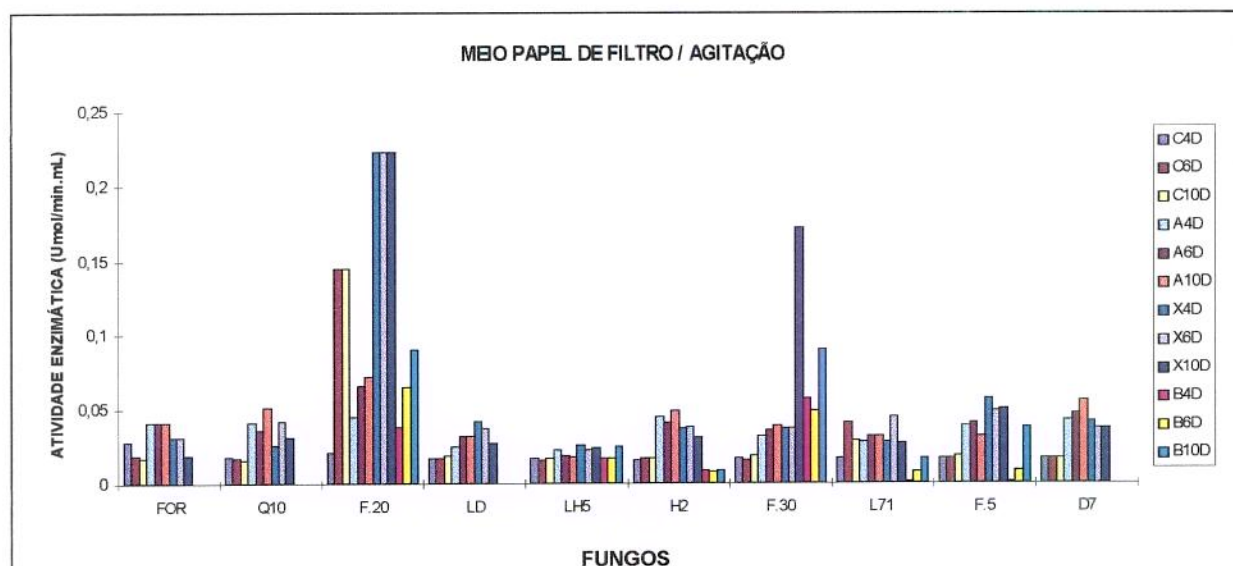


Figura 10. Atividades enzimáticas dos microrganismos *Fusarium oxysporum* (FOR), *Trichocladium canadense* (Q₁₀), *Geotrichum* sp (LD), basidiomiceto (H₂), deuteromicetos (F.20 e LH₅) e os não identificados (F.30, L71, F.5 e D7). Crescidos em meio papel de filtro. Na condição Erlenmeyers sob agitação 150 rpm a 30°C. Atividades determinadas: (C4D) carboximetilcelulase 4 dias, (C6D) carboximetilcelulase 6 dias, (C10D) carboximetilcelulase 10 dias, (A4D) avicelase 4 dias, (A6D) avicelase 6 dias, (A10D) avicelase 10 dias, (X4D) xilanase 4 dias, (X6D) xilanase 6 dias, (X10D) xilanase 10 dias, (B4D) β-glicosidase 4 dias, (B6D) β-glicosidase 6 dias, (C4D) β-glicosidase 10 dias.

De acordo com a figura 10 quando os microrganismos foram submetidos a agitação por um período máximo de 10 dias, observamos que a linhagem F.20 (0.22 μmol/min.mL, atividade de xilanase, 4, 6 e 10 dias) apresentou bons resultados para as quatro atividades enzimáticas determinadas. O microrganismo F.30 (0.17 μmol/min.mL) apresentou produção de xilanase alta com 10 dias de crescimento. Com relação aos demais microrganismos eles não apresentaram de uma forma geral atividades enzimáticas significativas.

4.2.1. Influência da Fonte de Carbono

As figuras (11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 e 19) apresentam os resultados obtidos quando os microrganismos cresceram em diferentes fontes de carbonos: Avicel (celulose microcristalina), xilana, bagaço de cana e serragem; sob condições microaerofilicas a 30°C, por um período de 20 e 35 dias, e sob

condição de agitação (6 dias) e posterior microaerofilia (7 dias). As atividades enzimáticas determinadas foram: carboximetilcelulase, avicelase, xilanase e β -glicosidase.

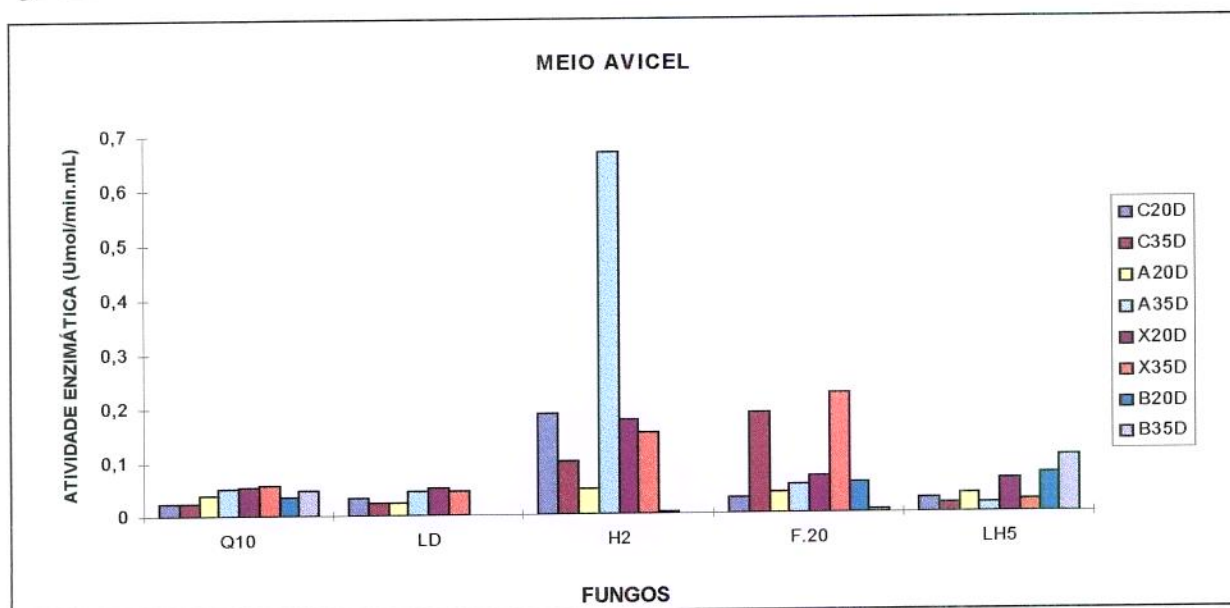


Figura 11. Atividades enzimáticas dos microrganismos *Trichocladium canadense* (Q₁₀), *Geotrichum* sp (LD), basidiomiceto (H₂), deuteromicetos (F.20 e LH₅). Crescidos em meio Avicel. Na condição Erlenmeyers microaerofilicos. Atividades determinadas: (C20D) carboximetilcelulase 20 dias, (C35D) carboximetilcelulase 35 dias, (A20D) avicelase 20 dias, (A35D) avicelase 35 dias, (X20D) xilanase 20 dias, (X35D) xilanase 35 dias, (B20D) β -glicosidase 20 dias, (B35D) β -glicosidase 35 dias.

Como pode ser observado na figura 11 as linhagens H₂ e F.20 produziram maior atividade de enzimas celulolíticas do que as linhagens *Trichocladium canadense* (Q₁₀), *Geotrichum* sp (LD) e LH₅. A linhagem H₂ produziu alta atividade de avicelase (0.67 $\mu\text{mol/min.mL}$) enquanto que a linhagem F.20 produziu alta atividade de xilanase (0.22 $\mu\text{mol/min.mL}$) ambas após 35 dias de crescimento. A linhagem LH₅ apresentou os melhores resultados para produção de atividade β -glicosidase 35 dias (0.11 $\mu\text{mol/min.mL}$), quando comparado com as demais linhagens. Os microrganismos *Trichocladium canadense* (Q₁₀) e *Geotrichum* sp (LD) apresentaram baixas atividades enzimáticas quando crescidos no meio contendo Avicel enquanto que as linhagens F.20 e H₂ parecem conseguir utilizar esta fonte de carbono produzindo altas atividades.

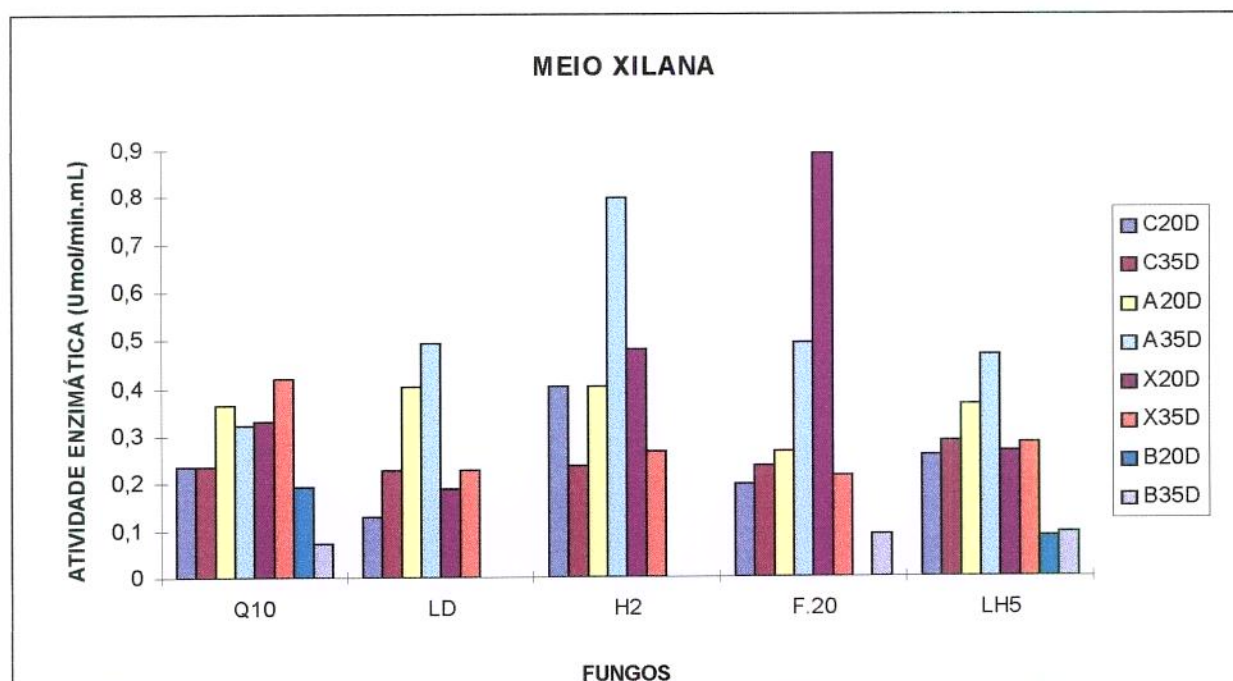


Figura 12. Atividades enzimáticas dos microrganismos *Trichocladium canadense* (Q₁₀), *Geotrichum* sp (LD), basidiomiceto (H₂), deuteromicetos (F.20 e LH₅). Crescidos em meio xilana. Na condição Erlenmeyers microaerofílicos. Atividades determinadas: (C20D) carboximetilcelulase 20 dias, (C35D) carboximetilcelulase 35 dias, (A20D) avicelase 20 dias, (A35D) avicelase 35 dias, (X20D) xilanase 20 dias, (X35D) xilanase 35 dias, (B20D) β -glicosidase 20 dias, (B35D) β -glicosidase 35 dias.

Na figura 12 podemos observar o comportamento das cinco linhagens quando crescidas em meio contendo xilana como fonte de carbono. Analisando os valores das atividades enzimáticas apresentadas, observamos que todas as linhagens apresentaram bons resultados, sendo que o melhor resultado foi obtido com a linhagem F.20 com atividade de xilanase ($0.9 \mu\text{mol}/\text{min.mL}$, 20 dias); seguido do microrganismo H₂ com atividade de avicelase ($0.8 \mu\text{mol}/\text{min.mL}$, 35 dias). O meio xilana apresentou ser um meio de fácil hidrólise pois todas as linhagens apresentaram atividade enzimática significativa, apenas produção de β -glicosidase não foi encontrada nos microrganismos H₂ e *Geotrichum* sp (LD). Enquanto que o microrganismo *T. canadense* (Q₁₀) apresentou a maior atividade de β -glicosidase ($0.2 \mu\text{mol}/\text{min.mL}$, 20 dias) entre os demais.

