

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS.
INSTITUTO DE QUÍMICA

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À REDAÇÃO FINAL DA
TESE DEFENDIDA POR JAIME PATRÍCIO RODRÍGUEZ
GUTIERREZ E APROVADO PELA COMISSÃO JULGADORA

Nelson Durán

17/11/91

coat

Estudo do Sistema Ligninolítico do Ascomiceto

Chrysonilia sitophila

JAIME PATRICIO RODRIGUEZ GUTIERREZ

Tese de Doutorado

Orientador Prof. Dr. Nelson Durán

Campinas, Novembro de 1990.

Agradecimentos

Ao professor Dr. Nelson Durán pela confiança e orientação, ao André e à Raquel pelas inúmeras contribuições, à Dra. Irene Ferrer e aos meus colegas de laboratório pela colaboração, ao Instituto de Química e a seus funcionários pelo apoio técnico e material e à FAPESP e CAPES pelas bolsas concedidas.

Partes desta tese foram publicadas nos seguintes anais e periódicos.

- "Chrysonilia sitophila TFB 27441: A Hyperligninolytic Strain".
Biotechnol. Lett. 9:357-360 (1987).
Durán N., J. Rodríguez, A. Ferraz e V. Campos.
- "Some News Aspects of The Enzymatic Lignin Biodegradation".
Brazilian J. Med. Biol. Res. 21:411-422 (1988).
Rodríguez J. e N. Durán.
- "Ligninase from Chrysonilia sitophila (TFB 27441 strain)".
Appl. Biochem. Biotechnol. 16:157-168 (1988).
Durán N., I. Ferrer e J. Rodríguez.
- "Biodegradation of Pre-irradiated Dioxane-Lignin from Pinus radiata D. Don".
VI Workshop Brasil-Chile in Biorganic Chemistry. Janeiro, 1988. Santiago, Chile. pp. 94-99.
Ferrer I., N. Durán, A. Bruna e J. Rodríguez.
- "Biomass Photochemistry XIII: Pre-Irradiated Lignin from Pinnus radiata D. Don and its Degradation by Ligninase and Horseradish Peroxidase".
J. Photochem. Photobiol. 41:261-267 (1988).
Durán N., I. Ferrer, J. Rodríguez, H. Mansilla e J. Baeza.
- "Production, Characterization and Kinetic Studies of Ligninase Extracted from Chrysonilia sitophila".
Anais do "First Brazilian Symposium on the Chemistry of Lignins and Other Wood Components". pp 228-233, Setembro 4-6, 1989, São Carlos S.P., Brasil.
Ferrer I., C. G. Castro, J. Rodríguez e N. Durán.

- "Comparison of Different fungi for Ligninase Production: Phanerochaete chrysosporium (BKM-F-1767) and Chrysonilia sitophila (TFB-27441)".

Anais do "First Brazilian Symposium on the Chemistry of Lignins and Other Wood Components". pp 324-328 Setembro 4-6, 1989, São Carlos S.P., Brasil.

Rodríguez J., A. Ferraz, P. Mattos e N. Durán.

- "Biotransformation of Lignosulfonates by Chrysonilia sitophila".

Anais do "First Brazilian Symposium on the Chemistry of Lignins and Other Wood Components". 222-227, Setembro 4-6, 1989, São Carlos S.P., Brasil.

Rodríguez J. e N. Durán.

- "Biodegradación de Ligninas Pré-tratadas Fotoquimicamente". XVIII Jornadas Chilenas de Química, 27 novembro - 1º dezembro, 1989. Contribuciones Científicas y Tecnológicas, Número Especial tomo 1, pp.118-120, 1989.

Ferrer I., N. Durán, A. Bruna e J. Rodríguez.

- "Production of Single Cell Proteins and Extracellular Enzymes by Chrysonilia sitophila (TFB 27441 strain)".

Appl. Biochem. Biotechnol. (no prelo).

O'Reilly S., S. Erazo, V. Campos, E. Salas, J. Baeza, J.

Rodríguez, A. Ferraz e N. Durán.

- "Biodegradation of Lignosulfonate by Chrysonilia sitophila".

Appl. Biochem. Biotechnol. (no prelo).

Rodríguez J. e N. Durán.

I N D I C E

RESUMO

ABSTRACT

ABREVIATURAS

1.	INTRODUÇÃO	1
1.1	Lignina: Estrutura e biossíntese	1
1.2	Biodegradação da lignina	5
1.2.1	Fungos	5
1.2.2	Bactérias	6
1.3	Enzimologia da degradação de lignina	7
1.3.1	Lignina-Peroxidase	12
1.3.2	Manganes-Peroxidase	16
1.3.3	Oxidases	17
1.3.4	Lacases	17
1.4	Fisiologia da degradação de lignina e da produção de ligninase	18
1.4.1	Fisiologia da biodegradação de lignina	18
1.4.2	Produção de lignina-peroxidase em biorreatores	20
1.5	<u>Chrysonilia sitophila</u> : Aspectos Gerais	22
1.6	Algumas aplicações dos sistemas enzimáticos que degradam lignina	23
1.7	Objetivo	25

2.	EXPERIMENTAL	26
2.1	Equipamentos	26
2.2	Reagentes	26
2.3	Microorganismo e Meio de cultivo	27
2.4	Ensaio em placa para fenol-oxidase	28
2.5	Medida da atividade fenol-oxidase	28
2.6	Medida da atividade ligninase	
2.7	Método quimiluminescente para medir a atividade ligninolítica total de uma cultura	29
2.8	Determinação de peróxido de hidrogênio	30
2.9	Imobilização em nylon e em espuma de poliuretano	30
2.10	dição de detergentes no meio de cultivo	31
2.11	Culturas em biorreator	31
2.12	Determinação de açúcares	31
2.12.1	Método do DNS para açúcares redutores	31
2.12.2	Método do fenol-ácido sulfúrico para açúcares totais	32
2.13	Determinação de proteínas	32
2.14	Purificação de proteína	33
2.15	Determinação de grupos heme	33
2.16	Eletroforese das ligninases	34
2.17	Eletrofocalização das ligninases	36
2.18	Determinação de parâmetros cinéticos	37
2.19	Degradação do álcool veratrílico	38
2.20	Isolamento de compostos do meio de cultura	38
2.21	Biodegradação de lignossulfonatos	39
2.22	Permeação em gel do lignossulfonato	39

2.23 Método da nitrosolignina	40
2.24 Irradiação do lignossulfonato	40
2.25 Quimiluminescência do lignossulfonato em meio básico	41
2.26 Análise de grupos metoxila do lignossulfonato	41
2.27 Análise de grupos fenólicos do lignossulfonato	43
2.28 Análise de grupos carboxila do lignossulfonato	44
2.29 Obtenção de lignina-dioxano de madeira de Pinus	45
 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.	 47
3.1 Produção de fenol-oxidases e peróxido de hidrogênio	47
3.2 Influência das condições de cultivo na biodegradação de lignossulfonato	51
3.2.1 Cultura estacionária Vs. cultura agitada	53
3.2.2 Efeito da concentração de nitrogênio e de oxigenação	56
3.3 Influência das condições de cultivo na produção de ligninase	72
3.3.1 Imobilização em suportes poliméricos	72
3.3.2 Adição de detergentes	74
3.4 Purificação das ligninases	81
3.5 Cultivos em biorreator	85
3.6 Biossíntese e degradação de álcool veratrílico pelo meio extracelular de <u>C.sitophila</u>	91
3.6.1 Biossíntese de álcool veratrílico	91
3.6.2 Biodegradação de álcool veratrílico	94
3.7 Medida da atividade enzimática por quimiluminescência	97

3.8	Tratamento combinado fotoquímico microbiológico do lignossulfonato	100
4.	CONCLUSÃO GERAL	109
5.	BIBLIOGRAFIA	111

RESUMO

Neste trabalho, foi estudada a produção e caracterização das ligninases de Chrysonilia sitophila, a biodegradação de lignossulfonato e outros aspectos relacionados com o sistema ligninolítico deste ascomiceto.

A produção de enzimas foi influenciada pela composição do substrato, sendo que materiais contendo lignina, como madeira de pinus, bagaço de cana e casca de arroz, induziram a uma maior produção de fenol-oxidases e de H_2O_2 .

Alta concentração de nitrogênio (76 mM/l) e cultura não oxigenada foram as condições de cultivo para maiores biotransformações de lignossulfonato por este microorganismo segundo determinado pelas variações na absorbância, fluorescência e distribuição de pesos moleculares. A intensidade da biodegradação de lignossulfonato foi de 48 %, medida pelo método da nitrosolignina.

Análises do lignossulfonato antes e após biodegradação foram realizadas e comparadas com o processo de degradação fotoquímica.

Três enzimas com atividade ligninase foram separadas. Estas são hemoproteínas com peso molecular de 68,0 , 48,3 e 48,0 kDa e pontos isoeletrônicos de 9,1 , 7,8 e 4,5 respectivamente. Características espectroscópicas, pH e concentração de H_2O_2 ótimo foram determinados.

Foi detectada a presença de álcool veratrílico no meio extracelular de C. sitophila e seus produtos de degradação foram estudados por HPLC e espectroscopia UV.

Em culturas realizadas num biorreator de 15 l foram obtidas 250 U/l de ligninase medidas pela oxidação do álcool veratrílico ao correspondente aldeído.

Também foi experimentada a imobilização do fungo em suportes poliméricos (nylon e poliuretano) obtendo-se um aumento na produção de ligninase. O uso dos detergentes Twen-80 e triton x-100 para aumentar a atividade ligninase é discutido.

Um método quimiluminescente é sugerido para medir a atividade ligninolítica total de uma cultura, o qual mostrou boa correlação com a atividade ligninase.

A B S T R A C T

The production and characterization of ligninases from Chrysonilia sitophila, the biodegradation of lignosulfonate and other aspects related to the ligninolytic system of this fungus was studied.

The production of the enzymes was influenced by the substrate composition. A higher production of phenol-oxidase and H_2O_2 was reached when materials containing lignin like wood pinus, sugar cane bagasse and rice hull were used as substrates.

High nitrogen concentration (76 mM/l) and non oxygenated culture were the best culture conditions for greater lignosulfonate biodegradation by this microorganism, determined by the absorbance variations, fluorescence and molecular weight distribution. The intensity of lignosulfonate biodegradation by C.sitophila, measured by the nitrosolignin method, was 48 %.

Analysis of the lignosulfonate before and after biodegradation were made and compared with the process of photochemical degradation.

Three enzymes with ligninase activity were isolated. They are hemoproteins with molecular weight 68.0, 48.3 and 48.0 KDa and isoelectric points 9.1, 7.8 and 4.5 respectively. Spectroscopic characteristics, optimum pH and H_2O_2 concentrations were determined.

Veratryl alcohol was detected in the extracellular medium of C. sitophila and its degradation products were studied by HPLC and UV spectroscopy.

Cultures carried out in 15 l bioreactor produced 250 U/l of ligninase measured by the oxidation of veratryl alcohol to the

correspondent aldehyde.

Fungal immobilization on polymeric supports (nylon and polyurethane foam) increased the production of ligninase. The use of Tween 80 and triton X-100 in order to increase ligninase production is discussed.

A quimiluminescent method is suggested to measure the total ligninolytic activity of a culture, which showed good correlation to ligninase activity.

ABREVIATURAS

CBQ: Celobiose quinona oxidorredutase

XBQ: Xilose quinona oxidorredutase

ALC. VER.: Alcool veratrílico

V.A.Oxidase: Alcool veratrílico oxidase

SDS: Dodecil Sulfonato de Sódio

CPS: Contas por segundo

CPM: Contas por minuto

LS: Lignossulfonato

HRP: Peroxidase de raiz forte

LiP: Lignina Peroxidase

1. INTRODUÇÃO

A biomassa é composta principalmente por materiais lignocelulósicos (95%) produzidos através da fotossíntese. Deste total, aproximadamente 40 % corresponde à celulose, 20 % à lignina e 20% à hemicelulose. Em virtude da sua abundância e importância como fonte renovável de recursos químicos, seu estudo vem merecendo maior atenção a cada dia.

A biodegradação da lignina apresenta interessantes problemas a nível fisiológico, enzimológico e mecanístico, que apesar da intensa pesquisa nos últimos quinze anos, ainda não estão totalmente esclarecidos. O estudo do sistema ligninolítico de novos microrganismos, pode ajudar à compreensão destes problemas.

Considerando que a biotecnologia implica na exploração tecnológica dos processos biológicos, uma série de aplicações na indústria de polpa de celulose, no aproveitamento de resíduos agroindustriais, e no tratamento de contaminantes ambientais, surgem do conhecimento acumulado no estudo da biodegradação da lignina e serão discutidas no item 1.6 (p.23).

1.1 LIGNINA: ESTRUTURA E BIOSÍNTESE.

A lignina é um polímero aromático, tridimensional, composto basicamente de três diferentes tipos de álcoois p-hidroxicinnílicos (Figura 1). A lignina, junto com a hemicelulose e pectina rodeia os espaços entre as fibrilas de celulose, dando às plantas resistência ao esforço mecânico e formando uma barreira protetora

contra o ataque de microorganismos.

A quantidade relativa dos álcoois cinamílicos no polímero determina o tipo de lignina. Ligninas de madeira mole são principalmente polímeros de álcool coniferílico; ligninas de madeira dura são misturas poliméricas de álcool coniferílico e álcool sinapílico e ligninas de ervas são misturas dos três álcoois (Fengel e Wegener, 1984).