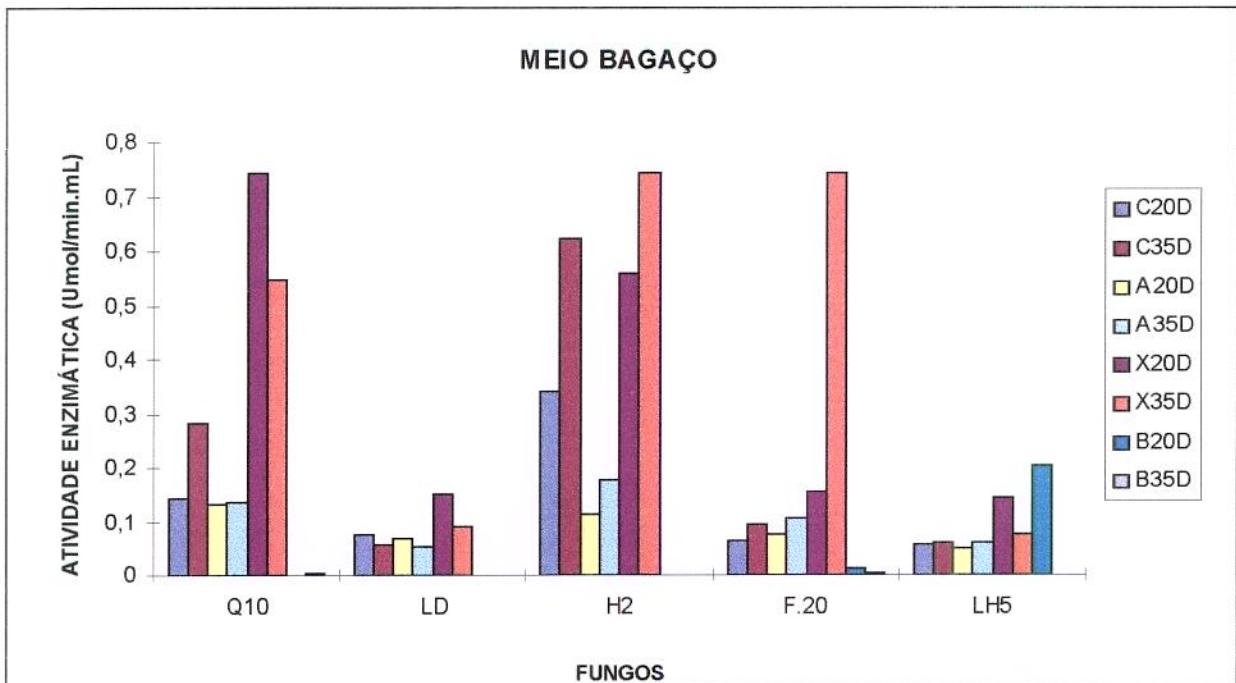


Figura 13. Atividades enzimáticas dos microrganismos *Trichocladium canadense* (Q₁₀), *Geotrichum* sp (LD), basidiomiceto (H₂), deuteromicetos (F.20 e LH₅). Crescidos em meio bagaço de cana. Na condição Erlenmeyers microaerofílicos. Atividades determinadas: (C20D) carboximetilcelulase 20 dias, (C35D) carboximetilcelulase 35 dias, (A20D) avicelase 20 dias, (A35D) avicelase 35 dias, (X20D) xilanase 20 dias, (X35D) xilanase 35 dias, (B20D) β-glicosidase 20 dias, (B35D) β-glicosidase 35 dias.

As melhores atividades enzimáticas obtidas após o crescimento em bagaço de cana foram observadas no microrganismo H₂ com o máximo de atividade de carboximetilcelulase (0.62 μmol/min.mL, 35 dias) e xilanase (0.75 μmol/min.mL 35 dias), como mostra a figura 13, a linhagem F.20 também apresentou alta atividade de xilanase (0.75 μmol/min.mL) com 35 dias de crescimento, enquanto que o microrganismo *Trichocladium canadense* (Q₁₀) apresentou alta atividade de xilanase (0.75 μmol/min.mL) após 20 dias de crescimento. O microrganismo que apresentou melhor resultado para atividade de β-glicosidase (0.2 μmol/min.mL, 20 dias) foi o LH₅. As linhagens H₂ e *T. canadense* (Q₁₀) parecem ter suas atividades enzimáticas estimuladas quando crescidas em meio bagaço de cana sob condição microaerofílica. A atividade de β-glicosidase foi significativa apenas com o microrganismo LH₅.

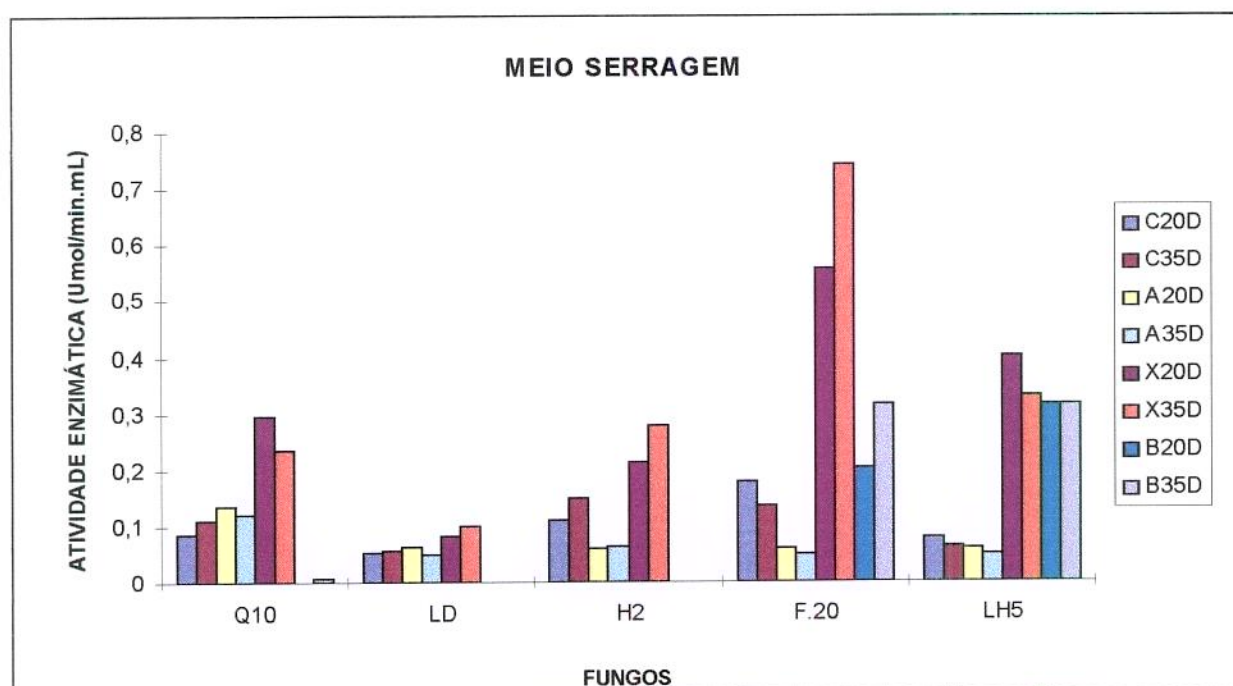


Figura 14. Atividades enzimáticas dos microrganismos *Trichocladium canadense* (Q₁₀), *Geotrichum* sp (LD), basidiomiceto (H₂), deuteromicetos (F.20 e LH₅). Crescidos em meio serragem. Na condição Erlenmeyers microaerofilicos. Atividades determinadas: (C20D) carboximetilcelulase 20 dias, (C35D) carboximetilcelulase 35 dias, (A20D) avicelase 20 dias, (A35D) avicelase 35 dias, (X20D) xilanase 20 dias, (X35D) xilanase 35 dias, (B20D) β -glicosidase 20 dias, (B35D) β -glicosidase 35 dias.

Como pode ser visto na figura 14, entre as linhagens testadas a linhagem F.20 produziu maior atividade de enzimas celulolíticas quando crescida em meio contendo serragem como fonte de carbono. A linhagem F.20 produziu alta atividade de xilanase ($0.75 \mu\text{mol/min.mL}$) após 35 dias de crescimento. A linhagem LH₅ apresentou alta atividade de β -glicosidase ($0.32 \mu\text{mol/min.mL}$) após 20 dias e 35 dias de crescimento, a linhagem F.20 também produziu alta atividade de β -glicosidase ($0.31 \mu\text{mol/min.mL}$) após 35 dias de crescimento. A maior produção de atividade enzimática observada em todos os microrganismos foi xilanase (ambos 20 e 35 dias), isto pode ser devido o meio serragem ser um meio complexo, com a presença de outros constituintes da madeira, como lignina e hemicelulose. Os fungos F.20 e LH₅ apresentaram de uma forma geral atividades enzimáticas elevadas.

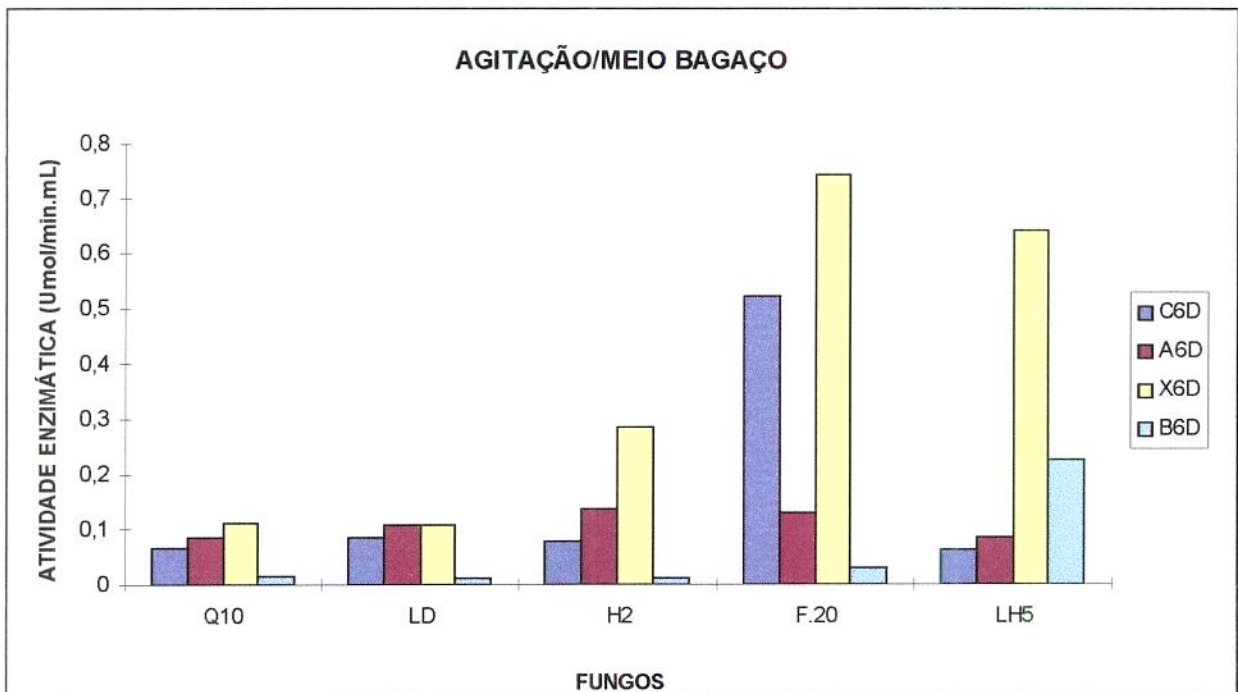


Figura 15. Atividades enzimáticas dos microrganismos *Trichocladium canadense* (Q₁₀), *Geotrichum* sp (LD), basidiomiceto (H₂), deuteromicetos (F.20 e LH₅). Crescidos em meio bagaço de cana. Na condição Erlenmeyers sob agitação 150 rpm a 30°C. Atividades determinadas: (C6D) carboximetilcelulase 6 dias, (A6D) avicelase 6 dias, (X6D) xilanase 6 dias, (B6D) β-glicosidase 6 dias,

De acordo com a figura 15, o fungo F.20 foi o que apresentou as maiores atividades de xilanase (0.75 $\mu\text{mol/min.mL}$) e carboximetilcelulase (0.52 $\mu\text{mol/min.mL}$), enquanto que o máximo de atividade de β-glicosidase (0.22 $\mu\text{mol/min.mL}$) foi obtida com o microrganismo LH₅ quando os microrganismos foram crescidos em meio bagaço de cana sob agitação a 150 rpm a 30°C. Todas as linhagens apresentaram bons resultados para produção de xilanase, destacando-se o microrganismo F.20. Comparando com o meio bagaço de cana sob condição microaerofílica a produção da atividade xilanase (após 35 dias de incubação) foi mantida pelo microrganismo F.20 nas condições de agitação. Os demais microrganismos também apresentaram seus máximos repetidos quando as duas condições foram comparadas, indicando que 6 dias de agitação é suficiente para estimular a produção das enzimas celulolíticas e xilanolíticas nos microrganismos crescidos no meio bagaço de cana.