A biossíntese da lignina começa com a conversão da glicose produzida na fotossíntese, em ácido chiquímico, a partir do qual são formados os aminoácidos aromáticos L-fenilalanina e L-tirosina via ácido prefênico (figura 1). Os aminoácidos são desaminados a seus correspondentes ácidos cinâmicos, os quais, por sucessivas hidroxilações e metilações, produzem os ácidos p-cumárico, cafeico, ferúlico, 5-hidróxi-ferúlico e ácido sinapílico. Os correspondentes álcoois cinamílicos são finalmente formados por ativação enzimática e redução dos correspondentes ácidos e aldeídos. Todas as transformações acima ocorrem por via enzimática que incluem lacases e peroxidases (Fengel e Wegener, 1984).

A macromolécula lignina, é o resultado da combinação radicalar dos álcoois cinamílicos e não pode ser descrita por uma simples combinação de poucas unidades monoméricas ligadas em forma repetitiva, como no caso da celulose ou polioses. Sua estrutura é matéria de modelos, e um deles está representado na figura 2 (Tien, 1987).

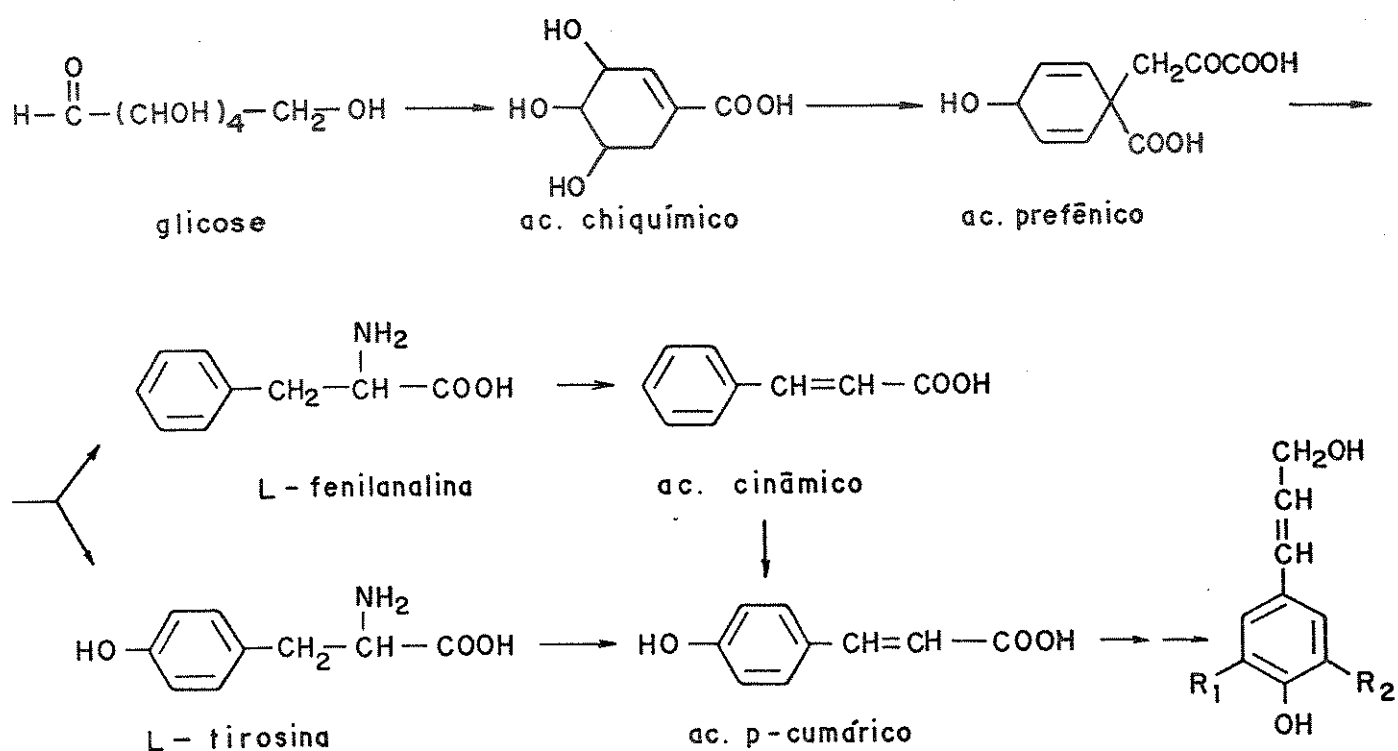


FIGURA 1. Biossíntese da lignina ($\text{R}_1=\text{R}_2=\text{H}$: Alcool p-cumarílico; $\text{R}_1=\text{H}$, $\text{R}_2=\text{OCH}_3$: Alcool coniferílico; $\text{R}_1=\text{R}_2=\text{OCH}_3$: Alcool sinapílico. (Fengel e Wegener, 1984).

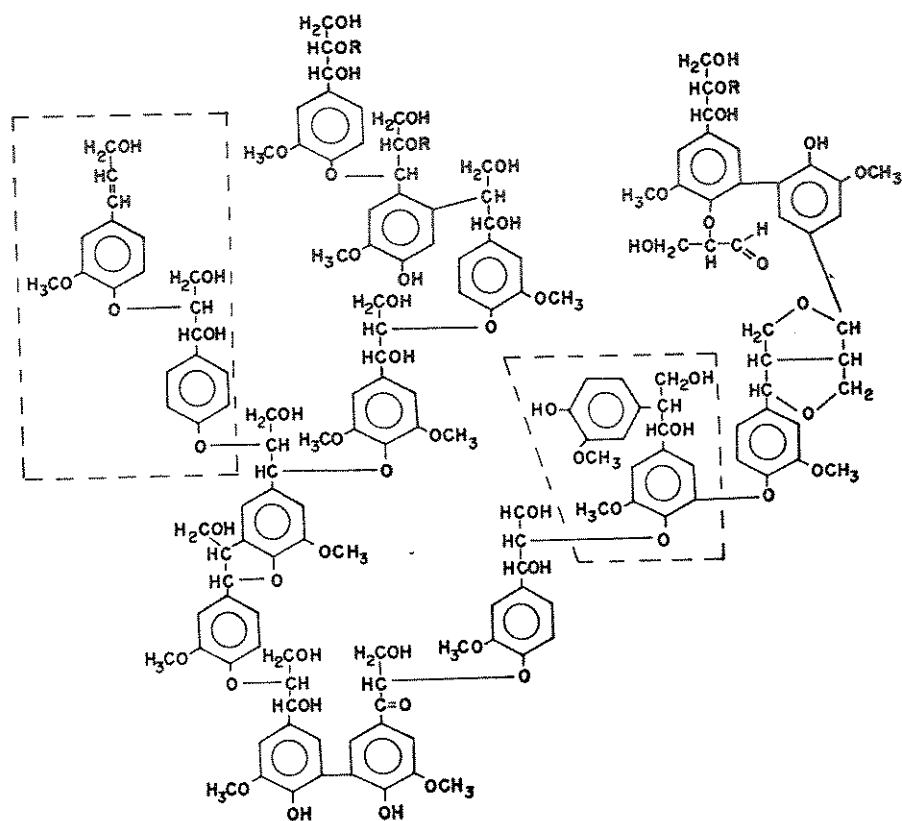


FIGURA 2. Estrutura representativa da lignina. As estruturas em destaque correspondem aos modelos β -O-4 (esquerda) e β -1 (direita) utilizados em estudos de degradação de lignina (Tien, 1987).

1.2 BIODERGRADAÇÃO DA LIGNINA.

A degradação biológica da lignina é uma parte importante do ciclo de carbono-oxigênio, sendo quantitativamente um dos mais importantes ciclos da biosfera. Diversos fungos e algumas espécies de bactérias são capazes de degradar lignina (entendendo o termo degradação num senso amplo que inclui não só a completa decomposição para CO_2 e H_2O mas também várias modificações ou bioalterações tais como desmetilações, oxidações e reduções parciais). Na natureza, a degradação da lignina é o resultado da ação cooperativa entre diferentes tipos de microorganismos.

1.2.1 Fungos.

Segundo o tipo de degradação que causam na madeira, os fungos podem ser classificados da seguinte forma: a) Fungos de decomposição branca ("White rot fungi"), são capazes de degradar os três principais componentes da madeira (celulose, lignina e hemicelulose) em velocidades similares (Kirk e Farrell, 1987). A este grupo pertencem os mais eficientes e mais estudados fungos degradadores de lignina, b) Fungos de decomposição parda ("Brown rot fungi") são responsáveis pela degradação dos polissacarídeos da madeira, causando limitadas modificações na lignina, deixando intactos os anéis aromáticos, c) Fungos de decomposição branda ("soft rot fungi"), produzem um amolecimento característico na superfície da madeira, degradando a lignina mais lentamente que os carboidratos, causando limitadas modificações.

Os fungos de tingimento azul ("blue staining fungi") também são associados a madeiras deterioradas, porém eles não causam sua degradação (Fengel e Wegener, 1984).

O mais estudado fungo que degrada lignina é o basidiomiceto de decomposição branca Phanerochaete chrysosporium isolado inicialmente por Burdsall e Esllyn (1974), porém têm sido relatados outros fungos capazes de degradar lignina tão eficientemente como ele: Coriolus versicolor, Pycnoporus cinnabarinus, Phlebia radiata, Poria subacida, etc. (Leisola e Fiechter, 1985; Enoki e col., 1988; Durán e col. 1990a, revisão) e recentemente IZU-154 que tem demonstrado alta capacidade para degradar lignina (Nishida, 1989).

1.2.2 Bactérias

Somente poucas espécies de bactérias capazes de atacar a macromolécula de lignina são conhecidas. Entre elas a mais estudada é Streptomyces viridosporus (Deobald e Crawford, 1989 e referências ali incluídas). Usualmente a extensão e velocidade da degradação causada por bactérias tem sido modesta comparada com fungos de decomposição branca.

Na mineralização de lignina por S. viridosporus, uma grande parte dela é transformada num polímero solúvel em água que precipita a pH ácido conhecido como APPL (do inglês "acid-precipitable polymeric lignin") (Crawford e col. 1983). Uma vez produzido, APPL é relativamente resistente à posterior degradação por Streptomyces. A degradação de lignina por bactérias foi recentemente revisada por Vicuña (1988).

1.3 ENZIMOLOGIA DA DEGRADAÇÃO DE LIGNINA.

A biodegradação da lignina é realizada pela ação de várias enzimas extracelulares que variam de um microorganismo para outro. Entre elas podemos citar as fenol-oxidases, oxidases, demetoxilases, etc.

Fenoloxidase é um nome genérico para designar três tipos de enzimas: peroxidases, lacases e tirosinases (Ander e Eriksson, 1978). As peroxidases são enzimas que contêm um grupo heme e requerem peróxido de hidrogênio. Lacases e tirosinases contêm cobre, não requerem peróxido e variam entre elas pela especificidade quanto ao substrato. As tirosinases em geral são intracelulares, o que as faz de menor importância na degradação da lignina.

A presença destas enzimas tem sido relacionada com a habilidade dos microorganismos em degradar lignina. Isto foi demonstrado em 1983 pela descoberta de uma peroxidase em culturas de P. chrysosporium (Tien e Kirk, 1983; Glen e col. 1983) chamada de lignina-peroxidase ou ligninase e de uma outra peroxidase dependente de manganês, chamada de manganês-peroxidase (Kuwahara e col., 1984). A tabela 1 apresenta as enzimas envolvidas na biodegradação de lignina e os microorganismos produtores.

A relação entre as enzimas envolvidas na degradação de materiais lignocelulósicos, pode ser visualizada na figura 3 baseada em experiências com P. chrysosporium.

A biodegradação dos polissacarídeos vegetais, tais como celulose e hemicelulose foi revisada recentemente por Ward e Moo-

Young (1989).

A necessidade da ação de múltiplas enzimas para a despolimerização de lignina deve-se ao fato de que as fenol-oxidases proporcionam a formação de radicais que espontaneamente repolimerizam, o que deve ser evitado pela ação de outras enzimas. Até o presente, não foi possível encontrar uma mistura de enzimas que despolimerize lignina in vitro, o que só acontece na presença de culturas intactas de microorganismos (Kern e col. 1989; Eriksson, 1990). Somente em casos específicos como lignossulfonatos, lignina-DHP na presença de solvente orgânico e lignina em lignocelulósicos foi observada biodegradação por peroxidases na ausência de micélio. É possível que a repolimerização de lignina observada in vitro seja uma excessão, já que in natura a lignina faz parte de uma matriz composta de carboidrato ligada covalentemente à hemicelulose, onde a repolimerização é evitada (Haemmerli e col., 1988 e referências ali incluídas).

O mecanismo da degradação enzimática da lignina foi elucidado com o uso de compostos-modelo de lignina (Higuchi, 1989), como os dímeros mostrados em destaque na figura 2, e através de estudos de biodegradação in situ (Cheng e Chang, 1985).

T A B E L A 1. MICROORGANISMOS PRODUTORES DE ENZIMAS ENVOLVIDAS
NA BIODEGRADAÇÃO DE LIGNINAS

LIGNINA PEROXIDASE / LIGNINASE

<u>Phanerochaete chrysosporium</u>	Tien e Kirk, 1983; Glenn e col. 1983; Tien, 1987 (revisão).
<u>Coriolus versicolor</u>	Dodson e col., 1987; Lobarzewski, 1990 (revisão).
<u>Chrysonilia sitophila</u>	Durán e col., 1987, 1988a.
<u>Merulius tremellosus</u>	Biswas-Hawkes e col., 1987.
<u>Phlebia radiata</u>	Niku-Paavola 1987; Niku-Paavola e col., 1990 (revisão).
<u>Chrysosporium pruinsum</u>	Waldner e col., 1988.
<u>Streptomyces viridosporus</u>	Rachamandra e col., 1987, 1988.
<u>Coriolopsis occidentalis</u>	Nerud e Misurcová, 1989.