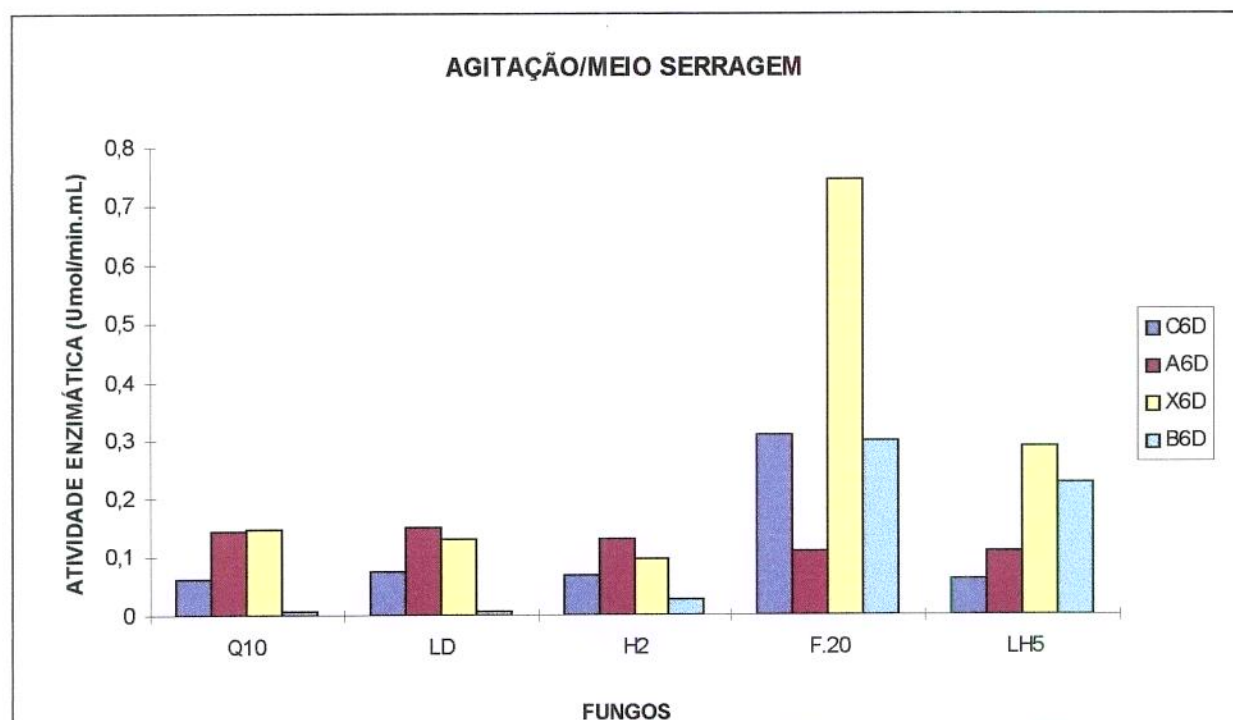


Figura 16. Atividades enzimáticas dos microrganismos *Trichocladium canadense* (Q₁₀), *Geotrichum* sp (LD), basidiomiceto (H₂), deuteromicetos (F.20 e LH₅). Crescidos em meio serragem. Na condição Erlenmeyers sob agitação 150 rpm a 30°C. Atividades determinadas: (C6D) carboximetilcelulase 6 dias, (A6D) avicelase 6 dias, (X6D) xilanase 6 dias, (B6D) β-glicosidase 6 dias,

Observando-se os valores das atividades enzimáticas apresentadas na figura 16 verificamos que a linhagem F.20 e o microrganismo LH₅ apresentaram resultados superiores quando comparados com os demais microrganismos, apresentando máximo de atividade xilanase (0.75 e 0.29 $\mu\text{mol}/\text{min.mL}$) e β-glicosidase (0.31 e 0.22 $\mu\text{mol}/\text{min.mL}$), respectivamente. A linhagem F.20 também apresentou alta atividade de carboximetilcelulase (0.3 $\mu\text{mol}/\text{min.mL}$). A maior atividade de avicelase (0.15 $\mu\text{mol}/\text{min.mL}$) foi obtida com o microrganismo *Geotrichum* sp (LD). Em meio de cultivo contendo serragem sob agitação os microrganismos melhores produtores de xilanase foram as linhagens F.20 e LH₅, enquanto que as demais linhagens *Trichocladium canadense* (Q₁₀), *Geotrichum* sp (LD) e H₂ foram melhores produtores de avicelase. Relacionando esta condição com a condição microaerofílica o perfil das atividades parece não ser

alterado, podendo destacar os microrganismos F.20 e LH₅ como produtores de xilanase e β -glicosidase.

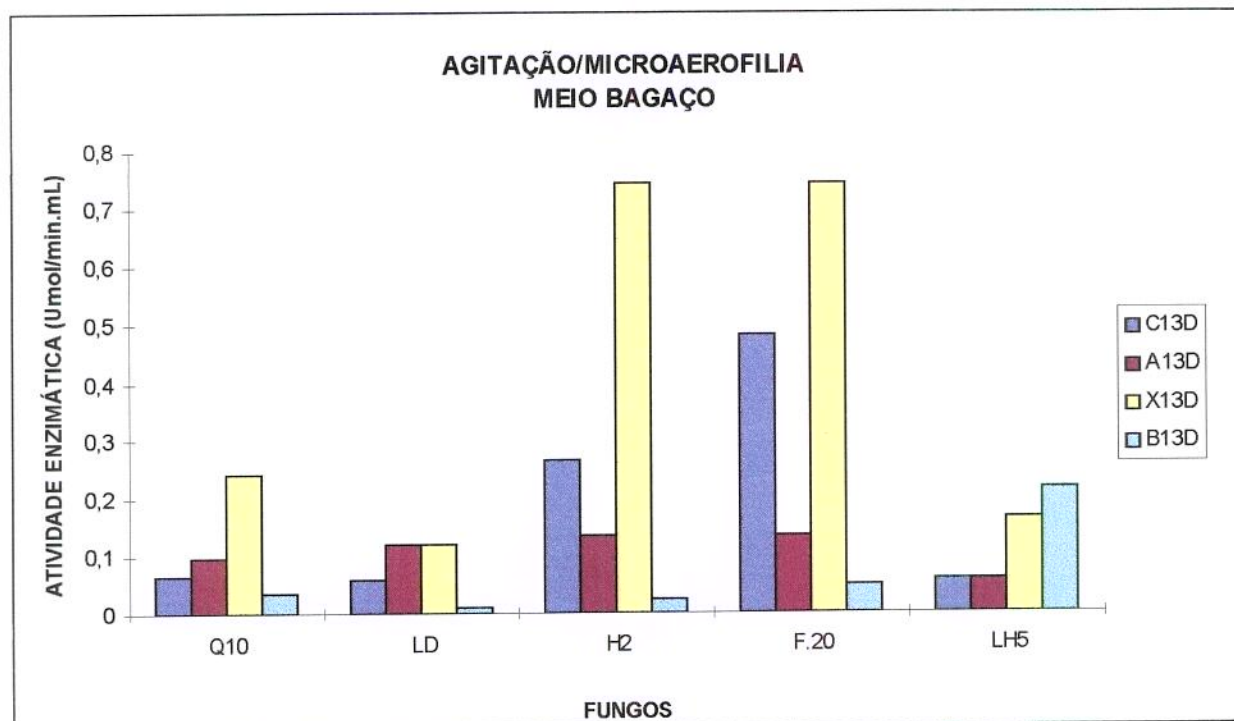


Figura 17. Atividades enzimáticas dos microrganismos *Trichocladium canadense* (Q₁₀), *Geotrichum* sp (LD), basidiomiceto (H₂), deuteromicetos (F.20 e LH₅). Crescidos em meio bagaço de cana. Na condição Erlenmeyers sob agitação 150 rpm a 30°C (6 dias) e posterior microaerofilia (7 dias). Atividades determinadas: (C13D) carboximetilcelulase 13 dias, (A13D) avicelase 13 dias, (X13D) xilanase 13 dias, (B13D) β -glicosidase 13 dias,

De acordo com a figura 17 os microrganismos H₂ e F.20 apresentam altas atividades enzimáticas de carboximetilcelulase (0.26 e 0.5 $\mu\text{mol}/\text{min.mL}$) e de xilanase (0.75 e 0.75 $\mu\text{mol}/\text{min.mL}$) respectivamente, já o microrganismo LH₅ apresentou alta atividade de β -glicosidase (0.22 $\mu\text{mol}/\text{min.mL}$), quando crescido em meio bagaço de cana sob agitação e posterior microaerofilia. Exceto para o microrganismo LH₅ que apresentou máximo de atividade β -glicosidase, os demais apresentaram seus máximos na produção de xilanase. Quando comparamos o meio bagaço de cana sob condição agitação / microaerofilia com o meio apenas sob agitação podemos observar que a atividade de xilanase aumenta nos microrganismos *Trichocladium candense* (Q₁₀) e H₂. As demais produções

permaneceram estáveis, observamos apenas um aumento na produção de carboximetilcelulase com o microrganismo H₂.

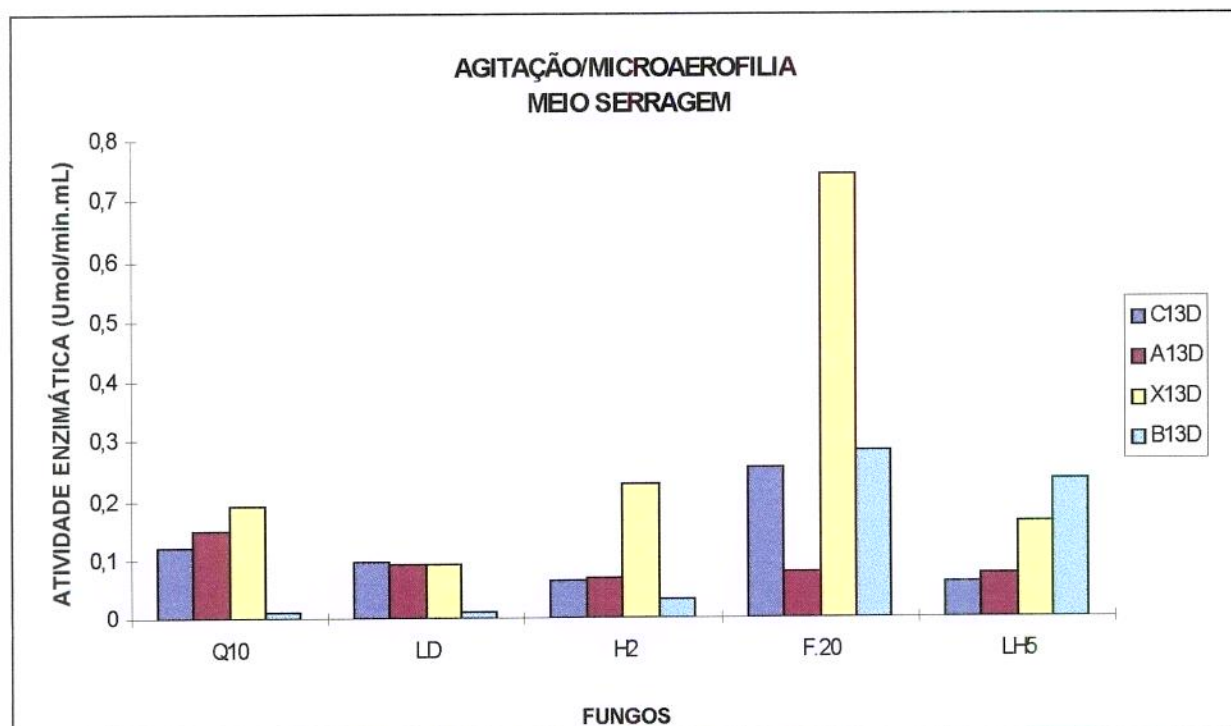


Figura 18. Atividades enzimáticas dos microrganismos *Trichocladium canadense* (Q₁₀), *Geotrichum* sp (LD), basidiomiceto (H₂), deuteromicetos (F.20 e LH₅). Crescidos em meio serragem. Na condição Erlenmeyers sob agitação 150 rpm a 30°C (6 dias) e posterior microaerofilia (7 dias). Atividades determinadas: (C13D) carboximetilcelulase 13 dias, (A13D) avicelase 13 dias, (X13D) xilanase 13 dias, (B13D) β-glicosidase 13 dias,

Após crescimento em meio serragem sob agitação por 6 dias e microaerofilia por 7 dias, o microrganismo F.20 apresentou atividades enzimáticas xilanase (0.75 μmol/min.mL), carboximetilcelulase (0.25 μmol/min.mL) e β-glicosidase (0.28 μmol/min.mL) superiores quando comparado com os demais microrganismos. Entretanto a atividade avicelase (0.15 μmol/min.mL) foi maior para o microrganismo *Trichocladium canadense* (Q₁₀). De uma forma geral todos os microrganismos produziram xilanase em quantidades razoáveis. Analisando a condição agitação com a condição agitação / microaerofilia podemos observar que os microrganismos F.20 e o LH₅ continuam se destacando em relação a produção de β-glicosidase. Nesta condição houve um

aumento da atividade de xilanase nos microrganismos *T. canadense* (Q₁₀) e H₂, indicando que a condição agitação / microaerofílica pode estimular a produção enzimática.

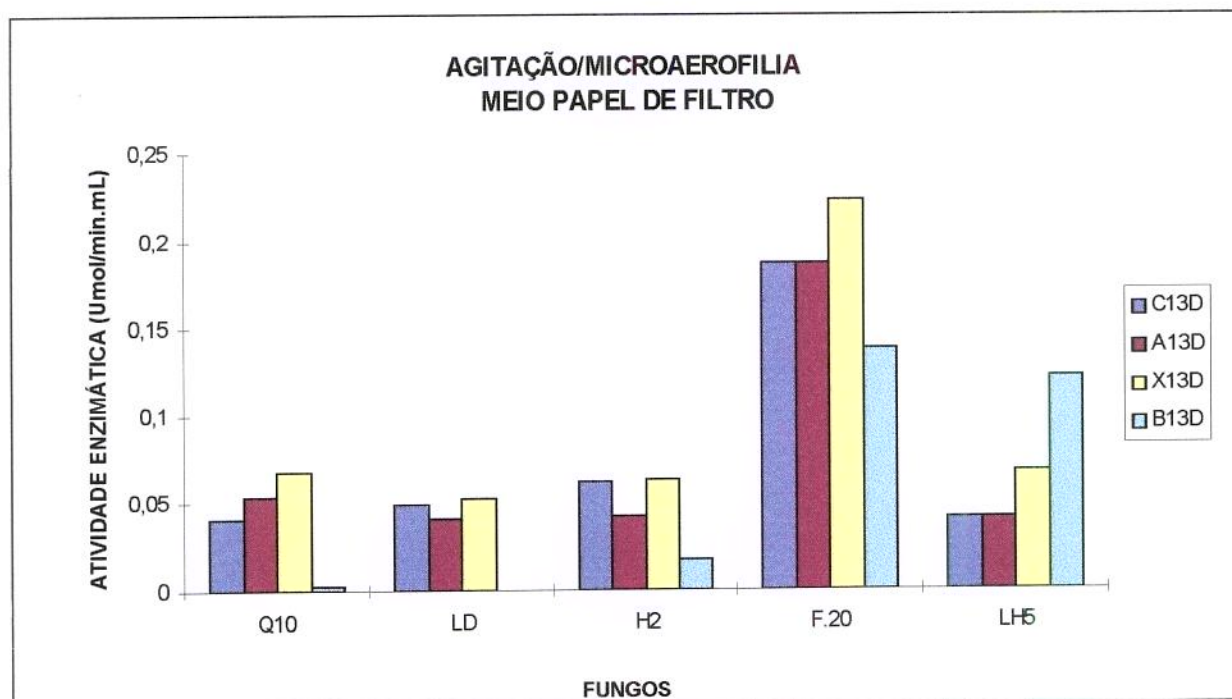


Figura 19. Atividades enzimáticas dos microrganismos *Trichocladium canadense* (Q₁₀), *Geotrichum* sp (LD), basidiomiceto (H₂), deuteromicetos (F.20 e LH₅). Crescidos em meio papel de filtro. Na condição Erlenmeyers sob agitação 150 rpm a 30°C (6 dias) e posterior microaerofilia (7 dias). Atividades determinadas: (C13D) carboximetilcelulase 13 dias, (A13D) avicelase 13 dias, (X13D) xilanase 13 dias, (B13D) β-glicosidase 13 dias,

Como pode ser observado na figura 19, onde os microrganismos foram crescidos em meio contendo papel de filtro como fonte de carbono, sob condições de agitação e posterior microaerofilia, a linhagem F.20 apresentou maior produção de enzimas celulolíticas (0.22 μmol/min.mL, atividade de xilanase). Os microrganismos F.20 (0.14 μmol/min.mL) e LH₅ (0.12 μmol/min.mL) foram os que apresentaram os melhores produções de β-glicosidase. Entre os microrganismos crescidos em meio contendo papel de filtro como fonte de carbono sob condições de agitação e posterior microaerofilia o microrganismo F.20 foi o que produziu maiores atividades enzimáticas.

4.3. Utilização do Substrato

As linhagens selecionadas foram crescidas em seis substratos diferentes; D-glicose, D-xilose, D-frutose, D-manose, D-galactose e L-arabinose, e submetidas a três transferências consecutivas, conforme descrito no item 3.9. A habilidade destes microrganismos em utilizar estas fontes de carbonos foi determinada verificando-se visualmente o aumento da massa micelial.

O desenvolvimento da massa celular apresentou um aumento significativo entre a primeira e a segunda transferência, enquanto que entre a segunda e a terceira transferência o desenvolvimento foi mais lento. A tabela 3 apresenta o crescimento após a segunda transferência.

Tabela 3. Utilização dos substratos após duas transferências.

Linhagem	Glicose	Frutose	Xilose	Arabinose	Manose	Galactose
H ₂	++	+++	+++	++	++	++
Q ₁₀	++	++	++	+	++	+
F.20	++	+++	+++	+++	+++	++
LH ₅	+	++	+	+	+	+
LD	++	++	+++	+	+	+

+++ Crescimento ótimo; ++ Crescimento bom; + Crescimento fraco.

De acordo com a tabela 3 o microrganismo linhagem F.20 e o microrganismo basidiomiceto H₂ foram os que apresentaram maior desenvolvimento da massa micelial na maioria dos açúcares, possuindo capacidade de utilizar tanto pentoses como hexoses.

4.4. Produtos de Fermentação

Os produtos de fermentação presentes nos sobrenadantes foram determinados através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), após 35 dias de crescimento nos meios de cultivo papel de filtro sob condições aeróbicas (tubos e Erlenmeyers) e microaerofilicas (tubos); Avicel, xilana, bagaço de cana e serragem sob condições microaerofilicas (Erlenmeyer) e papel de filtro, bagaço de cana e serragem sob condição agitação/microaerofilia (Erlenmeyer). A determinação foi feita somente comparando os tempos de retenção obtidos da análise com os tempos de retenção dos padrões preparados no laboratório, os quais estão apresentados na tabela 4.

Tabela 4. Tempo de retenção dos padrões.

PADRÃO	TEMPO DE RETENÇÃO LITERATURA (minutos)	TEMPO DE RETENÇÃO OBTIDO (minutos)
Ác. Acético	19,25	19,256
Ác. Cítrico	11	11,035
Ác. Fórmico	17,5	17,704
Ác. Láctico	16	16,036
Ác. Málico	12,9	12,949
Ác. Pirúvico	-	12,329
Ác. Propiônico	22,5	23,095
Ác. Succínico	15,6	16,036
Ác. Tartárico	11,7	11,666
Etanol	25	24,49

A figura 20 apresenta o perfil cromatográfico dos produtos de fermentação produzidos pelo microrganismo *Geotrichum* sp (LD) em meio papel de filtro sob condição agitação/microaerofilia. O tempo de retenção do produto etanol neste exemplo foi de 24,50 minutos.

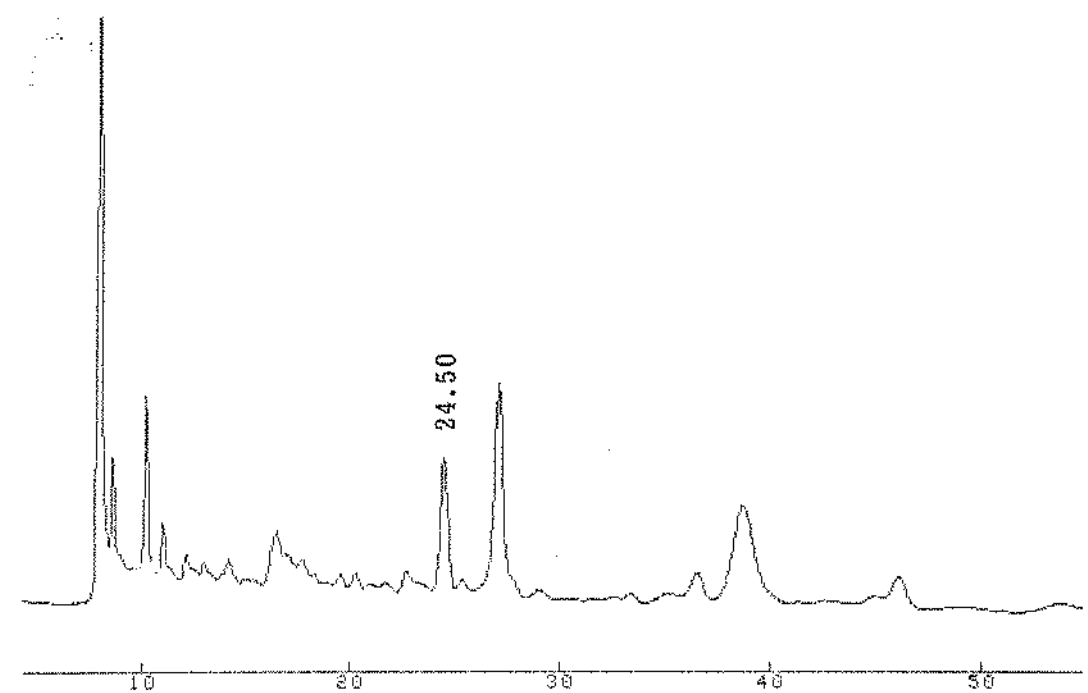


Figura 20. Perfil cromatográfico da produção de etanol quando o microrganismo *Geotrichum* sp (LD) foi inoculado em meio papel de filtro sob condição agitação (6 dias) / microaerofilia (7 dias).

Condições: Coluna: Supelcogel C610H 30 cm x 7.8 mm

Fase Móvel: H_3PO_4 0.1%

Detector: Ultravioleta 210 nm

Quantidade injetada de amostra: 20 μL

Tabela 5. Produtos de fermentação produzidos pelo microrganismo H_2 em diferentes fontes de carbonos.

Produtos	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
Ác. Acético	D	D	D	ND	ND	D	ND	D	D	ND
Ác. Cítrico	D	D	D	ND	ND	ND	ND	D	ND	D
Ác. Fôrmico	ND	ND	D	D	D	ND	ND	ND	ND	ND
Ác. Láctico	ND	ND	ND	D	ND	D	ND	ND	ND	ND
Ác. Málico	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	D
Ác. Pirúvico	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Ác. Propiônico	ND	D	D	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Ác. Succínico	ND	ND	ND	ND	D	ND	ND	ND	ND	D
Ác. Tartárico	ND	ND	ND	ND	ND	D	ND	ND	ND	ND
Etanol	D	D	D	ND	ND	ND	D	ND	ND	ND

A: meio papel de filtro, condição aeróbica, Erlenmeyers, 30 dias;

B: meio papel de filtro, condição aeróbica, tubos de ensaio, 30 dias;

C: meio papel de filtro, condição microaerofílica, tubos de ensaio, 30 dias;

D: meio bagaço de cana, condição microaerofílica, Erlenmeyers, 35 dias;

E: meio serragem, condição microaerofílica, Erlenmeyers, 35 dias;

F: meio avicel, condição microaerofílica, Erlenmeyers, 35 dias;

G: meio xilana, condição microaerofílica, Erlenmeyers, 35 dias;

H: meio papel de filtro, condição agitação (6 dias)/microaerofílica (7 dias), Erlenmeyers;

I: meio bagaço de cana, condição agitação (6 dias)/microaerofílica (7 dias), Erlenmeyers;

J: meio serragem, condição agitação (6 dias)/microaerofílica (7 dias), Erlenmeyers.

ND: Não Detectado e D: Detectado.

O microrganismo H_2 como pode ser observado na tabela 5 produziu etanol e outros produtos de fermentação nas diferentes condições determinadas. Na condição agitação/microaerofilia não foi observado produção de etanol em nenhum dos meios utilizados. O meio papel de filtro demonstrou ser a fonte de carbono mais viável para produção de etanol. Pode estar relacionado com a alta produção de enzimas celulolíticas (carboximetilcelulase, avicelase e xilanase) as quais foram obtidas quando o extrato enzimático da condição Erlenmeyers sob aeração (30 dias) foi analisado. Quando o microrganismo foi inoculado em meio xilana produziu alta atividade de avicelase (35 dias).

Tabela 6. Produtos de fermentação produzidos pelo microrganismo *Trichocladium canadense* (Q₁₀) em diferentes fontes de carbonos.

Produtos	A	B	C	D	E	F	G	H
Ác. Acético	ND	D	ND	ND	ND	D	ND	ND
Ác. Cítrico	ND	ND	D	D	ND	D	D	D
Ác. Fórmico	ND	D	D	ND	D	ND	ND	D
Ác. Láctico	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Ác. Málico	ND	ND	ND	ND	ND	D	D	D
Ác. Pirúvico	ND	D	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Ác. Propiônico	ND	D	ND	ND	ND	D	ND	ND
Ác. Succínico	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	D
Ác. Tartárico	ND	D	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Etanol	ND	ND	ND	D	D	D	ND	D

A: meio papel de filtro, condição aeróbica, Erlenmeyers, 30 dias;

B: meio papel de filtro, condição aeróbica, tubos de ensaio, 30 dias;

C: meio papel de filtro, condição microaerofílica, tubos de ensaio, 30 dias;

D: meio avicel, condição microaerofílica, Erlenmeyers, 35 dias;

E: meio xilana, condição microaerofílica, Erlenmeyers, 35 dias;

F: meio papel de filtro, condição agitação (6 dias)/microaerofílica (7 dias), Erlenmeyers;

G: meio bagaço de cana, condição agitação (6 dias)/microaerofílica (7 dias), Erlenmeyers;

H: meio serragem, condição agitação (6 dias)/microaerofílica (7 dias), Erlenmeyers.

ND: Não Detectado e D: Detectado.

O microrganismo *T. canadense* (Q₁₀) de acordo com a tabela 6 não apresentou produção de etanol quando crescido em meio contendo papel de filtro sob condição aeróbica e microaerofílica, porém apresentou produção em meio papel de filtro e serragem quando submetido a agitação e posterior microaerofilia. Também apresentou produção de etanol quando crescido em meio Avicel e xilana sob condições microaerofílicas, nestas condições o fungo *T. canadense* (Q₁₀) apresentou produção de xilanase. Outros produtos de fermentação foram obtidos nas diferentes condições.

Tabela 7. Produtos de fermentação produzidos pelo microrganismo LH₅ em diferentes fontes de carbonos.