MANGANÊS PEROXIDASE

<u>Phanerochaete chrysosporium</u>	Kuwahara e col., 1984; Gold e col., 1989 (revisão)
<u>Trametes (Coriolus) versicolor</u>	Johansson e Nyman, 1987
<u>Phlebia radiata</u>	Hattaka e col. 1989; Niku- Paavola e col., 1990
<u>Coriolopsis occidentalis</u>	Nerud e Misurcová, 1989
<u>Lentinula (Lentinus) edodes</u>	Forrester e col. (1990)

ALDEÍDO AROMÁTICO OXIDASE/ARIL-ÁLCOOL OXIDASE/ V.A. OXIDASE

<u>Coriolus versicolor</u> (*)	Farmer e col., 1960.
<u>Pleurotus ostreatus</u>	Waldner e col., 1988
<u>Bjerkandera adusta</u>	Waldner e col., 1988
<u>Fomes lignosus</u>	Waldner e col., 1988
<u>Pleurotus sajor-caju</u>	Bourbonnais e Paice, 1988
<u>Streptomyces viridosporus</u>	Deobald e Crawford, 1989
<u>Pleurotus eryngii</u>	Guillén e col., 1990

(*) Não foi medida oxidação de álcool veratrílico para aldeído.

LACASE (&)

<u>Agaricus bisporus</u>	Wood, 1980.
<u>Pleurotus ostreatus</u>	Platt e col. 1984.
<u>Daedalea flavida</u>	Arora e Sandhu, 1985.
<u>Rigidosporus lignosus</u>	Geiger e col., 1986
<u>Phellinus noxius</u>	Geiger e col., 1986
<u>Trametes versicolor</u>	Von Hunolstein e col., 1986
<u>Phlebia radiata</u>	Niku-Paavola, 1987; Niku-Paavola e col., 1990.
<u>Pleurotus sajor-caju</u>	Bourbonnais e Paice, 1988

(&) Somente estão considerados alguns microorganismos descritos como degradadores de lignina.

1.3.1 Lignina-peroxidase.

Em 1983 Tien e Kirk e Glenn e col. descobriram simultaneamente, uma peroxidase extracelular envolvida na degradação de lignina. Esta descoberta foi possível graças ao trabalho de Forney e col. (1982) que descreveu uma relação entre a atividade ligninolítica de P. chrysosporium e a produção de H_2O_2 .

Esta enzima foi chamada de ligninase e posteriormente lignina-peroxidase (LiP). As purificações iniciais de LiP apresentaram dados descrevendo apenas uma enzima de peso molecular 42.000 Da e ponto isoelétrico de 3,5 (Tien e Kirk, 1984; Gold e col. 1984). Posteriormente foi demonstrado que em culturas de P. chrysosporium, LiP são uma família de isoenzimas e sua proporção e natureza, variam com a cepa e condições de cultivo utilizadas (Leisola e col. 1987; Kirk e col. 1986). Estas isoenzimas foram estudadas em detalhe por Farrell e col. (1989) e por Glumoff e col. (1990).

Lignina-peroxidase tem um potencial de oxidação superior às peroxidases típicas, como peroxidase de raiz forte (HRP). LiP é capaz de oxidar todos os substratos oxidados por HRP mais uma variedade de compostos aromáticos metoxilados usados em estudos como compostos modelo de lignina, que não são substrato para HRP. É possível que o fator principal da maior capacidade de oxidar substratos por LiP seja devido à condição de pH muito ácido (2,5) requerida por esta enzima o que facilita a formação de cátion radicalar (Palmer e col. 1987).

A medida de atividade de LiP está baseada na oxidação de álcool veratrílico (álcool 3,4-dimetoxibenzílico) para aldeído veratrílico que absorve intensamente em 310 nm. Com este ensaio, tem sido possível detectar atividade lignina-peroxidase no meio extracelular de vários microorganismos, como mostrado na tabela 1. Assim como outras peroxidases, o passo inicial na catálise de LiP é a reação de LiP com H_2O_2 como mostrado na figura 4. O mecanismo de ação da LiP envolve a abstração de um elétron do anel aromático da lignina, formando cátion radicalar, como mostrado na figura 5, para a degradação do álcool veratrílico.

Álcool veratrílico é um metabólito secundário de P. Chrysosporium (Lundquist e Kirk, 1978) e tem um papel importante na biodegradação de lignina por este fungo, atuando na indução e estabilização das ligninases (Faison e Kirk 1985, Faison e col. 1986, Haemmerli e col. 1986). Harvey e col. (1986) propuseram que o álcool veratrílico atua como um mediador na oxidação da lignina por ligninases (figure 6). Glenn e col. (1986) sugeriram um mecanismo análogo, usando um complexo Mn^{++} -lactato e Mn-peroxidase.

As propriedades de LiP foram excelentemente revisadas por Tien (1987) e Gold e col. (1989).

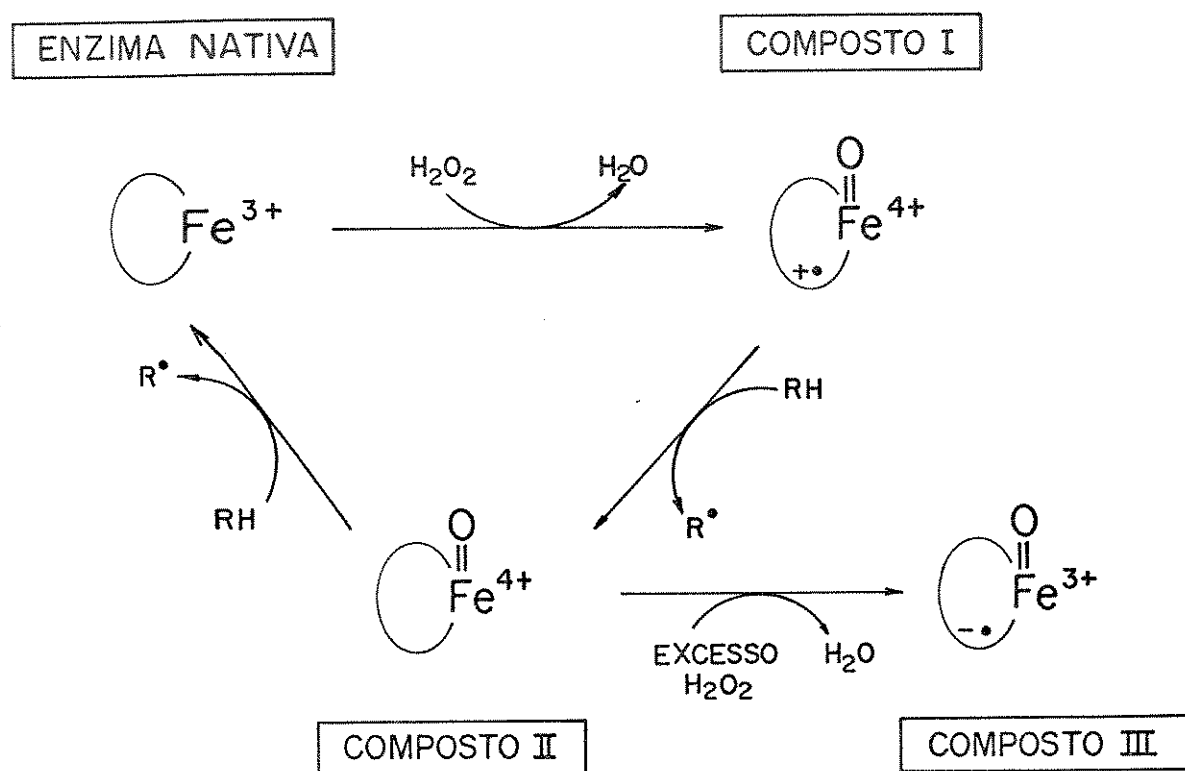


FIGURA 4. Ciclo catalítico da Lignina-peroxidase. (Gold e col., 1989).

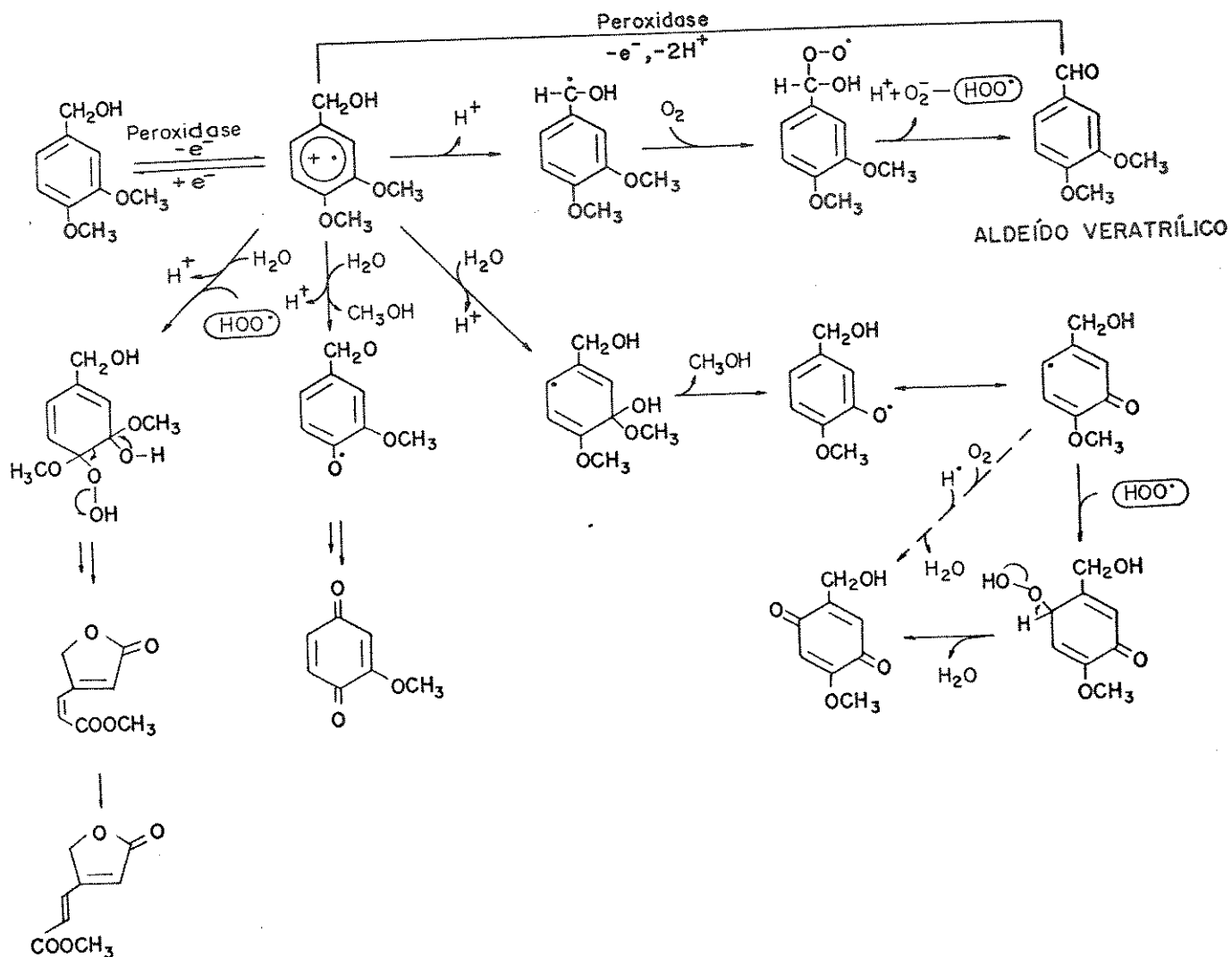


FIGURA 5. Mecanismo da degradação de álcool veratrílico por Lignina-Peroxidase de *P. chrysosporium* (Haemmerli e col., 1987).

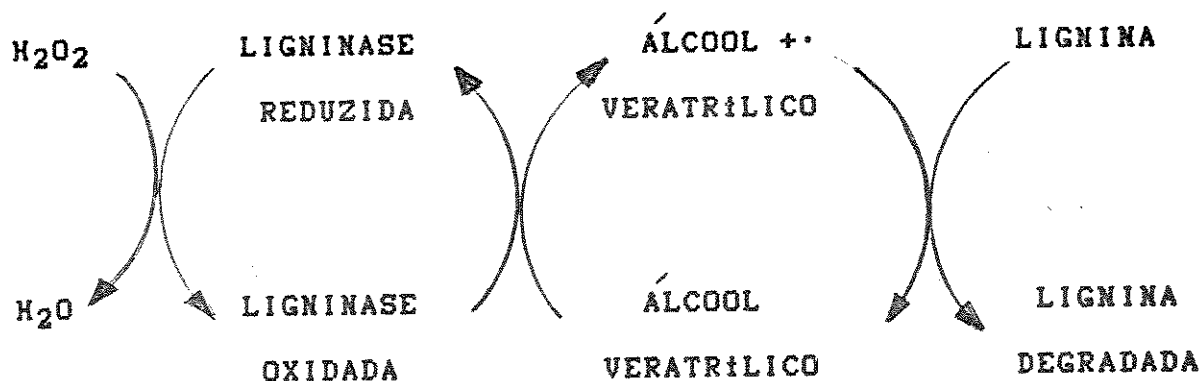


FIGURA 6. Degradação de lignina por ligninase com álcool veratrílico como mediador.