Produtos	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
Ác. Acético	ND	ND	ND	ND	ND	ND	D	ND	ND	ND
Ác. Cítrico	ND	ND	D	ND	ND	D	ND	D	ND	D
Ác. Fórmico	ND	ND	D	D	D	ND	D	ND	ND	ND
Ác. Láctico	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Ác. Málico	ND	D	ND	ND	ND	ND	ND	D	D	D
Ác. Pirúvico	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Ác. Propiônico	ND	ND	ND	ND	ND	ND	D	D	ND	ND
Ác. Succínico	ND	ND	ND	ND	D	ND	ND	ND	ND	ND
Ác. Tartárico	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Etanol	D	D	ND	ND	ND	D	D	D	D	D

A: meio papel de filtro, condição aeróbica, Erlenmeyers, 30 dias;

B: meio papel de filtro, condição aeróbica, tubos de ensaio, 30 dias;

C: meio papel de filtro, condição microaerofílica, tubos de ensaio, 30 dias;

D: meio bagaço de cana, condição microaerofílica, Erlenmeyers, 35 dias;

E: meio serragem, condição microaerofílica, Erlenmeyers, 35 dias;

F: meio avicel, condição microaerofílica, Erlenmeyers, 35 dias;

G: meio xilana, condição microaerofílica, Erlenmeyers, 35 dias;

H: meio papel de filtro, condição agitação (6 dias)/microaerofílica (7 dias), Erlenmeyers;

I: meio bagaço de cana, condição agitação (6 dias)/microaerofílica (7 dias), Erlenmeyers;

J: meio serragem, condição agitação (6 dias)/microaerofílica (7 dias), Erlenmeyers.

ND: Não Detectado e D: Detectado.

Como demonstra a tabela 7 o microrganismo LH₅ apresentou alguns produtos de fermentação. A presença do etanol, não foi verificada quando o microrganismo cresceu em meio contendo papel de filtro, bagaço de cana e serragem sob condições microaerofílicas. O etanol foi detectado nas demais condições de crescimento.

O microrganismo LH₅ se destacou por apresentar máximo de produção de atividade enzimática β -glicosidase. A produção de etanol pode estar relacionada com a produção enzimática.

Tabela 8. Produtos de fermentação produzidos pela linhagem F.20 em diferentes fontes de carbonos.

Produtos	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
Ác. Acético	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Ác. Cítrico	ND	ND	D	ND	ND	ND	ND	ND	ND	D
Ác. Fórmico	ND	ND	D	D	D	D	D	ND	ND	D
Ác. Láctico	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Ác. Málico	ND	D	ND	ND	D	ND	ND	ND	D	D
Ác. Pirúvico	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Ác. Propiônico	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Ác. Succínico	ND	ND	ND	ND	D	ND	ND	ND	ND	D
Ác. Tartárico	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	D	D
Etanol	D	ND	ND	ND	ND	ND	ND	D	D	D

A: meio papel de filtro, condição aeróbica, Erlenmeyers, 30 dias;

B: meio papel de filtro, condição aeróbica, tubos de ensaio, 30 dias;

C: meio papel de filtro, condição microaerofílica, tubos de ensaio, 30 dias;

D: meio bagaço de cana, condição microaerofílica, Erlenmeyers, 35 dias;

E: meio serragem, condição microaerofílica, Erlenmeyers, 35 dias;

F: meio avicel, condição microaerofílica, Erlenmeyers, 35 dias;

G: meio xilana, condição microaerofílica, Erlenmeyers, 35 dias;

H: meio papel de filtro, condição agitação (6 dias)/microaerofílica (7 dias), Erlenmeyers;

I: meio bagaço de cana, condição agitação (6 dias)/microaerofílica (7 dias), Erlenmeyers;

J: meio serragem, condição agitação (6 dias)/microaerofílica (7 dias), Erlenmeyers.

ND: Não Detectado e D: Detectado.

O microrganismo linhagem F.20 diferente das demais linhagens não apresentou produção de ácido acético em nenhuma das condições submetidas, houve produção de etanol nas diferentes fontes de carbono (serragem, bagaço de cana e papel de filtro), sob condição de agitação/microaerofília. A produção de outros produtos de fermentação também pode ser observada na tabela 8.

A produção de etanol observada quando o microrganismo F.20 cresceu nos meios papel de filtro, bagaço de cana e serragem sob agitação/microaerofília pode estar relacionada com os máximos de produção enzimática: carboximetilcelulase e xilanase nestas condições analisadas.

Tabela 9. Produtos de fermentação produzidos pelo microrganismo *Geotrichum* sp (LD) em diferentes fontes de carbonos.

Produtos	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
Ác. Acético	ND	D	ND	D	ND	D	ND	ND	ND	ND
Ác. Cítrico	ND	D	ND	ND	ND	ND	ND	D	ND	D
Ác. Fórmico	D	ND	D	D	D	ND	ND	D	ND	D
Ác. Láctico	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Ác. Málico	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	D
Ác. Pirúvico	D	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Ác. Propiônico	ND	ND	D	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Ác. Succínico	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Ác. Tartárico	D	ND	ND	ND	ND	D	ND	ND	ND	ND
Etanol	ND	D	ND	ND	D	ND	ND	D	D	D

A: meio papel de filtro, condição aeróbica, Erlenmeyers, 30 dias;

B: meio papel de filtro, condição aeróbica, tubos de ensaio, 30 dias;

C: meio papel de filtro, condição microaerofílica, tubos de ensaio, 30 dias;

D: meio bagaço de cana, condição microaerofílica, Erlenmeyers, 35 dias;

E: meio serragem, condição microaerofílica, Erlenmeyers, 35 dias;

F: meio avicel, condição microaerofílica, Erlenmeyers, 35 dias;

G: meio xilana, condição microaerofílica, Erlenmeyers, 35 dias;

H: meio papel de filtro, condição agitação (6 dias)/microaerofílica (7 dias), Erlenmeyers;

I: meio bagaço de cana, condição agitação (6 dias)/microaerofílica (7 dias), Erlenmeyers;

J: meio serragem, condição agitação (6 dias)/microaerofílica (7 dias), Erlenmeyers.

ND: Não Detectado e D: Detectado.

De acordo com a tabela 9 observa-se que o microrganismo *Geotrichum* sp (LD) produziu etanol e alguns produtos de fermentação quando crescido nas diferentes fontes de carbonos sob variadas condições. A produção de etanol foi observada nos meios serragem (microaerofílica) e papel de filtro (tubos sob aeração) e também nos meios papel de filtro, bagaço de cana e serragem sob condições agitação/microaerofília. Apesar do microrganismo *Geotrichum* sp (LD) não ter se destacado com altas produções enzimáticas, ele apresenta a característica de produzir quantidades iguais das enzimas, com exceção da atividade β -glicosidase que é produzida em valores baixos.

Considerações Finais:

As dez linhagens estudadas produziram enzimas celulolíticas e xilanolíticas quando crescidas em meio papel de filtro tanto sob condições aeróbicas como microaerofílicas. Todavia, as cinco linhagens selecionadas quando crescidas em papel de filtro produziram maiores atividades destas enzimas, além de também produzi-las em meio contendo celulose microcristalina, xilana, bagaço de cana ou serragem, compostos estes que não são constituídos apenas de celulose, mas de materiais complexos como lignina e hemicelulose, tanto quando crescidas sob condições de baixa aeração como agitação e posterior microaerofilia. Estas cinco linhagens foram capazes de hidrolisar estes substratos e através de seus sistemas fermentativos gerar variados produtos de fermentação.

O microrganismo F.20 foi a linhagem que apresentou as melhores atividades enzimáticas sob condições de agitação, esta linhagem foi a única a formar 'pellet' na superfície do líquido, sendo que as demais linhagens cresceram todas no fundo do frasco.

Os resultados obtidos com os microrganismos H₂ e *Triclochadium canadense* (Q₁₀) com relação à presença de sistema celulolítico sob condições variadas de oxigenação estão de acordo com os descritos na literatura (Durrant et al., 1994, 1995, 1996a e 1996b). Porém maiores níveis de avicelase e β -glicosidase foram obtidos sob as condições descritas neste trabalho. Em relação à utilização dos monômeros de celulose e xilana os resultados obtidos também foram semelhantes aos já descritos na literatura (Durrant et al., 1995), uma vez que tanto a linhagem H₂ como o microrganismo *Triclochadium canadense* (Q₁₀) foram capazes de utilizar estes açúcares como única fonte de carbono para o crescimento.

É importante mencionar aqui os resultados obtidos com a levedura *Geotrichum* sp (LD), a qual apresentou atividades de CMCase, avicelase e xilanase nos diferentes meios utilizados, sendo que no meio contendo xilana apresentou alta atividade de avicelase. A produção de xilanase por leveduras já é conhecida, mas são poucas as linhagens que a produzem, podem ser citados *Geotrichum candidum* 3c-106 (Rodionova et al., 1995) e *Cryptococcus albidus* (Biely e Vrsanska, 1988). A levedura *Geotrichum candidum* 3c foi a única levedura descrita na literatura capaz de produzir endoglucanases (Tiunova et al., 1991). Até onde temos conhecimento esta é a primeira vez que uma levedura capaz de produzir avicelase é isolada.

Ainda em relação a linhagem *Geotrichum* sp (LD) entre os vários produtos de fermentação é interessante mencionar a presença de etanol quando esta levedura foi cultivada em meio contendo papel de filtro, serragem e bagaço de cana, sugerindo a sua habilidade de hidrolizar os componentes destes materiais e em seguida fermentá-los.

V. CONCLUSÕES

Após crescimento em meio papel de filtro sob condições aeróbicas e microaerofilicas os microrganismos F.20 e H₂ foram os que apresentaram maior produção de carboximetilcelulase e avicelase. As maiores produções de xilanase foram apresentadas pelos microrganismos F.20, F.30 e LH₅. Enquanto que para β -glicosidase as maiores atividades obtidas foram observadas com os microrganismos LH₅, F.20 e *Trichocladium canadense* (Q₁₀). Ainda foram analisados os resultados sob agitação, sendo o microrganismo F.20 o que apresentou as maiores produções para todas as enzimas.

As linhagens *Trichocladium canadense* (Q₁₀), *Geotrichum* sp (LD), H₂, LH₅ e F.20 foram selecionadas para produção de enzimas celulolíticas.

A maior atividade de xilanase (0.9 $\mu\text{mol}/\text{min.mL}$) foi produzida pelo microrganismo F.20 quando utilizou-se meio xilana; apresentando também produção de xilanase nos demais meios inoculados, sob condições de agitação e agitação/microaerofilia. Entretanto os demais microrganismos também apresentaram bons resultados de xilanase, principalmente nos meios bagaço de cana e serragem, isto pode ser devido à presença de hemicelulose contida nestes substratos.

O microrganismo H₂ apresentou máximo de atividade carboximetilcelulase (0.62 $\mu\text{mol}/\text{min.mL}$) quando crescido em meio bagaço de cana como fonte de carbono, sob condição microaerofilica.

A maior atividade de avicelase ($0.8 \mu\text{mol}/\text{min.mL}$) foi produzida pelo basidiomiceto H₂ após crescimento em meio contendo xilana como fonte de carbono, sob condição microaerofílica.

A maior produção de β -glicosidase ($0.32 \mu\text{mol}/\text{min.mL}$) foi obtida pela linhagem LH₅ após crescimento em meio contendo serragem como fonte de carbono, sob condição microaerofílica. De uma maneira geral a produção de β -glicosidase nos meios papel de filtro, Avicel e xilana foram semelhantes àquela apresentada pelos materiais agroindustriais.

Após análise cromatográfica foi possível verificar que as cinco linhagens selecionadas crescidas nas diferentes condições de cultivo apresentaram composição variadas dos produtos de fermentação, sendo o etanol, ácido fórmico e ácido cítrico os mais detectados nas linhagens estudadas. O microrganismo F.20 foi a única linhagem que não apresentou produção de ácido acético e apenas a linhagem H₂ produziu ácido láctico.

Os monômeros da celulose e hemicelulose foram utilizados como fonte de carbono para verificar a capacidade de utilização dos substratos. O microrganismo F.20 apresentou desenvolvimento ótimo da massa micelial para a maioria dos substratos utilizados. Esta linhagem, entre as cinco selecionadas apresentou as maiores atividades xilanolíticas e também celulolíticas. Isto indica que a mesma poderia degradar celulose e hemicelulose e utilizar os produtos de degradação, ou seja, os monômeros produzidos.