1.3.2 Manganês-peroxidase.

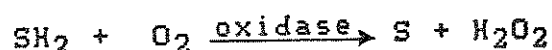
Subsequente à descoberta de LiP, Kuwahara e col. (1984) identificaram em culturas de P. chrysosporium uma outra peroxidase que depende de manganês para sua atividade. Esta enzima existe como uma série de isoenzimas com ponto isoelétrico variando de 4,2 até 4,9 e é uma glicoproteína de peso molecular aproximado de 46.000 Da (Glenn e Gold, 1985; Gold e col., 1989). MnP é quantificada pela oxidação de fenol-vermelho (Gold e col. 1989) ou vanililcetona (Paszczyński e col., 1985) na presença de Mn(II).

No mecanismo de MnP, Mn(II) é oxidado para Mn(III) que por sua vez oxida uma grande variedade de fenóis e corantes. Presumivelmente, Mn(III) difunde-se na matriz polimérica da lignina e oxida os grupos fenólicos livres. Paszczyński e col. (1986) mostraram que MnP oxida vários substratos reduzidos: glutatona, NADPH e ácido dihidroximaleico ao mesmo tempo que

reduz O_2 para H_2O_2 . Esta reação é uma das fontes de H_2O_2 (necessário para a ação das peroxidases) já que NADH e NADPH estão presentes em culturas de P.chrysosporium.

1.3.3 Oxidases

Oxidases são enzimas que usam oxigênio como aceptor de hidrogênio sendo o oxigênio reduzido para H_2O ou H_2O_2 como mostrado a seguir onde SH_2 representa o substrato.

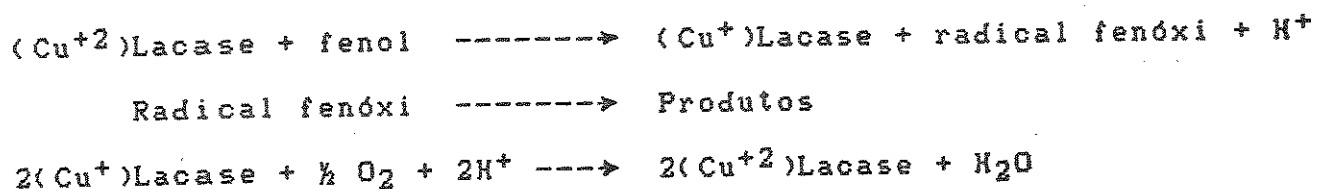


Estas enzimas são as responsáveis pela produção de H_2O_2 extracelular necessário para a ação das peroxidases, entre elas podemos citar acil-CoA oxidase, glucose-oxidase, metanol-oxidase e glioxal-oxidase (Greene e Gould, 1984; Eriksson, 1987a; Kersten e Kirk, 1987). É possível que oxidases estejam envolvidas diretamente na biodegradação de lignina como sugerido após a descoberta de oxidases capazes de oxidar álcool veratrílico para o correspondente aldeído (álcool veratrílico oxidase, ver tabela 1). Já em 1960, Farmer e col. tinham caracterizado uma aril-álcool oxidase a partir de culturas de C. versicolor.

1.3.4 Lacases.

São enzimas coordenadas ao cobre divalente, o qual é reduzido durante a oxidação de fenóis e subsequentemente oxidado

de volta à forma divalente por oxigênio, como mostrado a seguir (Forss e col., 1989).



Lacases catalisam oxidações de orto e para difenóis, compostos fenólicos modelo de lignina e da própria lignina. Lacase pode ser diferenciada de tirosinase já que esta última oxida monofenóis e o-difenóis mas não p-difenóis (Ander e Eriksson, 1978).

1.4 FISILOGIA DA BIODEGRADAÇÃO DE LIGNINA E DA PRODUÇÃO DE LIGNINASES.

1.4.1 Fisiologia da biodegradação de lignina

A fisiologia da degradação de lignina pode ser compreendida considerando o habitat natural dos fungos de decomposição branca, entre eles P. chrysosporium. Vários parâmetros têm sido estabelecidos para este basidiomiceto e são discutidos a seguir:

a) Presença de co-substrato. Não tem sido demonstrada a existência de fungos que possam usar lignina como substrato de crescimento. Todos eles requerem a presença de um outro substrato tal como glicose, celulose, hemicelulose, glicerol e outros, que possa dar a energia necessária para o crescimento. Isto também já

foi demonstrado para C. sitophila, usando lignina dioxano e concentrações variáveis de glicose (Rodríguez, 1987). A presença de glicose também é importante para a produção de H_2O_2 (Eriksson, 1987a), necessário para a ação das peroxidases. Em alta concentração, a glicose reprime a produção de glucose-oxidase (responsável por grande parte da produção de H_2O_2), de tal forma que P. Chrysosporium regula o nível de glicose produzindo o polissacarídeo extracelular 1,3- β -1,6-glicano (Eriksson, 1987a).

b) Concentração de nitrogênio. A lignina não é degradada durante o crescimento primário de P. chrysosporium. O metabolismo de lignina só começa quando o crescimento é terminado devido à limitação de carbono, nitrogênio ou enxofre, porém só a limitação de nitrogênio permite uma extensiva degradação de lignina (Kirk e Farrell, 1987). Quando é usado um material lignocelulósico sem uma fonte de energia adicional, a limitação de nitrogênio não é estritamente necessária para a degradação de lignina. Provavelmente, a limitação parcial de carbono atua como um indutor do sistema enzimático que degrada lignina (Leisola e Fichter, 1985). Uma exceção é a atividade ligninolítica de Lentinus edodes que é manifestada em concentração de nitrogênio não limitante (Leathan, 1986). Um mutante de P. chrysosporium que produz ligninase em abundância de nitrogênio foi obtido por Kuwahara e Asada (1987).

c) Efeito da agitação. A agitação das culturas, geralmente usada para incrementar a tensão de oxigênio, tem um efeito negativo sobre a degradação de lignina, metabolismo de dímeros modelo, síntese de álcool veratrílico e produção de ligninases (Kirk e Far-

rell, 1987). Porém, a degradação de lignina por "pellet" submerso em cultura agitada foi conseguida usando uma cepa mutante (Gold e col., 1984) ou pela adição às culturas da cepa selvagem de P. chrysosporium, de detergente (Asther e col., 1987; Jager e col., 1985), álcool veratrílico (Leisola e Fiechter, 1985) ou álcool benzílico (Kirk, 1987).

d) Outros fatores. Oxigênio molecular é determinante na velocidade de degradação da lignina. O incremento do nível de O_2 no meio de cultivo, aumenta a produção de ligninase e peróxido de hidrogênio. A escolha do tampão do meio também pode afetar significativamente a degradação de lignina. Kern (1983a), por exemplo, mostrou que culturas de P. chrysosporium tamponadas com ácido poliacrílico, mineralizam lignossulfonatos mais rapidamente que aquelas tamponadas com 2,2-dimetilsuccinato, o qual é amplamente usado. A produção de ligninase também foi incrementada pelos íons Cu^{++} ou Mn^{++} quando foram incrementados 10 vezes sobre a quantidade presente no meio base (Kirk e col., 1986). A adição de MnO_2 a culturas de P. chrysosporium aumenta a atividade ligninolítica, provavelmente mimetizando a deposição natural de MnO_2 no micélio de alguns fungos de decomposição branca. Acredita-se que MnO_2 proteja as ligninases contra a inativação e dano por H_2O_2 (Kern, 1989).

1.4.2 Produção de ligninase em biorreatores.

Grandes esforços têm sido realizados por numerosos laboratórios para aumentar a produção de ligninases, a grande maioria

utilizando P. chrysosporium. Nos primeiros trabalhos para a purificação da enzima, cultivando o fungo em Erlenmeyer de 125 ml, níveis tão baixos como 5 U/l eram obtidos (Kirk e Farrell, 1987, revisão), sem sucesso nos esforços para aumentar a escala. No ano de 1986 foi possível obter uma produção de 126 U/l, usando um meio com concentrações maiores de elementos traços, álcool veratrílico como indutor, um "contactor" biológico rotatório construído de poli(metil metacrilato) e uma cepa mutante (SC-26) que adere bem neste material polimérico (Kirk e col. 1986.). Trabalhando com um biorreator adaptado com um tubo de silicone em espiral (usado como suporte para o fungo) e glicerol como fonte de carbono, Willershausen e col. (1987), obtiveram 230 U/l de ligninases.

Em 1987 C. sitophila produzia 67 U/l de ligninase em erlenmeyer de 125 ml (contendo 20 ml de meio) ou 1 l (contendo 200 ml de meio) (Rodríguez, 1987).

Posteriormente Linko (1988) obteve 730 U/l num biorreator de 10 l usando um meio limitante de carbono enriquecido em vitaminas e P. chrysosporium imobilizado em nylon.

A mais alta produção de ligninase foi reportada por Jager e col. (1989) que obteve 1.200 U/l com P. chrysosporium imobilizado em vidro sinterizado macroporoso e usando glicerol como única fonte de carbono.

Usando Plebia radiata imobilizada em polipropileno foram obtidas em bioreator 180 U/l por Kantelin e col. (1989). Em nosso conhecimento, nenhum outro microorganismo além dos dois descritos aqui, foi reportado como produtor de ligninase em biorreatores.

1.5 Chrysonilia sitophila: Aspectos Gerais.

O termo Chrysonilia foi proposto por von Arx (1981) para catalogar Monilia sitophila, por muitos anos conhecido como "bolor vermelho do pão" (Shear e Dodge, 1927. Hawksworth e col. 1983). Chrysonilia sitophila é um ascomiceto no estado anamorfo (presença de células + ou -, correspondendo a diferentes formas sexuais) cujo teleomorfo (células + e -, estado sexual) corresponde a Neurospora sitophila.

Chrysonilia é raramente encontrado em ambientes naturais. A maioria da literatura existente é sobre Neurospora sitophila, fungo que é usado na Indonésia para preparar um fermentado do resíduo de amendoim após a extração do óleo, chamado de ontjom e destinado à alimentação humana (Beuchat 1976; Fardiaz e Markakis, 1981).

Outras comunicações sobre N. sitophila relatam um exuberante crescimento em troncos de árvores queimados, após ataques aéreos no ano 1945 no Japão (Nakazawa e Yamasaki, 1951) e também a utilização de hidrolizados de casca de arroz para produção de proteína unicelular (Akaki 1952 a,b).

Também já foi descrita capacidade celulolítica por Tamura e Takai (1950) e por Akai (1951) que inicialmente chamaram sua cepa de Monilia sitophila e posteriormente de Neurospora sitophila. Horowitz e Shen (1952) detectaram atividade tirosinase em culturas deficientes em enxofre. Mais recentemente Berry e Dekker (1986) relataram o fracionamento das enzimas celulolíticas de uma cepa de Monilia tentativamente classificada como Monilia sitophi-

la, que como vimos não corresponde a uma taxonomia moderna.

C. sitophila TFB 27441 foi isolado por Campos e col. (1986) a partir de macerados do inseto Tribolium ferrugineum encontrado em casca de arroz proveniente do estado de Goiás (Brasil). Atividade celulolítica, ligninolítica e a produção de proteínas unicelulares (SCP) têm sido reportados (Durán e col. 1987, Rodríguez 1987, O'Reilly e col., 1990). A otimização das condições de crescimento utilizando celulose como fonte de carbono foi realizada por Ferraz e Durán (1989) e a produção de SCP e degradação dos constituintes da casca de Pinus radiata por Freer e col. (1990).

A biodegradação de compostos modelos β -O-4 (Figura 2) e outros monômeros relacionados com lignina foi recentemente publicado (Nogueira, 1990).

1.6 ALGUMAS APLICAÇÕES DOS SISTEMAS ENZIMÁTICOS QUE DEGRADAM LIGNINA.

As aplicações potenciais dos sistemas enzimáticos que degradam lignina podem ser classificadas em: a) manufatura de produtos celulósicos, b) conversão de lignocelulósicos em rações animais, c) conversão de subprodutos de lignina em produtos de utilidade industrial e d) tratamento de resíduos de derivados de lignina e outros resíduos organoquímicos (Kirk e Chang, 1981; Kirk e Farrell, 1987).

A manufatura de produtos celulósicos usando mutantes celulose-negativos (Cel⁻), espécies de fungos selecionadas, ou condições adequadas de nutrientes, é de grande interesse para a indústria papaleira devido à economia que poderia ser obtida na polpa-

ção mecânica e química, usando processos combinados com biopolpação (Eriksson 1985, 1987b; Jurasek e Paice 1986; Young 1987; Durán e col., 1990a e referências ali incluídas).

Na biopolpação de bagaço de cana foi obtida uma economia de energia de 40% num processo bem sucedido desenvolvido pelo "Swedish Forest Products Research Laboratory" e o laboratório cubano ICIDCA (Johnsrud e col., 1987; Eriksson, 1990). Um novo enfoque à biopolpação vem sendo desenvolvido com o uso de catalisadores biomiméticos tais como porfirinas (Eriksson, 1990).

A conversão de materiais lignocelulósicos em proteínas unicelulares (SCP) parece ser um processo economicamente viável e foi revisada por Tanaka e Matsuno (1985).