VI. BIBLIOGRAFIA

- Béguin, P. e Aubert, J. P. (1992). Cellulases. In: Encyclopedia of Microbiology. (J. Lederberg ed.). Vol.1. pp.467-477. Academic Press. New York, N.Y.
- Béguin, P. e Aubert, J. P. (1994). The Biological Degradation of Cellulose. FEMS Microbiol. Reviews. **13**:25-58.
- Biely, P. (1985). Microbial Xylanolytic Systems. Trends Biotechnology. **3**:286-290.
- Biely, P. e Vrsanska, M. (1988). Xylanase of *Cryptococcus albidus*. Methods in Enzymology. **160**:638-648.
- Borchert, A. e Buchholz, K. (1987). Enzymatic Hydrolysis of Cellulosic Materials. Process Biochem. 173-180.
- Christakopoulos, P.; Macris, B. J. e Kekos, D. (1989). Direct Fermentation of Cellulose to Ethanol by *Fusarium oxysporum*. Enz. Microbiol. Technol. **11**:236-239.
- Christakopoulos, P.; Macris, B. J. e Kekos, D. (1990). On the Mechanism of Direct Conversion of Cellulose to Ethanol by *Fusarium oxysporum*: Effect of Cellulase and β -glucosidase. Applied Microbiol. Biotechnol. **33**:18-20.
- Christakopoulos, P.; Macris, B. J. e Kekos, D. (1991). Direct Conversion of Straw to Ethanol by *Fusarium oxysporum*: Effect of Cellulose Crystallinity. Enz. Microbiol. Technol. **13**:272-274.
- Coughlan, M. P. (1985). The Properties of Fungal and Bacterial Cellulases with Comment on their Production and Application. Biotechnology & Genetic Engineering Reviews (E.G. Russel, ed.). Vol. 3. pp.39-109. Intercept Pontland Limited, New Castle.
- Coughlan, M. P. (1992). Enzymic Hydrolysis of Cellulose: an overview. Bioresource Technology. **39**:107-115.

-
- Cowling, E. B. e Brown, W. (1969). Cellulases and their Applications. In: Advances in Chemistry Series. (R. F. Gould, ed.). Vol.95. p.52. American Chemical Society Publications. Washington, D.C.
- Cowling, E. B. e Kirk, T. K. (1976). Properties of Cellulose and Lignocellulosic Materials as Substrates for Enzymatic Conversion Process. Biotechnol. Bioeng. Symp. 1:95-123.
- Dekker, R. R. H. (1985). Biodegradation of the Hemicellulose. In: Biosynthesis and Biodegradation of Wood Components. ch. 18. pp. 505-533. Academic Press Inc.
- Deshpande, V.; Keskar, S.; Mishra, C. e Rao, M. (1986). Direct Corversion of Cellulose/Hemicellulose to Ethanol by *Neurospora crassa*. Enz. Microbiol. technol. 8:149.
- Durrant, L. R.; Canale-Parola, E. e Leschine, S. B. (1994). The Cellulose System of Soil Fungi Isolated under Anaerobic Conditions. Genetics, Biochemistry and Ecology of Lignocellulose Degradation. pp.531-539. Tokio: Uni Publishers.
- Durrant, L. R.; Canale-Parola, E. e Leschine, S. B. (1995). 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). p.161-167. Kluwer Academic. The Netherlands.
- Durrant, L. R. (1996a). Biodegradation of Lignocellulosic Materials by Soil Fungi Isolated under Anaerobic Conditions. International Biodeterioration & Biodegradation. 189-195.
- Durrant, L.R. (1996b). Ethanol Production from Cellulase by two Lignocellulolytic Soil Fungi. Applied Biochemistry and Biotechnology. 57/58:399-406.
- Enari, T. e Paavola, M. (1987). Enzymatic Hydrolysis of Cellulose: is the current theory of the mechanisms of hydrolysis valid? CRC - Critical Rev. in Biotech. 5:67-87.

-
- Eriksson, K.-E.; Blanchette, R. A. e Ander, P. (1990). Microbial and Enzymatic Degradation of Wood and Wood Components. p.407. Berlin. Springer-Verlag.
- Goksoyr, J. e Eriksen, J. (1980). Cellulases. In: Microbial Enzymes and Bioconversions. (A.H. Rose, ed.). Vol.5. p.47. Academic Press. London.
- Gold, M. Wariishi, H. e Valli, K. (1989). Extracellular Peroxidases Involved in Lignin Degradation by the White Rot Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. In: Biocatalysis in Agricultural Biotechnology. (Whitaker, J. e Sonnet, P.E. eds). ACS Symposium Series 389. pp.127-140. American Chemical Society Publications. Washington, D.C.
- Gong, C.-S.; Chen, L. F.; Flickinger, M. C. e Tsao, G. T. (1981). Conversion of the Hemicellulose Carbohydrates. Adv. in Biochem. Eng. **20**:93-117.
- Janshekar, H. e Fiechter, A. (1983). Lignin: Biosynthesis Application, and Biodegradation. Adv. in Bioch. Engineering/Biotechnology. 119-178.
- Knapp, J. S. (1985). Biodegradation of Celluloses and Lignin. Comprehensive Biotechnology (M. ed.). Vol. 3. pp.835-846. Pergamon Press Inc., N.Y.
- Kubicek, C. P. (1992). The Cellulose Proteins of *Trichoderma reesei*: Structures, Multiplicity, Mode of Action and Regulation of Formation. Adv. in Biochem. Engineering/Biotechnology. **45**:1-27.
- Kumar, P.K.R.; Singh, A. e Schügerl, K. (1991). Formation of Acetic Acid from Cellulosic Substrates by *Fusarium oxysporum*. Applied Microbiol. Biotechnol. **34**:570-572.
- Laluce, C. (1991). Current Aspects of Fuel Ethanol Production in Brazil. CRC-Critic. Rev. Biotechnol. **11**(2):149-161.
- Linko, M.; Poutanen, K. e Viikari, L. (1992). New Developments in the Application of Enzymes for Biomass Processing. Enzyme Systems for Lignocellulose Degradation. (M. P. Coughlan ed.). pp.331-346. Elsevier-London.

-
- Ljungdahl, L. G. e Eriksson, K. E. (1985). Ecology of Microbial Cellulose Degradation. Advances in Microb. Ecology. **8**:237-299.
- Lynd, L. R.; Grethlein, H. E. e Wolkin, R. H. (1989). Fermentation of Cellulosic Substrates in Batch and Continuous Culture by *Clostridium thermocellum*. Appl. and Envirom. Microbiol. **55**(12):3121-3139.
- Lynd, L. R.; Cushman, J. H.; Nichols, R. J. e Wyman, C. E. (1991). Fuel Ethanol from Cellulosic Biomass. Science. **251**:1318.
- Mamma, D.; Koullas, D.; Fountoukidis, G.; Kekos, D.; Macris, B.J. e Koukios, E. (1996). Bioethanol from Servet Sorghum: Simultaneous Saccaharafication and Fermentatin of Carbohydrates by a Mixed Microbial Culture. Process Biochem. **31**(4):377-381.
- Mandels, M. (1982). Cellulases. Ann. Report. on Ferm. Process. **5**:35-73.
- Mandels, M. (1985). Application of Cellulases. Biotechnol. Bioeng. Symp. **13**:414-416.
- Mandels, M.; Andreotti, R. e Roche, C. (1976). Measurement of Saccharifying Cellulose. Biotechnol. Bioeng. Symp. **6**:21-33.
- McCarthy, A. J. (1987). Lignocellulose - Degrading Actinomycetes. FEMS-Microbiol. Rev. **46**:145-163.
- Miller, G. L. R.; Blum, R.; Glennon, W. E. e Burton, A. L. (1960). Measurement of Carborylcellulose Activity. Anal. Biochem. **2**:127-132.
- Montgomery, R. A. P. (1983). The Role of Polysaccharidase Enzymes in the Decay of Wood by Basidiomycetes. The Filamentous Fungi (J.E. Smith; D.R. Berry e A. Edward). Vol. 4. pp.33-58. Academic Press.
- Moritz, J. W. e Duff, S. J. B. (1996). Simultaneous Saccharafication and Extractive Fermentation of Cellulosic Substrates. Biotechn. and Bioeng. **49**:504-511.

-
- Nogueira, G.; Calil, S.F.; Oliveira, A.L.L.; Souza, D.A.; Oliveira, M.A.; Gomes, R. e Bittencourt, C.M. (1987). A Indústria Alcooquímica. Bol. Tec. ABIQUIM. 4:1.
- Orpin, C. G. (1988). Genetic Approaches to the Improvement of Lignocellulose Degradation in the Rumen. In: Biochemistry and Genetics of Cellulose Degradation. (Aubert, J.-P.; Béguin, P. e Millet, J. eds). FEMS Symposium 43. pp. 172-179. Academic Press. London and New York.
- Pavarina, E. C. e Durrant, L. R. (1996). Seleção de Fungos Capazes de Degradar Material Lignocelulósico sob Condições Aeróbica e Microaeróbica. Anais - Workshop Sobre Biodegradação. pp.248. ISSN 1413-0084.
- Perlman, D. (1950). Observations on the Production of Ethanol by Fungi and Yeasts. Am. J. Bot. 37:237.
- Rao, M.; Deshpande, V.; Keskar, S. e Srinivasan, M. C. (1983). Cellulase and Ethanol Production from Cellulose by *Neurospora crassa*. Enzyme Microb. Technol. 5:133.
- Reese, E. T.; Siu, R. G. H. e Levinson, H. S. (1950). The Biological Degradation of Soluble Cellulose Derivatives and its Relationship to the Mechanism of Cellulose Hydrolysis. J. of Bacteriology. 59:485-497.
- Robson, L. M. e Chambliss, C. (1989). Celluloses of Bacterial Origin. Enz. Microb. Technol. 11:626-643.
- Rodionova, N. A.; Kilimnik, A. Yu.; Kaprel'yants, L. V. e Serednitskii, P. V. (1995). Enzyme Preparations from Mycelial Fungi that Cleave Cereal Grain Polymers. Applied Biochem. Microbiol. 31(4):370-376.
- Selby, K. (1968). Biodeterioration of Materials. (A.H. Walters and J.J. Elphick, eds). p.62. Elsevier Publishing Company Ltd. Amsterdam-London, New York.

-
- Sette, L. D. e Durrant, L. R. (1996). Estudo do Sistema Ligninolítico Produzido por Fungos sob Condição Aeróbica e Microaeróbica. Anais - I Reunião de Microbiologia Aplicada ao Meio Ambiente. pp.45.
- Shoseyov, O e Doi, R. H. (1990). Essential 170 Kda Subunit for Degradation of Crystalline Cellulose by *Clostridium cellulovorans* Cellulose. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **87**:2192-2195.
- Shitola, H. e Neimo, L. (1975). Symposium on Enzymatic Hidrolysis of Cellulose. (M. Bailey, T.-M. Enari e M. Linko, eds). p.9. SITRA. Aulanko, Finland.
- Singh, A.; Kumar, P.K.R. (1991). *Fusarium oxysporum*: Status in Bioethanol Production. Critical Reviews in Biotechnology. **11**(2):129-147.
- Singh, A.; Kumar, P.K.R. e Schügerl, K. (1992). The Oxygen Requirement of *Fusarium oxysporum* for the Fermentation of D-Xylose and D-Glucose. Biotechnol. App. Biochem. **16**:296-302.
- Stewart, G. G.; Panchal, C. J.; Russel, I. e Sieels, A. M. (1984). Biology of Ethanol Producing Microorganisms. CRC-Crit. Rev. Biotechn. **1**:160.
- Tanaka, M. e Matsumo, R. (1985). Conversion of Lignocellulosic Materials to Single-Cell Protein (SPC). Enz. Microb. Technol. **7**:197-205.
- Tiunova, N. A.; Kobzeva, N. Ya. e Sorovaeva, A. V. (1991). Enzyme Systems of *Geotrichum candidum* 3c e *Penicillium citreo-viride* 26 Hydrolyzing Polysaccharides of Plant Cell Walls. Prikladnaya Biokhimiya i Mikrobiologiya. **27**(3):338-346.
- Ueng, P. P. e Gong, C. S. (1982). Ethanol Production from Pentoses and Sugarcane Bagasse Hemicellulose Hydrolysate by *Mucor* and *Fusarium* species. Enz. Microbiol. Technol. **4**:169.
- Waksman, S. A. e Foster, J.W. (1938). Respiration and Lactic Acid Production by a Fungus of the genus *Rhizopus*. J. Agric. Res. **57**:873.

-
- Wong, K. K. Y.; Tan LUL e Saddler, J. N. (1988). Multiplicity of β , 1-4 Xylanase in Microorganisms: Functions and Applications. Microb. Rev. **52**:305-317.
- Wood, D. A.; Claydon, N.; Dudley, K. J.; Stephens, S. K. e Allan, M. (1988). Cellulase Production in the Life Cycle of the Cultivated Mushroom *Agaricus bisporus*. Biochemistry and Genetics of Cellulose Degradation. (Aubert, J.-P.; Béguin, P. e Millet, J. eds). FEMS Symposium 43. pp. 53-70. Academic Press. London and New York.
- Wood, T. M. e Bhat, M. K. (1988). Methods for Measuring Cellulase. Methods in Enzymology. **160**:87-112.
- Wood, T. M. (1985). Properties of Cellulolytic Enzyme Systems. Biochem. Soc. Trans. **13**:407-410.
- Wood, T. M. e McCrae, S. I. (1972). The Purification of the C_1 Component of *Trichoderma koningii* Cellulase. Biochem. J. **128**:1183-1192.
- Wood, T. M. e McCrae, S. I. (1979). Advances in Chemistry Series. (R. F. Gould, ed.). Vol.181. pp.181-210. American Chemical Society Publications. Washington, D.C.
- Woodward, J. (1984). Xylanases: Functions, Properties and Applications. Top. Enzyme Ferment. Technol. **8**:9-30.
- Woodward, J. (1987). Utilization of Cellulose as a Fermentation Substrate: Problems and Potential. In: Carbon Substrate in Biotechnology (J.D. Stowell ed.). Vol. 21. pp. 45-65. VRL Press, Oxford.
- Wu, J. K.; Lastick, S. M. e Updegraff, D. M. (1986). Ethanol Production from Sugars Derived from Plant Biomass by a Novel Fungi. Nature. **321**:887.
- Wyman, C. (1994). Ethanol from Lignocellulosic Biomass: Technology, Economics, and Opportunities. Bioresource Technology. **50**:3-16.
- Yazdi, M. T.; Radford, A.; Keen, J. N. e Woodward, J. R. (1990). Enz. Microb. Technol. **12**:120-123.

VII. APÊNDICE

1. TABELAS DAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS

1.1. ATIVIDADE ENZIMÁTICA / AERÓBICA / SEM AGITAÇÃO/7 DIAS

CMCase		Avicelase		Xilanase		B-glicosidase	
Tubos		Tubos		Tubos		Tubos	
Linhagens	UI/mL	Linhagens	UI/mL	Linhagens	UI/mL	Linhagens	UI/mL
FOR	0,019	FOR	0,035	FOR	0,037	FOR	0,008
Q10	0,022	Q10	0,034	Q10	0,061	Q10	0,089
F.20	0,022	F.20	0,021	F.20	0,068	F.20	0,089
LD	0,018	LD	0,017	LD	0,043	LD	0
LH5	0,024	LH5	0,017	LH5	0,034	LH5	0,058
H2	0,02	H2	0,02	H2	0,051	H2	0,013
F.30	0,022	F.30	0,018	F.30	0,051	F.30	0,051
L71	0,021	L71	0,023	L71	0,04	L71	0
F.5	0,048	F.5	0,018	F.5	0,072	F.5	0,041
D7	0,025	D7	0,017	D7	0,04	D7	0,003

CMCase		Avicelase		Xilanase		B-glicosidase	
Erlenmeyer		Erlenmeyer		Erlenmeyer		Erlenmeyer	
Linhagens	UI/mL	Linhagens	UI/mL	Linhagens	UI/mL	Linhagens	UI/mL
FOR	0,018	FOR	0,018	FOR	0,049	FOR	0,024
Q10	0,022	Q10	0,024	Q10	0,046	Q10	0,081
F.20	0,055	F.20	0,022	F.20	0,095	F.20	0,08
LD	0,02	LD	0,021	LD	0,039	LD	0
LH5	0,019	LH5	0,017	LH5	0,035	LH5	0,056
H2	0,022	H2	0,026	H2	0,055	H2	0
F.30	0,018	F.30	0,024	F.30	0,177	F.30	0,044
L71	0,018	L71	0,022	L71	0,025	L71	0
F.5	0,029	F.5	0,028	F.5	0,061	F.5	0,024
D7	0,019	D7	0,03	D7	0,026	D7	0

1.2. ATIVIDADE ENZIMÁTICA/ AERÓBICA/ SEM AGITAÇÃO/15 DIAS

CMCase		Avicelase		Xilanase		B-glicosidase	
Tubos		Tubos		Tubos		Tubos	
Linhagens	UI/mL	Linhagens	UI/mL	Linhagens	UI/mL	Linhagens	UI/mL
FOR	0,021	FOR	0,032	FOR	0,035	FOR	0,013
Q10	0,024	Q10	0,033	Q10	0,043	Q10	0,087
F.20	0,042	F.20	0,037	F.20	0,175	F.20	0,087
LD	0,023	LD	0,03	LD	0,04	LD	0
LH5	0,023	LH5	0,022	LH5	0,031	LH5	0,056
H2	0,052	H2	0,03	H2	0,067	H2	0,007
F.30	0,018	F.30	0,017	F.30	0,04	F.30	0,088
L71	0,019	L71	0,026	L71	0,046	L71	0
F.5	0,052	F.5	0,029	F.5	0,088	F.5	0,041
D7	0,07	D7	0,035	D7	0,093	D7	0,034

CMCase		Avicelase		Xilanase		B-glicosidase	
Erlenmeyer		Erlenmeyer		Erlenmeyer		Erlenmeyer	
Linhagens	UI/mL	Linhagens	UI/mL	Linhagens	UI/mL	Linhagens	UI/mL
FOR	0,0242	FOR	0,017	FOR	0,051	FOR	0,007
Q10	0,022	Q10	0,032	Q10	0,072	Q10	0,068
F.20	0,192	F.20	0,035	F.20	0,23	F.20	0,095
LD	0,022	LD	0,017	LD	0,056	LD	0
LH5	0,079	LH5	0,017	LH5	0,23	LH5	0,088
H2	0,019	H2	0,026	H2	0,042	H2	0
F.30	0,044	F.30	0,017	F.30	0,23	F.30	0,054
L71	0,019	L71	0,017	L71	0,038	L71	0
F.5	0,039	F.5	0,018	F.5	0,066	F.5	0,026
D7	0,018	D7	0,039	D7	0,04	D7	0

1.3. ATIVIDADE ENZIMÁTICA/ AERÓBICA/ SEM AGITAÇÃO/22 DIAS

CMCase		Avicelase		Xilanase		B-glicosidase	
Tubos		Tubos		Tubos		Tubos	
Linhagens	UI/mL	Linhagens	UI/mL	Linhagens	UI/mL	Linhagens	UI/mL
FOR	0,02	FOR	0,051	FOR	0,039	FOR	0,007
Q10	0,024	Q10	0,058	Q10	0,047	Q10	0,095
F.20	0,067	F.20	0,054	F.20	0,172	F.20	0,095
LD	0,021	LD	0,067	LD	0,047	LD	0
LH5	0,036	LH5	0,056	LH5	0,063	LH5	0,061
H2	0,092	H2	0,092	H2	0,099	H2	0
F.30	0,02	F.30	0,049	F.30	0,043	F.30	0,095
L71	0,018	L71	0,049	L71	0,042	L71	0
F.5	0,075	F.5	0,074	F.5	0,12	F.5	0,061
D7	0,067	D7	0,07	D7	0,161	D7	0,027

CMCase		Avicelase		Xilanase		B-glicosidase	
Erlenmeyer		Erlenmeyer		Erlenmeyer		Erlenmeyer	
Linhagens	UI/mL	Linhagens	UI/mL	Linhagens	UI/mL	Linhagens	UI/mL
FOR	0,025	FOR	0,041	FOR	0,021	FOR	0,022
Q10	0,028	Q10	0,043	Q10	0,052	Q10	0,095
F.20	0,187	F.20	0,034	F.20	0,172	F.20	0,115
LD	0,022	LD	0,054	LD	0,028	LD	0
LH5	0,092	LH5	0,054	LH5	0,223	LH5	0,095
H2	0,018	H2	0,054	H2	0,033	H2	0
F.30	0,021	F.30	0,047	F.30	0,223	F.30	0,034
L71	0,018	L71	0,048	L71	0,042	L71	0
F.5	0,027	F.5	0,045	F.5	0,045	F.5	0,034
D7	0,034	D7	0,058	D7	0,068	D7	0,012

1.4. ATIVIDADE ENZIMÁTICA/ AERÓBICA/ SEM AGITAÇÃO/30 DIAS

CMCase		Avicelase		Xilanase		B-glicosidase	
Tubos		Tubos		Tubos		Tubos	
Linhagens	UI/mL	Linhagens	UI/mL	Linhagens	UI/mL	Linhagens	UI/mL
FOR	0,026	FOR	0,033	FOR	0,085	FOR	0,02
Q10	0,026	Q10	0,035	Q10	0,056	Q10	0,088
F.20	0,065	F.20	0,027	F.20	0,23	F.20	0,088
LD	0,022	LD	0,03	LD	0,046	LD	0
LH5	0,031	LH5	0,026	LH5	0,119	LH5	0,037
H2	0,136	H2	0,041	H2	0,089	H2	0,026
F.30	0,016	F.30	0,024	F.30	0,161	F.30	0,093
L71	0,016	L71	0,036	L71	0,04	L71	0
F.5	0,045	F.5	0,045	F.5	0,083	F.5	0,054
D7	0,024	D7	0,043	D7	0,055	D7	0,007

CMCase		Avicelase		Xilanase		B-glicosidase	
Erlenmeyer		Erlenmeyer		Erlenmeyer		Erlenmeyer	
Linhagens	UI/mL	Linhagens	UI/mL	Linhagens	UI/mL	Linhagens	UI/mL
FOR	0,031	FOR	0,036	FOR	0,124	FOR	0,011
Q10	0,03	Q10	0,066	Q10	0,063	Q10	0,081
F.20	0,122	F.20	0,096	F.20	0,219	F.20	0,081
LD	0,026	LD	0,052	LD	0,047	LD	0
LH5	0,079	LH5	0,038	LH5	0,23	LH5	0,095
H2	0,187	H2	0,118	H2	0,172	H2	0,027
F.30	0,024	F.30	0,024	F.30	0,172	F.30	0,06
L71	0,016	L71	0,035	L71	0,037	L71	0
F.5	0,035	F.5	0,018	F.5	0,089	F.5	0,041
D7	0,016	D7	0,021	D7	0,039	D7	0

1.5. ATIVIDADE ENZIMÁTICA / MICROAEROFÍLICA / 7 DIAS

CMCase		Avicelase		Xilanase		B-glicosidase	
Tubos		Tubos		Tubos		Tubos	
Linhagens	UI/mL	Linhagens	UI/mL	Linhagens	UI/mL	Linhagens	UI/mL
FOR	0,018	FOR	0,021	FOR	0,035	FOR	0,073
Q10	0,018	Q10	0,035	Q10	0,045	Q10	0,001
F.20	0,024	F.20	0,024	F.20	0,045	F.20	0,073
LD	0,026	LD	0,041	LD	0,058	LD	0
LH5	0,016	LH5	0,015	LH5	0,047	LH5	0,271
H2	0,018	H2	0,045	H2	0,042	H2	0,003
F.30	0,018	F.30	0,028	F.30	0,039	F.30	0,022
L71	0,018	L71	0,024	L71	0,04	L71	0
F.5	0,018	F.5	0,036	F.5	0,043	F.5	0
D7	0,017	D7	0,036	D7	0,045	D7	0

1.6. ATIVIDADE ENZIMÁTICA / MICROAEROFÍLICA / 15 DIAS

CMCase		Avicelase		Xilanase		B-glicosidase	
Tubos		Tubos		Tubos		Tubos	
Linhagens	UI/mL	Linhagens	UI/mL	Linhagens	UI/mL	Linhagens	UI/mL
FOR	0,016	FOR	0,021	FOR	0,034	FOR	0,139
Q10	0,018	Q10	0,032	Q10	0,037	Q10	0,017
F.20	0,022	F.20	0,024	F.20	0,037	F.20	0,249
LD	0,058	LD	0,036	LD	0,058	LD	0
LH5	0,016	LH5	0,015	LH5	0,026	LH5	0,271
H2	0,019	H2	0,03	H2	0,043	H2	0,009
F.30	0,017	F.30	0,022	F.30	0,032	F.30	0,138
L71	0,016	L71	0,024	L71	0,032	L71	0
F.5	0,017	F.5	0,039	F.5	0,026	F.5	0,006
D7	0,018	D7	0,032	D7	0,033	D7	0

1.7. ATIVIDADE ENZIMÁTICA / MICROAEROFÍLICA / 22 DIAS

CMCase		Avicelase		Xilanase		B-glicosidase	
Tubos		Tubos		Tubos		Tubos	
Linhagens	UI/mL	Linhagens	UI/mL	Linhagens	UI/mL	Linhagens	UI/mL
FOR	0,016	FOR	0,033	FOR	0,027	FOR	0
Q10	0,018	Q10	0,063	Q10	0,052	Q10	0,048
F.20	0,017	F.20	0,022	F.20	0,033	F.20	0,249
LD	0,024	LD	0,033	LD	0,039	LD	0
LH5	0,017	LH5	0,027	LH5	0,032	LH5	0,205
H2	0,017	H2	0,039	H2	0,058	H2	0,009
F.30	0,016	F.30	0,045	F.30	0,037	F.30	0,093
L71	0,017	L71	0,046	L71	0,052	L71	0
F.5	0,017	F.5	0,058	F.5	0,047	F.5	0,009
D7	0,018	D7	0,065	D7	0,058	D7	0

1.8. ATIVIDADE ENZIMÁTICA / MICROAEROFÍLICA / 30 DIAS

CMCase		Avicelase		Xilanase		B-glicosidase	
Tubos		Tubos		Tubos		Tubos	
Linhagens	UI/mL	Linhagens	UI/mL	Linhagens	UI/mL	Linhagens	UI/mL
FOR	0,017	FOR	0,017	FOR	0,033	FOR	0,005
Q10	0,019	Q10	0,051	Q10	0,049	Q10	0,034
F.20	0,016	F.20	0,016	F.20	0,033	F.20	0,161
LD	0,024	LD	0,034	LD	0,052	LD	0
LH5	0,017	LH5	0,016	LH5	0,018	LH5	0,183
H2	0,058	H2	0,062	H2	0,06	H2	0,006
F.30	0,017	F.30	0,032	F.30	0,032	F.30	0,058
L71	0,017	L71	0,035	L71	0,047	L71	0
F.5	0,018	F.5	0,041	F.5	0,042	F.5	0,009
D7	0,019	D7	0,062	D7	0,052	D7	0