Biotransformações específicas por enzimas ligninolíticas podem ser uma futura possibilidade. Fungos de decomposição parda poderiam ser mais interessantes que fungos de decomposição branca, por causarem somente modificações parciais na lignina, por exemplo, desmetilações seletivas produziriam um polímero que poderia funcionar bem em adesivos tipo fenol-formaldeído (Kirk e Chang, 1981).

A aeração de efluentes da indústria de polpa de celulose e papel na presença de lacase, remove eficientemente compostos fenólicos solúveis, diminuindo a cor e toxicidade (Fors e col. 1989). Porém persistem cloroligninas de alto peso molecular que podem ser degradadas por ligninases (Eriksson 1990). A biodegradação de poluentes do meio ambiente pelo sistema ligninolítico de P. chrysosporium foi revisado por Bumpus e Aust (1987).

1.7 OBJETIVO.

O objetivo desta tese é estudar o sistema ligninolítico do ascomiceto Chrysonilia sitophila para o qual foram propostas as seguintes metas:

- Avaliar a indução de enzimas (fenol-oxidases) e peróxido de hidrogênio por substratos contendo lignina. Estabelecer o tipo de fenol-oxidase produzida pelo fungo: tirosinase, lacase ou peroxidase.
- Estudar o efeito de algumas condições de cultura (concentração de nitrogênio e oxigenação) nas quais a lignina é biodegradada.
- Estudar as biotransformações que C.sitophila ocasiona na lignina, utilizando um lignossulfonato comercial.
- Normalizar e aumentar a produção de ligninase, usando fungo imobilizado, adição de detergente e cultura em biorreator.
- Purificar e caracterizar as lignina-peroxidases, já detectadas nas culturas, e estudar sua ação sobre álcool veratrílico.

Outros aspectos desta pesquisa surgiram no decorrer da mesma, e ainda que não estavam nos objetivos iniciais, estes foram abordados pelo interesse técnico-científico que apresentaram: um novo método para quantificar a atividade ligninolítica total de uma cultura, comparação da degradação fotoquímica de lignossulfonato com a microbiológica e a combinação destes visando possíveis aplicações no tratamento de efluentes. No possível, serão comparados nossos resultados com os existentes na literatura para Phanerochaete chrysosporium.

2. EXPERIMENTAL

2.1 EQUIPAMENTOS

Autoclave vertical AV 75 Phoenix

Biorreator F-15 Superhom

Contador de Centilação Líquida Beckman LS 7000

Contador de Centilação Líquida LKB 1211 Rackbeta

Espectrofotômetro de Fluorescência Perkin Elmer MPF-44B

Espectrofotômetro de Infravermelho Perkin Elmer mod. 1430

Espectrofotômetro UV/Visível Intralab mod. DMS-100

Espectrofotômetro Micronal mod. B-382.

Estufa de cultivo Fabbe Mod. 116

Fonte de poder para electroforese

Fluxo laminar Veco Mod. VLFS 12

HPLC com detetor UV/Visível Hewlett-Packard série 1050

Incubador rotatório série 25 New Brunswick Scientific

Sistema cromatográfico LKB 2137

2.2 REAGENTES

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico, sendo que alguns deles, considerados mais específicos são listados a seguir.

Acrilamida. Sigma

Albumina bovina. Sigma

Alcool veratrílico. Aldrich

Aldeído veratrílico. Aldrich
 Coomassie Brilliant Blue G-250. Fluka AG
 DEAE Sephadex A-50-120. Pharmacia.
 Flobafeno. Doado pelo Dr. Jaime Baeza, Univ. de Concepción, Chile
 Fluoreto de p-metilsulfonila. Sigma
 Lignossulfonato (VIXIL S PC). Melbar
 Lisozima (de clara de ovo). Aldrich
 Mioglobina (tipo I de músculo de equino). Sigma
 Marcador de pesos moleculares. Sigma
 Peroxidase tipo I. Sigma
 Sephadex G-50. Pharmacia.
 Sephadex LH-20. Pharmacia.
 Tripsina (Tryptic enzyme). EBL
 Nylon. 3M Scotch Brite^{MR}
 Espuma poliuretano 3M
 Triton X-100. Sigma
 Tween 80. Sigma
 Bagaço de cana: Lignina (19,9 %), Celulose (46,0 %), Hemiceluloses (24,5 %) e Cinzas (2,4 %) (Imrie e Tilbury, 1972)
 Casca de arroz: Lignina (29,4 %), Celulose (38,4 %), Hemiceluloses (23,7 %) e Cinzas (8,5 %) (Durán e col., 1988e).
 Madeira de Pinus: Lignina (29,8 %), Celulose (51,3 %) e Hemiceluloses (15,9 %) (Baeza e col., 1990).

2.3 MICROORGANISMO E MEIO DE CULTURA.

Chrysonilia sitophila TFB 27441 foi mantido em placas de agar e repicado a cada duas semanas. O meio utilizado foi o de

Fries modificado: Glicose 1,5 g/l, Agar 1,5 g/l, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2,6 g/l; KH_2PO_4 1,0 g/l; MgSO_4 0,5 g/l; NaCl 0,1 g/l; CaCl_2 0,1 g/l; $\text{CuSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,1 mg/l; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,2 mg/l; ZnCl_2 0,15 mg/l. Biotina 10 ug/l e tiamina 1 mg/l. O pH foi ajustado para 6,0 e mantido a temperatura de 28°C. Para culturas líquidas, a concentração de glicose foi 1,0 g/l e não foi adicionado agar. Quando especificado, foi usado tampão biftalato 0,05 M pH 6,0. Culturas estoque foram mantidas em glicerol a -15 °C.

2.4 ENSAIO EM PLACA PARA FENOL-OXIDASE (Ander e Eriksson 1976).

Nos ensaios em placa de fenol-oxidase, foi utilizado meio Fries tamponado a pH 6,0 contendo 0,2 % de glicose e 1,5 % de um dos seguintes substratos: madeira de *Pinus radiata*, casca de arroz, bagaço de cana e α -celulose, em meio padrão (2.3).

As placas com micélio fungal crescendo ativamente foram adicionados 2 ml de uma solução de o-dianisidina 10^{-3} M em etanol (70 %). O desenvolvimento da cor foi observado após 24 horas.

Ensaio em placa para atividade tirosinase foram realizados segundo Ander e Eriksson (1976). Soluções alcoólicas de D-tirosina e p-cresol 10^{-3} M foram adicionados às placas com micélio.

2.5 MEDIDA DE ATIVIDADE DE FENOL OXIDASE (Peroxidase e Lacase).

Os cultivos em meio líquido tamponado foram realizados em Erlenmeyer de 2 litros contendo 400 ml de meio (1,0 % de glicose e 1,5 % dos substratos já mencionados) (ver 2.4).

A atividade fenol oxidase foi medida pela absorção a 460 nm da o-dianisidina oxidada ($E = 29.400 \text{ l/mol.cm}$) ao pH do meio. Na cela de reação foram adicionados 1,0 ml de o-dianisidina 1,0 mM, 1,0 ml de solução contendo a enzima e 1,0 ml de H_2O_2 2 mM e a absorbância monitorada por 5 minutos. Uma unidade de atividade é definida como a quantidade de enzima que oxida 1 μmol de o-dianisidina por minuto (modificado de Eriksson e col. 1983, e de Ander e Eriksson 1987).

Para medir atividade de lacase, não foi adicionado peróxido de hidrogênio.

2.6 MEDIDA DA ATIVIDADE LIGNINASE.

Determinação da atividade ligninase. Foram adicionados 550 μl de sobrenadante da cultura e 200 μl de peróxido de hidrogênio 2,0 mM a 250 μl de uma solução de álcool veratrílico 8 mM, em tampão tartarato de sódio 0,4 M (pH=3,0). O aparecimento do aldeído veratrílico foi determinado lendo-se a absorbância a 310 nm ($E = 9.300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Uma unidade de ligninase foi definida como a quantidade de enzima que oxida 1,0 μmol de álcool veratrílico por minuto (Tien e Kirk, 1984).

2.7 MÉTODO QUIMILUNINESCENTE PARA MEDIR A ATIVIDADE LIGNINOLÍTICA TOTAL DE UMA CULTURA.

A 5,0 ml de tampão tartarato de sódio (5 mM) pH 2,5 foram adicionados 0,2 ml de caldo de cultivo contendo 45 U/l de

ligninase e H_2O_2 para dar uma concentração final de 0,35 mM e incubado por 2 min. Logo, foi adicionado uma solução de lignina dioxano (3 mg por 15 ml, solução estoque) (ver 2.29) em dioxano: água 1:1 para dar uma concentração final de 18 µg/ml. A emissão de fótons foi contada cada 15 s num centilador líquido. Um branco (tampão, H_2O_2 e lignina) foi descontado do valor total da reação enzimática.

2.8 DETERMINAÇÃO DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO (Tran e Chambers, 1987)

A 10 ml de filtrado foram adicionados 0,5 ml de uma solução aquosa contendo 3,1 µmol de o-dianisidina e 0,3 mg de peroxidase Tipo VI. A mistura foi borbulhada com oxigênio por 5 minutos e logo incubada a 39 °C. Após 3 h de incubação a mistura foi resfriada até 4 °C por 10 minutos e em seguida lida a absorbância a 500 nm contra um branco de água.

2.9 IMOBILIZAÇÃO EM NYLON E EM ESPUMA DE POLIURETANO.

Cubos de nylon (3M Scotch Brite^{HR}) ou espuma de poliuretano (3M) de aproximadamente 0,5 cm³ foram colocados em Erlenmeyer de 250 ml (1,2 e 2,5 g respectivamente) inoculados com 2,0 ml de uma suspensão de micelio em 75 ml de meio Fries tamponado pH 6,0 e agitados a 150 rpm à 27 °C (Linko e Zhong, 1987). Foram usadas como controle, culturas não imobilizadas.

2.10 ADIÇÃO DE DETERGENTES NO MEIO DE CULTIVO.

Os detergentes Tween 80 e Triton X-100 foram adicionados no meio de cultivo tamponado para dar uma concentração final de 0,5 mg/ml em Erlenmeyer de 125 ml (contendo 10 ml de meio de meio Fries tamponado). Periodicamente o conteúdo dos Erlenmeyers foi filtrado em papel Whatman nº 1, medido o peso seco (uma noite a 80°C) e a quantidade ligninase.

2.11 CULTURAS EM BIORREATOR.

Foi usado um biorreator de 15 l Superhom modelo F-15 equipado com eletrodo de pH e oxigênio. Um pré-cultivo de 24 horas, realizado em Erlenmeyer de 1 litro a 150 rpm (uma placa de petri de 48 horas de crescimento para 200 ml de meio) foi usado como inóculo (200 ml para 5 litros). Este foi adicionado através de uma das bombas originalmente desenhadas para aditivos. A temperatura foi mantida a 28 °C e a fonte de nitrogênio usada foi 5,0 g/l de NH_4NO_3 . Outras condições foram variadas como especificadas em 3.5.

2.12 DETERMINAÇÃO DE AÇÚCARES.

2.12.1 Método do DNS para açúcares redutores (Miller, 1959).

O reagente DNS foi preparado dissolvendo-se 10,6 g de ácido 3,5-dinitrossalicílico (DNS) e 19,8 g de hidróxido de sódio em 1,4 l de água destilada. A esta solução foram adicionados 306 g

de tartarato de sódio e potássio, 7,6 ml de fenol (p.f. 50 °C) e 8,3 g de bissulfito de sódio. Adicionou-se 3,0 ml de reagente DNS a 1,5 ml de amostra e esta foi submersa num banho de água à 100 °C por 5 minutos e resfriada até temperatura ambiente. A absorbância foi lida a 550 nm e comparada com uma curva padrão de glicose.

2.12.2 Método do fenol-ácido sulfúrico para açúcares totais.

(Dubois e col., 1956).

Este método foi empregado para medir o conteúdo de carboidrato das ligninases. A 2,0 ml de uma solução aquosa de amostra de proteína contendo 100-200 µg foram adicionados 0,05 ml de fenol destilado 80 % e 5,0 ml de H₂SO₄ concentrado. Após 10 min estes foram agitados e deixados por 15 min em banho a 27 °C. A absorbância foi medida a 490 nm e comparada com uma curva padrão de glicose.

2.13 DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS.

A determinação de proteínas foi realizada pelo método de Bradford (1976). O reagente Coomassie Brilliant Blue G-250 (CBB) foi preparado dissolvendo 100 mg de CBB em 50 ml de etanol 95 %. A esta solução foram adicionados 100 ml de ácido fosfórico 85 % peso/volume. A solução resultante foi diluída para um volume final de 1 litro. Adicionou-se 5 ml de reagente CBB a 0,1 ml de amostra e a absorbância foi lida a 595 nm após 2 minutos. Uma curva de calibração com albumina bovina foi utilizada para o cál-

culo do teor de proteínas.

2.14. PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS.

Esta parte do trabalho, como outras envolvendo enzimas purificadas foi realizada em co-autoria com a Dra. Irene Ferrer da Pontifícia Universidade Católica do Chile.

As culturas foram filtradas através de um funil com vidro sinterizado. Flureto de p-metilfenilsulfonila foi adicionado para evitar a proteólise e logo filtrado através de membrana millipore GSWP 047 00. O filtrado foi concentrado a vácuo até 80 % do volume original. Após diálise por 12 horas contra tampão tartarato de sódio 5 mM pH 4,5, a amostra foi aplicada numa coluna de DEAE Sephadex A-50-120 (2x12 cm). A coluna foi lavada com 100 ml de tampão tartarato de sódio pH 4,5 e um gradiente salino foi aplicado (0-0,1 M NaCl) em 5 mM do mesmo tampão. Após eluição, as frações contendo hemoproteínas foram dialisadas separadamente contra água deionizada e estocada a -20 °C.

2.15 DETERMINAÇÃO DE GRUPOS HEME. (MILLER E GENNIS, 1983)

Um volume de 0,5 ml de uma solução 1 mg/ml de enzima, foi extraído três vezes com 5 ml de uma solução de acetona 3% v/v HCl 12 N. Os extratos foram combinados e neutralizados com 2 ml de acetato de sódio 3 M e extraídos com éter (O éter foi previamente extraído com uma solução aquosa de sulfato de ferro e amônia para remover peróxidos). Os extratos etéreos foram concentrados num evaporador rotatório e logo dissolvidos em 1 ml de piridina e 1

ml de NaOH 0,2 N. Esta solução foi colocada numa cela UV e uma pequena quantidade de ditionito foi adicionada. O espectro foi registrado imediatamente.

A quantidade de grupo heme foi determinada pela absorção em 557 nm considerando um coeficiente de absorção de $32.500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Tien e Kirk, 1984). O ferro foi determinado por absorção atômica.

2.16 ELETROFORESE DAS LIGNINASES. (Weber e Osborn, 1969).

Solução tampão / Gel:

$\text{Na}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	7,80 g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	25,64 g
SDS	2,00 g
Água destilada	1.00 l
pH 7,0	

Solução de acrilamida 10%:

Acrilamida	22,2 g
N,N'-metilenbisacrilamida	0,6 g
Água destilada	100 ml

Solução catalisadora:

Persulfato de amônio	15 mg
Água destilada	1 ml

Solução de tingimento:

Coomassie Brilliant Blue R-250 para eletroforese	1,25 g
Metanol 50 %	454 ml
Ácido acético glacial	46 ml

Solução de destingimento:

Ácido acético glacial	75 ml
Metanol 50 %	50 ml
Água destilada	875 ml

Solução Tampão para diálise:

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (0,01M)	61 ml
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (0,01M)	39 ml
SDS	1 g
β -mercaptoetanol	1 ml
Água destilada	100 ml
pH 7	

Solução Tampão catódico: solução tampão gel:água 1:1

Preparação da amostra: 0,4-0,6 mg de proteína foram dissolvidos em 1,0 ml de tampão fosfato de sódio 0,001 M pH 7,0 (SDS 1%, β -mercaptoetanol 1% e uréia 8 %).

Uma mistura da solução tampão gel (10 ml), solução de acrilamida (9 ml), solução catalisador (1 ml) e TEMED 30 μ l foi adicionada aos tubos de vidro (6 tubos), previamente selados com "parafilm" no extremo inferior. A cada tubo foram adicionadas algumas gotas de água para eliminar o menisco do gel. Após o endurecimento do gel, o "parafilm" foi retirado.

A amostra (30 μ l) foram adicionados 3 μ l de azul de bromofenol 0,05 %, 1 gota de glicerol, 5 μ l tampão diálise. O mesmo foi feito com a solução padrão de proteínas com pesos moleculares conhecidos. A eletroforese foi realizada a 8 mA por tubo com corrente contínua, por um tempo de 4-5 horas. O tingimento foi por 2 horas e o excesso de corante foi eliminado por sucessivas lava-

gens com a solução de destingimento.

2.17 ELETROFOCALIZAÇÃO DAS LIGNINASES (Guengerich, 1977)

Solução de acrilamida:

acrilamida	30 g
N,N'-metilenbisacrilamida	1 g
Água destilada	50 ml

Solução TEMED:

TEMED	0,1 ml
Água destilada	10,0 ml

Solução catalisadora 0,15 % :

Persulfato de amônia	7,5 g
Água destilada	5,0 ml

Solução fixadora:

Metanol 99,8 %	30 ml
Ácido tricloroacético	10 g
Água destilada	70 ml

Solução de tingimento:

Solução fixadora	50 ml
Azul de comassie B.B.	0,05 g

Solução de destingimento:

Etanol	250 ml
Ácido acético	100 ml
Água destilada	650 ml

Foram preparados géis para realizar duas eletrofocalizações de cada proteína (6 géis). Para a preparação do gel foram mistu-

rados 1,2 ml da solução de acrilamida, 0,6 ml de anfolito 40 %, 5,3 ml de água destilada, 3,2 ml da solução de catalisador e 3,1 ml da solução TEMED.

Aos tubos de vidro (6 tubos), previamente selados com "parafilm" no extremo inferior, foram adicionados 2 ml de solução de gel mais 40 µl de solução de Proteína (0,4-0,6 mg de proteína dissolvidos em 1 ml de água deionizada). O menisco foi eliminado com solução de anfolito diluído. Uma vez produzida a gelificação, o "parafilm" foi retirado.

Na parte superior do aparelho para eletrofocalização foi colocado NaOH 0,2 % P/V (1,0 l) e na parte inferior H_3PO_4 0,2 % V/V (1,0 l). Foi aplicada uma intensidade de 5 mA por tubo (30 mA) e 115 V (6 géis). Após 3,5 horas foram retirados os géis e 3 deles revelados em solução fixadora por 30 min, em solução de tingimento por 1 hora e finalmente em solução de destingimento por uma noite.

Os géis não revelados foram cortados em pedaços de 0,6 cm e colocados por separado em tubos com 1,0 ml de água deionizada por uma noite após a qual o pH foi medido.

2.18 DETERMINAÇÃO DE PARÂMETROS CINÉTICOS DAS LIGNINASES.

Os parâmetros cinéticos foram determinados variando a concentração de álcool veratrílico entre 0,2 e 2,0 mM e a de H_2O_2 entre 0,2 e 0,4 mM. Uma solução de 5 µg/ml das ligninases foi usada. As outras condições foram as mesmas que para atividade ligninase.

2.19 DEGRADAÇÃO DE ÁLCOOL VERATRÍLICO

Um volume de 7,5 ml de uma solução de álcool veratrílico (2,24 mg/ml) em tampão tartarato 0,2 M pH 3,0 foi incubado com 16,5 ml de caldo de C. sitophila obtido em biorreator, contendo 250 U/l de ligninase. Durante um período de 5 horas foram adicionados um volume total de 2,5 ml de H₂O₂ 0,5 M. Dois brancos foram realizados paralelamente: a) 7,5 ml de tampão, 16,5 ml de caldo e 2,5 ml de H₂O₂. b) 7,5 ml de tampão, 16,5 ml de meio não inoculado e 2,5 ml de H₂O₂.

Após 17 horas o pH da reação foi ajustado em 2,0 e os caldos foram extraídos com diclorometano. Os extratos foram analisados por HPLC usando uma coluna C-18 fase reversa e acetonitrila:água 1:4 (1 ml/min) ou metanol:água 1:1 (1 ml/min) como fase móvel conforme especificado. O branco contendo caldo foi utilizado para análise de álcool veratrílico produzido de novo.

2.20 ISOLAMENTO DE COMPOSTOS DO MEIO DE CULTURA

O caldo de cultivo obtido em biorreator (450 ml) foi passado por uma coluna (3 x 60 cm) de silicagel seca e posteriormente lavada com acetona:água 1:1. A solução obtida foi seca num evaporador rotatório. Esta foi dissolvida em metanol. Posteriormente esta solução foi passada por uma coluna 3 x 60 cm recheada com Sephadex LH-20. O eluente foi monitorado em um detector em 275 nm. As frações correspondentes a um mesmo pico foram coletadas e analisadas por espectroscopia UV.

2.21 BIODERADACÃO DE LIGNOSSULFONATO

Para os ensaios de biodegradação de lignossulfonatos, foi usado meio de Fries modificado (20 ml, ver 2.3) contendo 0,1 % de lignossulfonato e 1,0 % de glicose em Erlenmeyer de 125 ml. As culturas agitadas foram realizadas a 150 rpm.

Nos estudos para medir a influência do nitrogênio e da oxigenação, as culturas foram realizadas em Erlenmeyer de 250 ml contendo 100 ml de meio cada um (0,1 % de LS, 1,0 % de glicose em meio Fries). O nitrogênio foi adicionado em quantidades variáveis: 0,8 , 2,5 e 7,0 g/l de tartarato de amônia correspondendo a 9, 27 e 76 mMol de nitrogênio por litro. Nas culturas oxigenadas foi borbulhado oxigênio a cada dois dias durante 10 min. Amostras foram retiradas a cada três dias (10 ml).

Os LS para análises químicas foram obtidos após biodegradação por 12 dias. As proteínas presentes no caldo de cultura foram precipitadas com CHCl_3 a frio e a solução de LS resultante seca a vácuo.

2.22 PERNEAÇÃO EM GEL DO LIGNOSSULFONATO.

A uma coluna de Sephadex G-50 (53 x 1,5 cm) adicionou-se 0,5 ml de meio de cultivo. O eluente utilizado foi uma solução aquosa de NaCl (0,03 N) a pH 11 a um fluxo de 0,26 ml/min (Eldridge 1972).

Para a curva de calibração foram utilizados os padrões Tripsina (Tryptic enzymes EBL) PM: 23.000. Myoglobina (Type I de músculo de equino, Sigma) PM: 17.000. Lisozima (de clara de ovo, Al-

drich) PM 13.900 e Flobafeno PM:6.500 (fornecido pelo Prof. Dr. Jaime Baeza, U. Concepción, Chile).

2.23 MÉTODO DA NITROSOLIGNINA (Goldschmid e Maranville, 1959)

A 5,0 ml de amostra contendo LS, foi adicionado 0,1 ml de uma solução fresca de nitrito de sódio 10 % (preparado em água bidestilada) e 0,1 ml de ácido acético 10 %. Após agitação por 15 min, foi adicionado 0,2 ml de hidróxido de amônio 2 N e a absorbância foi lida a 440 nm. Como branco foram usadas todas as soluções acima mencionadas com exceção da solução de nitrito que foi substituída por água. A absorvidade obtida foi de 0,49 l g⁻¹ cm⁻¹ e foi linear até 1,0 g/l de LS.

2.24 IRRADIAÇÃO DO LIGNOSSULFONATO.

O lignossulfonato (VIXIL S PC) foi irradiado com uma lâmpada de vapor de mercúrio HQL-Osram (sem a cuberta de vidro). A velocidade de fluência, determinada com um radiômetro YSI-Kettering (modelo 65 A), foi de 108 W/m para $\lambda > 254$ nm. Uma solução aquosa contendo 0,1 % de lignossulfonato (400 ml) foi irradiada num becker de 2 litros sob agitação magnética constante e mantida a 13 ± 1 °C em um banho termostatizado. A distância da lâmpada ao centro da solução foi de 17 cm. Amostras foram tomadas a diversos intervalos de tempo e seus espectros de fluorescência (Perkin Elmer MPF-44 B), absorbância (Intralab DMS 100) e quimiluminescência em meio básico foram registrados.

2.25 QUIMIOLUMINESCÊNCIA DO LIGNOSSULFONATO EM MEIO BÁSICO.

(Kansilla, 1986).

A 3 ml de solução de lignossulfonato 0,1 % , adicionou-se 40 μ l de NaOH 5 N e mediu-se a emissão da solução a cada 0,3 minutos num contador de centilação líquida.

2.26 ANALISE DE GRUPOS METOXILA DO LIGNOSSULFONATO (Browing, 1967).

Foi usado o kit para análise de metoxila (figura 7) descrito por Browing (1967). Cerca de 50 mg de lignossulfonato previamente seco, foram pesados diretamente no balão de reação ao qual foram adicionados 2,0 ml de anidrido propriônico, 6,0 ml de HI e pérolas de ebulição. O balão de reação foi conectado no sistema (figura 7) onde o frasco lavador (trap) contém uma suspensão de fósforo vermelho em água (60 mg/100 ml) e a bureta receptora contém solução de bromo (0,7ml Br₂ e 20 ml de solução de acetato de sódio 10% em ácido acético-anidrido acético 9:1).

O sistema foi fluxado com nitrogênio (1-2 bolhas/seg) continuamente e o balão de reação foi imerso num banho de silicone a 150 °C durante 40 minutos. O conteúdo da bureta receptora foi coletado em 10 ml de solução de acetato de sódio 22% em água. Diluiu-se esta solução a 125 ml (lavando a bureta receptora) com água e adicionou-se a esta uma solução de ácido fórmico 90% gota a gota até desaparecimento da coloração marrom (um excesso posterior de 6 gotas foi adicionado). A esta solução final foram adicionados 3,0 g de KI e 15 ml de ácido sulfúrico (1:10).

A solução anterior foi titulada com tiosulfato de sódio 0,1N previamente padronizado, utilizando amido como indicador.

Exemplo de Cálculo:

$$\% \text{ MeO} = \frac{\text{Vol. (Tiosulfato) (ml)} \times N (\text{tiosulfato}) \times 0,00517 \times 100}{\text{Massa de lignossulfonato (g)}}$$

O valor 0,00517 = (PM MeO x 100)/(1000 x Nº átomos de iodo formados nas reações) = (31 x 100)/(1000 x 6).