1.9. ATIVIDADE ENZIMÁTICA / AERÓBICA / COM AGITAÇÃO / 4 DIAS

CMCase		Avicelase		Xilanase		B-glicosidase	
Erlenmeyer		Erlenmeyer		Erlenmeyer		Erlenmeyer	
Linhagens	UI/mL	Linhagens	UI/mL	Linhagens	UI/mL	Linhagens	UI/mL
FOR	0,028	FOR	0,041	FOR	0,032	FOR	0
Q10	0,018	Q10	0,041	Q10	0,026	Q10	0
F.20	0,021	F.20	0,045	F.20	0,223	F.20	0,038
LD	0,018	LD	0,025	LD	0,042	LD	0
LH5	0,017	LH5	0,024	LH5	0,026	LH5	0,017
H2	0,016	H2	0,045	H2	0,037	H2	0,009
F.30	0,017	F.30	0,032	F.30	0,037	F.30	0,058
L71	0,017	L71	0,028	L71	0,028	L71	0,001
F.5	0,018	F.5	0,039	F.5	0,058	F.5	0,001
D7	0,017	D7	0,043	D7	0,042	D7	0

1.10. ATIVIDADE ENZIMÁTICA/ AERÓBICA/ COM AGITAÇÃO/6 DIAS

CMCase		Avicelase		Xilanase		B-glicosidase	
Erlenmeyer		Erlenmeyer		Erlenmeyer		Erlenmeyer	
Linhagens	UI/mL	Linhagens	UI/mL	Linhagens	UI/mL	Linhagens	UI/mL
FOR	0,019	FOR	0,041	FOR	0,032	FOR	0
Q10	0,017	Q10	0,036	Q10	0,042	Q10	0
F.20	0,144	F.20	0,067	F.20	0,223	F.20	0,066
LD	0,017	LD	0,032	LD	0,037	LD	0
LH5	0,016	LH5	0,019	LH5	0,023	LH5	0,017
H2	0,017	H2	0,041	H2	0,038	H2	0,008
F.30	0,016	F.30	0,036	F.30	0,037	F.30	0,05
L71	0,041	L71	0,032	L71	0,045	L71	0,008
F.5	0,017	F.5	0,041	F.5	0,049	F.5	0,009
D7	0,017	D7	0,048	D7	0,037	D7	0

1.11. ATIVIDADE ENZIMÁTICA / AERÓBICA / COM AGITAÇÃO / 10 DIAS

CMCase		Avicelase		Xilanase		B-glicosidase	
Erlenmeyer		Erlenmeyer		Erlenmeyer		Erlenmeyer	
Linhagens	UI/mL	Linhagens	UI/mL	Linhagens	UI/mL	Linhagens	UI/mL
FOR	0,017	FOR	0,041	FOR	0,019	FOR	0
Q10	0,016	Q10	0,051	Q10	0,032	Q10	0
F.20	0,144	F.20	0,073	F.20	0,223	F.20	0,09
LD	0,019	LD	0,032	LD	0,027	LD	0
LH5	0,017	LH5	0,018	LH5	0,024	LH5	0,025
H2	0,017	H2	0,049	H2	0,032	H2	0,009
F.30	0,019	F.30	0,039	F.30	0,172	F.30	0,09
L71	0,029	L71	0,032	L71	0,027	L71	0,017
F.5	0,019	F.5	0,032	F.5	0,05	F.5	0,038
D7	0,017	D7	0,056	D7	0,037	D7	0

1.12. ATIVIDADE ENZIMÁTICA / MICROAEROFÍLICA / MEIO AVICEL / 20 DIAS

CMCase		Avicelase		Xilanase		B-glicosidase	
Erlenmeyer		Erlenmeyer		Erlenmeyer		Erlenmeyer	
Linhagens	UI/mL	Linhagens	UI/mL	Linhagens	UI/mL	Linhagens	UI/mL
H2	0,187	H2	0,047	H2	0,175	H2	0,003
Q10	0,026	Q10	0,041	Q10	0,056	Q10	0,038
F.20	0,03	F.20	0,041	F.20	0,07	F.20	0,058
LD	0,035	LD	0,024	LD	0,052	LD	0,001
LH5	0,028	LH5	0,036	LH5	0,064	LH5	0,074

1.13. ATIVIDADE ENZIMÁTICA / MICROAEROFÍLICA / MEIO AVICEL / 35 DIAS

CMCase		Avicelase		Xilanase		B-glicosidase	
Erlenmeyer		Erlenmeyer		Erlenmeyer		Erlenmeyer	
Linhagens	UI/mL	Linhagens	UI/mL	Linhagens	UI/mL	Linhagens	UI/mL
H2	0,101	H2	0,666	H2	0,151	H2	0
Q10	0,024	Q10	0,051	Q10	0,058	Q10	0,05
F.20	0,187	F.20	0,055	F.20	0,223	F.20	0,007
LD	0,024	LD	0,045	LD	0,045	LD	0
LH5	0,017	LH5	0,018	LH5	0,024	LH5	0,106

1.14. ATIVIDADE ENZIMÁTICA / MICROAEROFÍLICA /
MEIO XILANA / 20 DIAS

CMCase		Avicelase		Xilanase		B-glicosidase	
Erlenmeyer		Erlenmeyer		Erlenmeyer		Erlenmeyer	
Linhagens	UI/mL	Linhagens	UI/mL	Linhagens	UI/mL	Linhagens	UI/mL
H2	0,404	H2	0,404	H2	0,479	H2	0,001
Q10	0,236	Q10	0,365	Q10	0,332	Q10	0,202
F.20	0,198	F.20	0,267	F.20	0,893	F.20	0
LD	0,129	LD	0,404	LD	0,189	LD	0
LH5	0,257	LH5	0,365	LH5	0,264	LH5	0,087

1.15. ATIVIDADE ENZIMÁTICA / MICROAEROFÍLICA /
MEIO XILANA / 35 DIAS

CMCase		Avicelase		Xilanase		B-glicosidase	
Erlenmeyer		Erlenmeyer		Erlenmeyer		Erlenmeyer	
Linhagens	UI/mL	Linhagens	UI/mL	Linhagens	UI/mL	Linhagens	UI/mL
H2	0,236	H2	0,796	H2	0,264	H2	0
Q10	0,236	Q10	0,322	Q10	0,42	Q10	0,074
F.20	0,236	F.20	0,494	F.20	0,212	F.20	0,09
LD	0,227	LD	0,494	LD	0,228	LD	0
LH5	0,287	LH5	0,468	LH5	0,285	LH5	0,094

1.16. ATIVIDADE ENZIMÁTICA / MICROAEROFÍLICA /
MEIO BAGAÇO DE CANA / 20 DIAS

CMCase		Avicelase		Xilanase		B-glicosidase	
Erlenmeyer		Erlenmeyer		Erlenmeyer		Erlenmeyer	
Linhagens	UI/mL	Linhagens	UI/mL	Linhagens	UI/mL	Linhagens	UI/mL
Q10	0,142	Q10	0,133	Q10	0,745	Q10	0,001
LD	0,075	LD	0,066	LD	0,152	LD	0
H2	0,339	H2	0,113	H2	0,558	H2	0
F.20	0,063	F.20	0,077	F.20	0,155	F.20	0,011
LH5	0,056	LH5	0,048	LH5	0,142	LH5	0,203

1.17. ATIVIDADE ENZIMÁTICA / MICROAEROFÍLICA /
MEIO BAGAÇO DE CANA / 35 DIAS

CMCase		Avicelase		Xilanase		B-glicosidase	
Erlenmeyer		Erlenmeyer		Erlenmeyer		Erlenmeyer	
Linhagens	UI/mL	Linhagens	UI/mL	Linhagens	UI/mL	Linhagens	UI/mL
Q10	0,282	Q10	0,135	Q10	0,549	Q10	0,003
LD	0,057	LD	0,053	LD	0,09	LD	0
H2	0,624	H2	0,179	H2	0,745	H2	0,001
F.20	0,093	F.20	0,107	F.20	0,745	F.20	0,009
LH5	0,06	LH5	0,061	LH5	0,074	LH5	0,041

1.18. ATIVIDADE ENZIMÁTICA / MICROAEROFÍLICA /
MEIO SERRAGEM / 20 DIAS

CMCase		Avicelase		Xilanase		B-glicosidase	
Erlenmeyer		Erlenmeyer		Erlenmeyer		Erlenmeyer	
Linhagens	UI/mL	Linhagens	UI/mL	Linhagens	UI/mL	Linhagens	UI/mL
Q10	0,084	Q10	0,136	Q10	0,295	Q10	0,001
LD	0,054	LD	0,064	LD	0,08	LD	0
H2	0,108	H2	0,059	H2	0,215	H2	0
F.20	0,177	F.20	0,06	F.20	0,558	F.20	0,203
LH5	0,078	LH5	0,059	LH5	0,403	LH5	0,316

1.19. ATIVIDADE ENZIMÁTICA / MICROAEROFÍLICA /
MEIO SERRAGEM / 35 DIAS

CMCase		Avicelase		Xilanase		B-glicosidase	
Erlenmeyer		Erlenmeyer		Erlenmeyer		Erlenmeyer	
Linhagens	UI/mL	Linhagens	UI/mL	Linhagens	UI/mL	Linhagens	UI/mL
Q10	0,11	Q10	0,122	Q10	0,234	Q10	0,006
LD	0,056	LD	0,05	LD	0,098	LD	0
H2	0,15	H2	0,064	H2	0,278	H2	0,001
F.20	0,136	F.20	0,05	F.20	0,745	F.20	0,313
LH5	0,063	LH5	0,05	LH5	0,33	LH5	0,316

1.20. ATIVIDADE ENZIMÁTICA / AGITAÇÃO/MEIO BAGAÇO/06 DIAS

CMCase		Avicelase		Xilanase		B-glicosidase	
Erlenmeyer		Erlenmeyer		Erlenmeyer		Erlenmeyer	
Linhagens	UI/mL	Linhagens	UI/mL	Linhagens	UI/mL	Linhagens	UI/mL
Q10	0,069	Q10	0,086	Q10	0,111	Q10	0,013
LD	0,086	LD	0,107	LD	0,109	LD	0,01
H2	0,077	H2	0,136	H2	0,287	H2	0,009
F.20	0,524	F.20	0,129	F.20	0,745	F.20	0,031
LH5	0,064	LH5	0,086	LH5	0,641	LH5	0,218

1.21. ATIVIDADE ENZIMÁTICA / AGITAÇÃO /
MEIO SERRAGEM / 06 DIAS

CMCase		Avicelase		Xilanase		B-glicosidase	
Erlenmeyer		Erlenmeyer		Erlenmeyer		Erlenmeyer	
Linhagens	UI/mL	Linhagens	UI/mL	Linhagens	UI/mL	Linhagens	UI/mL
Q10	0,061	Q10	0,143	Q10	0,149	Q10	0,01
LD	0,077	LD	0,15	LD	0,131	LD	0,009
H2	0,069	H2	0,129	H2	0,097	H2	0,027
F.20	0,308	F.20	0,11	F.20	0,745	F.20	0,315
LH5	0,061	LH5	0,109	LH5	0,287	LH5	0,218

1.22. ATIVIDADE ENZIMÁTICA / AGITAÇÃO E MICROAEROFILIA /
MEIO PAPEL DE FILTRO / 13 DIAS

CMCase		Avicelase		Xilanase		B-glicosidase	
Erlenmeyer		Erlenmeyer		Erlenmeyer		Erlenmeyer	
Linhagens	UI/mL	Linhagens	UI/mL	Linhagens	UI/mL	Linhagens	UI/mL
Q10	0,041	Q10	0,054	Q10	0,068	Q10	0,003
LD	0,049	LD	0,041	LD	0,052	LD	0
H2	0,061	H2	0,042	H2	0,063	H2	0,017
F.20	0,187	F.20	0,187	F.20	0,223	F.20	0,138
LH5	0,041	LH5	0,041	LH5	0,068	LH5	0,122

1.23. ATIVIDADE ENZIMÁTICA / AGITAÇÃO E MICROAEROFILIA /
MEIO BAGAÇO DE CANA / 13 DIAS

CMCase		Avicelase		Xilanase		B-glicosidase	
Erlenmeyer		Erlenmeyer		Erlenmeyer		Erlenmeyer	
Linhagens	UI/mL	Linhagens	UI/mL	Linhagens	UI/mL	Linhagens	UI/mL
Q10	0,064	Q10	0,096	Q10	0,244	Q10	0,034
LD	0,058	LD	0,122	LD	0,123	LD	0,009
H2	0,265	H2	0,136	H2	0,745	H2	0,025
F.20	0,481	F.20	0,136	F.20	0,745	F.20	0,05
LH5	0,058	LH5	0,058	LH5	0,168	LH5	0,219

1.24. ATIVIDADE ENZIMÁTICA / AGITAÇÃO E MICROAEROFILIA /
MEIO SERRAGEM / 13 DIAS

CMCase		Avicelase		Xilanase		B-glicosidase	
Erlenmeyer		Erlenmeyer		Erlenmeyer		Erlenmeyer	
Linhagens	UI/mL	Linhagens	UI/mL	Linhagens	UI/mL	Linhagens	UI/mL
Q10	0,122	Q10	0,15	Q10	0,192	Q10	0,009
LD	0,096	LD	0,093	LD	0,092	LD	0,011
H2	0,064	H2	0,067	H2	0,226	H2	0,034
F.20	0,254	F.20	0,079	F.20	0,745	F.20	0,283
LH5	0,058	LH5	0,073	LH5	0,164	LH5	0,235