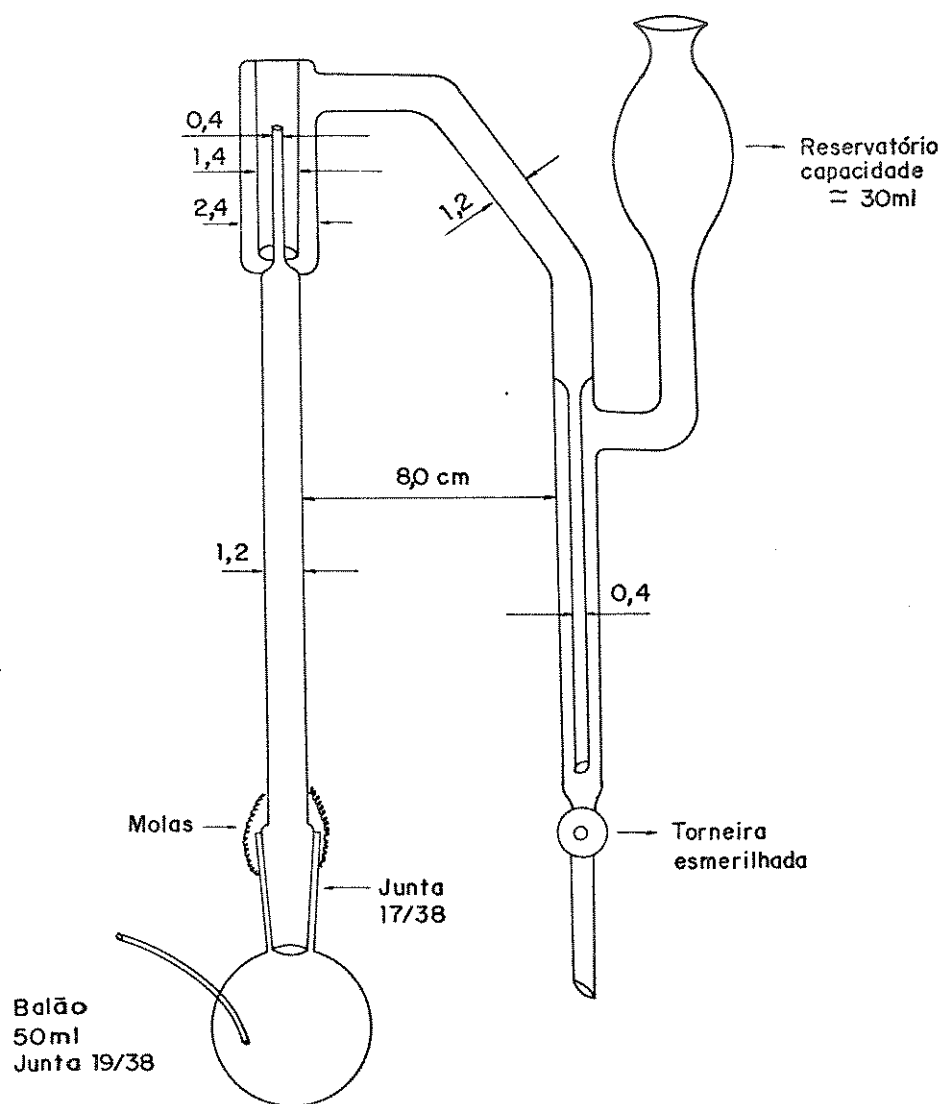
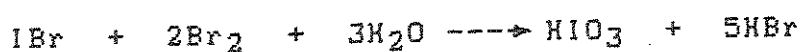
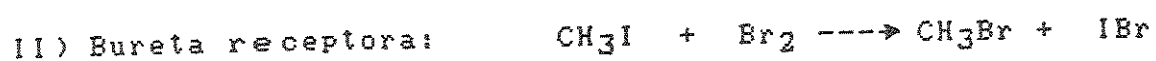
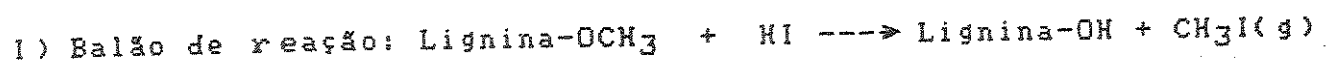


FIGURA 7. Sistema para determinação de metoxilas.

As reações químicas envolvidas na determinação de metoxila são mostradas abaixo:



IV) Finalmente o I_2 é titulado com tiosulfato de sódio. Através das reações I, II e III, nota-se que para cada grupo OCH_3 da lignina são formados 3 moléculas de iodo.

2.27 ANALISE DE GRUPOS FENÓLICOS DO LIGNOSSULFONATO.

Foram determinados segundo o método de Wexler (1964). O método consiste na obtenção do espectro U.V. diferencial do lignossulfonato em meio básico, usando-se como branco a mesma amostra, porém em meio acidificado (fenolato contra fenol protonado), e finalmente obtendo-se a altura do pico em 300 nm pelo método da linha de base.

Uma solução estoque foi preparada (esta solução também foi utilizada na determinação de carbonilas e absortividade) dissolvendo 6 mg de lignossulfonato em 25 ml (balão volumétrico) de água destilada.

A 3,4 ml de solução estoque de lignossulfonato, foi adicionado 1,1 ml de água destilada e 0,5 ml de HCl 1 N (branco). Outra solução, foi preparada da mesma forma porém adicionando 0,5 ml de NaOH 1,0 N em substituição ao HCl 1,0 N (amostra).

Registrrou-se um espectro de U.V. na região 230 - 330 nm da amostra versus branco.

$$\% \text{ OH Fenólico} = A_i \times 0,414 / c$$

Onde 0,414 é o fator de correção pelo método de linha de base (fator médio para 14 modelos usados, que corresponde à absortividade média dos modelos), e A_i é a leitura diferencial de absorbância em 300 nm e o valor c é a concentração da lignossulfonato em g/l.

2.28 ANALISE DE GRUPOS CARBONILA DO LIGNOSSULFONATO. (Adler e Marton, 1959).

Foi obtido um espectro U.V. diferencial do lignossulfonato versus um branco de mesma procedência, porém reduzido com NaBH_4 .

Cerca de 30 mg de NaBH_4 foram pesados em um kitassato de 25 ml. A este material foi adicionado 5,0 ml de solução estoque (ver 2.24) e borbulhado com nitrogênio durante 15 minutos. Manteve-se esta mistura na ausência de luz durante 15 horas.

Após 15 horas a mistura foi acidificada com HCl 1,0 M até pH 2,0 e diluída até 25,0 ml com água.

Foi preparada uma solução idêntica de lignossulfonato não reduzido.

Um espectro U.V. foi registrado na região 280-380 nm, utilizando a solução não reduzida como amostra e a solução de lignina reduzida como branco.

O teor de carbonilas pode ser obtido a partir das absorbâncias lidas em 310 nm e 342 nm, como descrito abaixo:

$$(\Delta Er)_{310 \text{ nm}} = (\Delta A_{310} \times 175) / C$$

$$(\Delta Er)_{342 \text{ nm}} = (\Delta A_{342} \times 175) / C$$

onde C é a concentração da lignina em g/l, A_{310} e A_{342} , as absorbâncias em 310 e 342 nm, respectivamente. O valor 175 corresponde ao peso do coniferil aldeído.

Com os valores de ΔEr , podemos calcular:

$$10.500 X + 9.400 Y = (\Delta Er)_{310}$$

$$19.800 X + 2.020 Y = (\Delta Er)_{342}$$

Nestas equações:

X representa o número de unidades α -carbonila/ OCH_3

Y representa o número de unidades γ -carbonila/ OCH_3

2.29 OBTENÇÃO DE LIGNINA DIOXANO DE MADEIRA DE PINUS.

(Pepper e col., 1959)

A madeira previamente moída e peneirada (tamiz 0,3 mm), foi extraída de forma contínua num aparelho de vidro Soxhlet com 2,5 l de solução de etanol:benzeno (1:1) durante 53 horas. Este material foi filtrado, secado ao ar e, finalmente secado até peso constante num dessecador sob vácuo e pentóxido de fósforo. Uma amostra de 25 g do material pré extraído foi colocada num balão de vidro de 3 saídas, previamente evacuado durante 15 minutos. As

saídas foram conectadas a um condensador de refluxo, borbulhador de nitrogênio e funil de adição com corretor de pressão.

O sistema de solventes, 500 ml de dioxano:água (9:1) contendo ácido clorídrico 0,2 N, foi adicionado lentamente com funil de adição. A mistura de reação foi aquecida com auxílio de manta elétrica e refluxada por 30 minutos, sob agitação e atmosfera de nitrogênio.

A mistura resultante foi esfriada até temperatura ambiente e filtrada. O resíduo sólido foi lavado imediatamente com 50 ml de solvente. O filtrado foi neutralizado com bicarbonato de sódio e deixado em repouso durante 24 horas. Essa solução foi concentrada até 30 ml num evaporador rotatório e adicionada sobre 1 l de água destilada contendo 1 % de sulfato de sódio.

A lignina precipitada neste último processo foi separada por centrifugação e lavada com água. Esta operação foi repetida 3 vezes. A seguir, a lignina foi secada até peso constante num dessecador sob vácuo e pentóxido de fósforo.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.

3.1. PRODUÇÃO DE FENOL-OXIDASES E PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO.

Com o objetivo de determinar a existência de algum efeito indutivo na produção de fenol oxidases por C. sitophila esta foi observada qualitativamente em placas de Petri contendo meio com agar e diferentes substratos. Na figura 8 podemos ver que estas enzimas foram produzidas em grandes quantidades quando o substrato foi 1,5 % de glicose. Isto é observado em placa de petri pela coloração vermelha da o-dianisidina oxidada. Na presença de madeira de pinus, casca de arroz e bagaço de cana (1,5 % de material mais 0,2 % de glicose) as fenol-oxidases foram produzidas com maior intensidade que em celulose (1,5 % de celulose mais 0,2 % de glicose) ou glicose (0,2 %) na qual foi observada pouca coloração (figura 8).

Este tipo de ensaio em placa, é bastante utilizado como uma primeira indicação da capacidade ligninolítica de um microorganismo e em geral, a ausência de atividade fenoloxidase exclui os microrganismos não ligninolíticos.

Uma determinação quantitativa da produção de fenol oxidase foi realizada em culturas líquidas de C. sitophila, cujos valores obtidos são apresentados na tabela 2.

Fica evidente a partir do ensaio qualitativo e quantitativo que a produção de fenol-oxidase foi induzida por materiais contendo lignina, mas estas enzimas também são produzidas constitutivamente (na ausência do substrato para enzima no meio de crescimento), o que é observado nas placas contendo 1,5 % de glicose (figura 8).

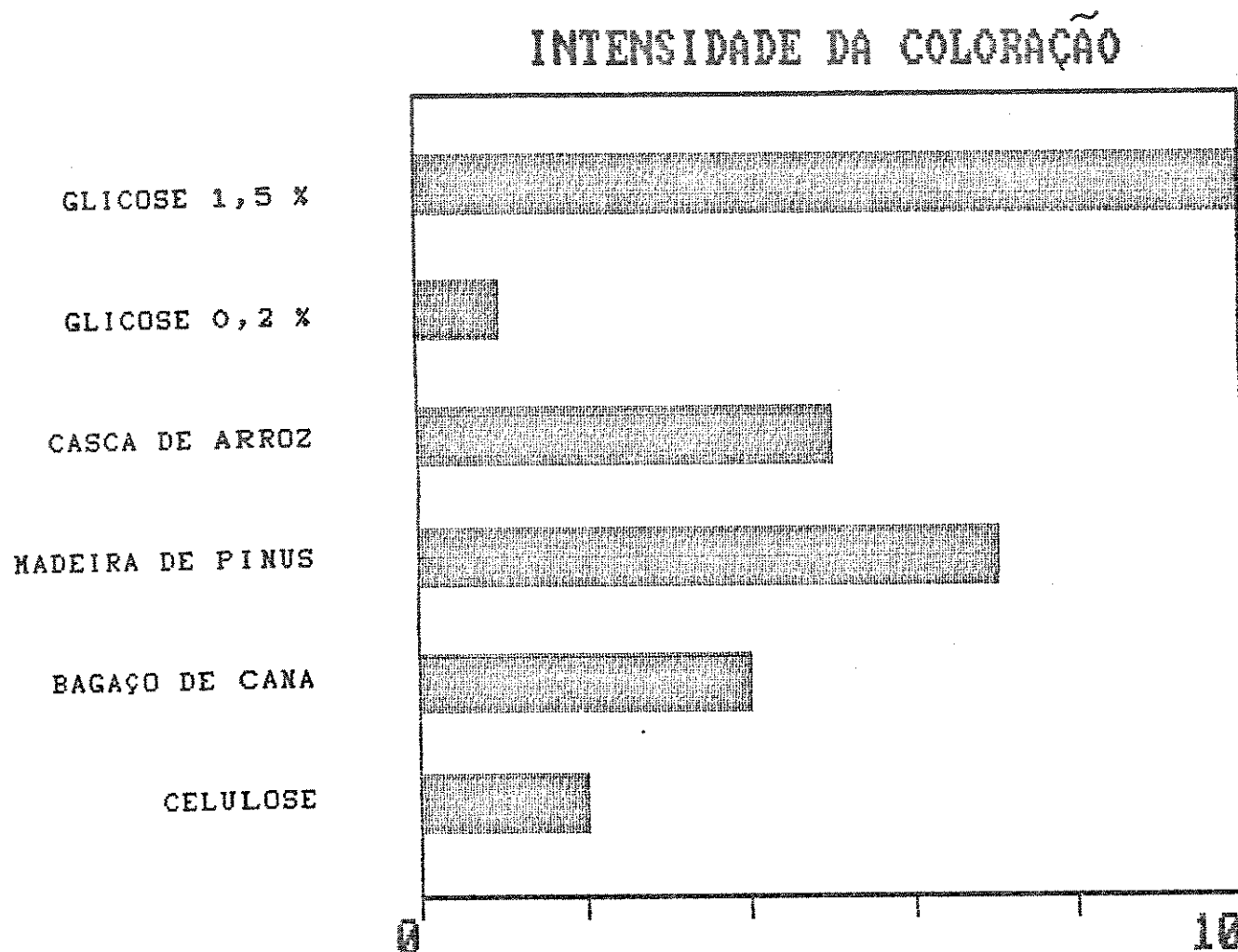


FIGURA 8. Produção de fenol-oxidases por C. sitophila. Quando não especificado, 0,2 % de glicose + 1,5 % de substrato.

TABELA 2. Produção de fenol oxidases por C. sitophila, em cultura líquida. Os valores são expressos como μ moles de o-dianisidina oxidados por minuto por litro de meio contendo a enzima.

SUBSTRATO	DIAS DE CULTIVO			
	2	4	7	10
GLICOSE	0,18	0,36	0,50	0,21
CELULOSE	0,00	0,72	0,53	0,21
MADEIRA	0,09	0,45	0,41	0,19
CASCA DE ARROZ	0,09	0,18	0,68	0,43
BAGAÇO DE CANA	0,18	0,18	0,63	0,54
LIGNOSSULFONATO	0,20	0,70	1,50	0,50

Não foi detectada atividade tirosinase, usando os reagentes específicos tirosina e p-cresol, nem em placa nem em meio líquido.

Discordando dos valores obtidos em cultura líquida (máximo no quarto dia com celulose), as observações em placa indicaram que a maior indução destas enzimas foi usando madeira moída de pinus como substrato. Isto pode estar indicando que a celulose é, em meio líquido, um melhor substrato que os outros (maior crescimento), o que proporcionou uma maior produção da enzima constitutiva, o que não aconteceu em placas.

É sabido que a produção destas enzimas está intimamente relacionada com as condições de cultivo, ex. Sporotrichum pulvurulentum (= P. chrysosporium) tem uma baixa atividade fenol oxidase em madeira moída, porém usando cavacos de madeira, a produção desta enzima é detectada em quantidades mais altas (Ander e Eriksson, 1976).

A produção de H_2O_2 por C. sitophila é mostrada na tabela 3. Podemos observar que os valores mais altos são alcançados quando os substratos contêm lignina (madeira de pinus, casca de arroz e bagaço de cana), apresentando um máximo entre os dias 2 e 4 com casca de arroz como substrato. É presumível que a lignina também atue como indutor da produção de H_2O_2 (ver 3.2.2, produção de peróxido em cultura contendo lignossulfonato).

Na ausência de lacase e tirosinase, a atividade fenol-oxidase obtida corresponde a peroxidases o qual é concordante com a concentração de H_2O_2 encontrado. Esta atividade peroxidase detetada, pode ser devida à própria ligninase.

TABELA 3. Produção de peróxido de hidrogênio (oxidação de o-dianisidina, $\text{nmoles} \times \text{min}^{-1} \times 10 \text{ ml}^{-1}$) em culturas de C. sitophila. Foi borbulhado oxigênio durante 15 min após inoculação e a cada dois dias.

SUBSTRATO	DIAS DE CULTIVO			
	2	4	7	10
GLICOSE	0,008*	0,038	0,064	0,040
CELULOSE	0,019	0,057	0,077	0,038
CASCA ARROZ	0,100	0,100	0,085	0,064
MADEIRA	0,075	0,086	0,089	0,060
BAGAÇO CANA	0,057	0,066	0,086	0,060
LS	0,020	0,040	0,050	0,050

* nmoles de o-dianisidina oxidados $\text{min}^{-1} \text{ ml}^{-1}$

3.2 INFLUÊNCIA DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO NA BIODGRADAÇÃO DE LIGNOSSULFONATO.

Para otimizar a biodegradação de lignina por C. sitophila foi usado como substrato um lignossulfonato comercial VIXIL-SPC. Esta escolha esteve baseada no fato de que lignossulfonatos (LS) são ligninas solúveis em água, devido à introdução de grupos sulfonatos (Eldridge, 1972). Isto apresenta algumas vantagens experimentais em relação às ligninas insolúveis. Com LS é possível obter medidas diretas da absorbância, fluorescência, amostra para permeação em gel, etc., diretamente do meio de cultivo, sem precisar dissolver a lignina em outro solvente.

Em geral, na biodegradação de LS várias reações simultâneas acontecem: oxidação, despolimerização, desaromatização e ainda a completa degradação até CO_2 e H_2O . Portanto, medidas da biodegradação de LS são dificultadas principalmente porque o LS está sendo alterado. Desta forma, vários parâmetros foram estudados para mostrar a influência das diferentes condições de cultivo na biodegradação de LS: fluorescência, absorbância, distribuição de peso molecular, produção de fenol-oxidases, método da nitrosolignina e percentagem de OH fenólicos.

O lignossulfonato utilizado (VIXIL S PC) contém 17,1 % de açúcares redutores e 20-23 % de cinzas que são eliminados por diálise contra água bidestilada por 12 horas. A absorvidade em 280 nm do LS dialisado foi determinada a partir da reta mostrada na figura 9, na qual também é mostrado o espectro UV do LS. O valor obtido foi $11,91 \text{ l g}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. O espectro de fluorescência do LS e a linearidade da emissão em 400 nm (excitação em 335 nm), é mostrado na figura 10.

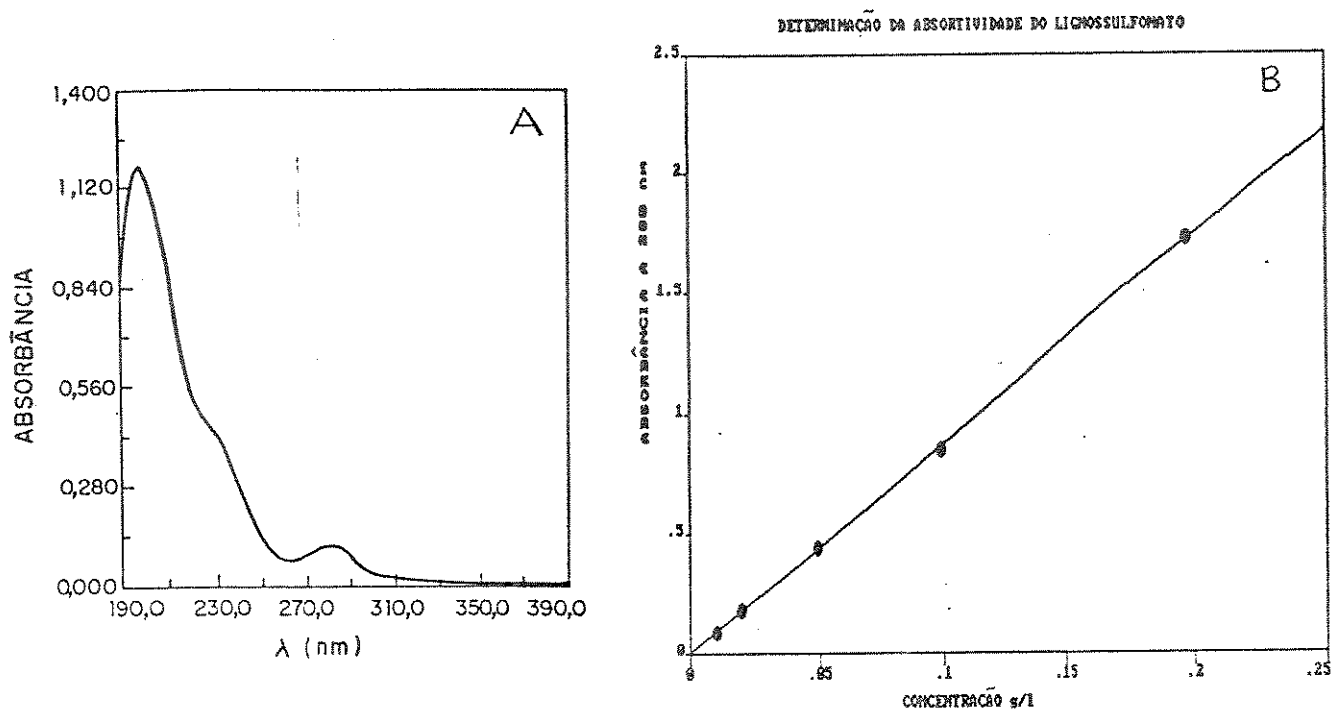


FIGURA 9. A- Espectro de absorção UV do lignossulfonato (0,01 g/l em água). B- Linearidade da absorbância a 280 nm do lignossulfonato em água.

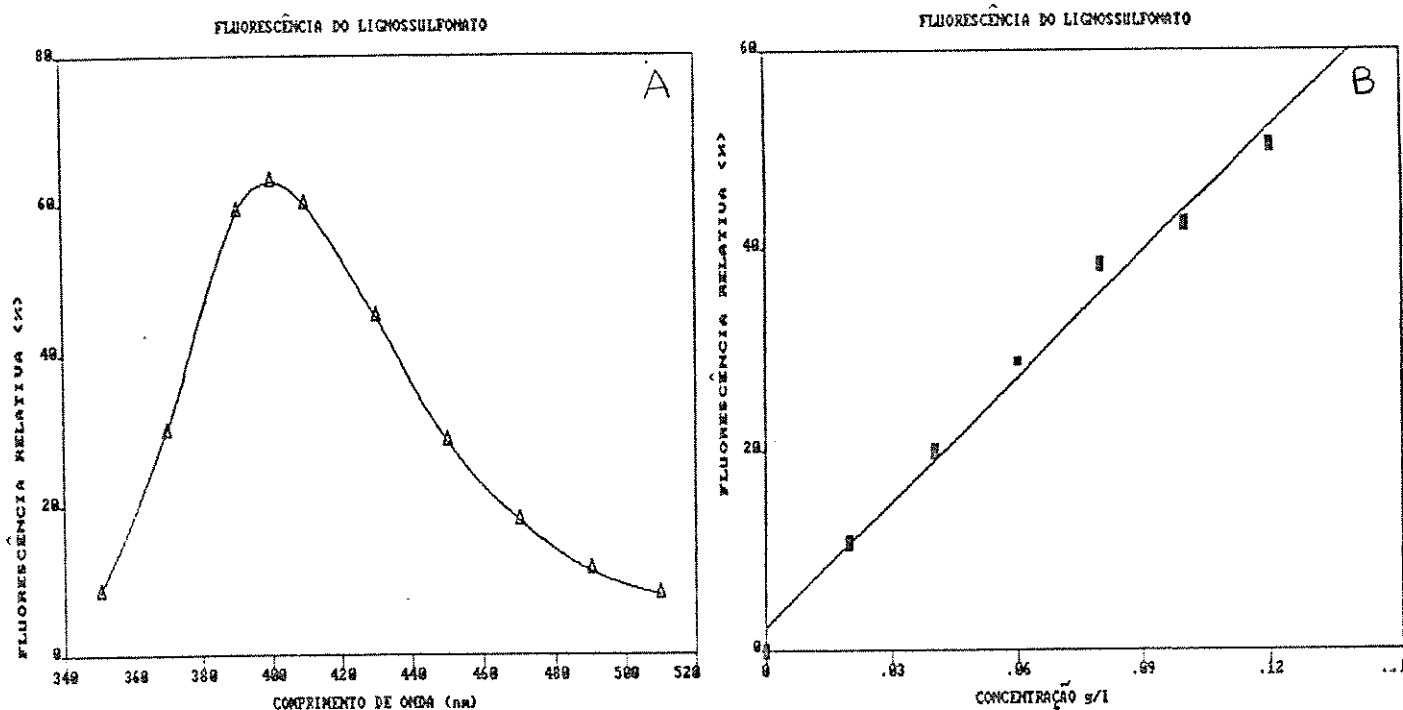


FIGURA 10. A-Espectro de fluorescência do lignossulfonato ($\lambda_{exc}=335nm$) 0,01 g/l em água. B-Linearidade da fluorescência a 400 nm ($\lambda_{exc}=335nm$).

3.2.1 Cultura estacionária Vs. cultura agitada.

Numa primeira etapa, as culturas agitadas e estacionárias de C. sitophila incubadas com LS foram comparadas utilizando-se medidas da absorbância na região UV e de fluorescência.

A absorbância a 280 nm aumenta até o 6º dia de cultivo com posterior decréscimo (figura 11), em forma similar ao observado por Ulmer e col. (1983), usando P. chrysosporium e um LS comercial. Este aumento é atribuído à formação de novos cromóforos no início da biodegradação. O posterior decréscimo da absorbância no fim do processo é resultado da degradação até CO_2 e H_2O , reações de desaromatização ou absorção pelo microorganismo dos fragmentos de LS. Não foram observadas diferenças das absorbâncias a 280 nm entre as culturas agitadas e estacionárias.

A fluorescência das culturas contendo LS (figura 12), diminui de forma constante através dos dias de cultivo. Também não foram observadas diferenças na fluorescência entre as culturas agitadas e estacionárias. É possível que a despolimerização e posterior degradação dos LS para CO_2 e H_2O , possa ser quantificada pela intensidade da fluorescência.

Como não foram encontradas diferenças entre as culturas agitadas e estacionárias, as experiências posteriores foram realizadas em cultura estacionária.

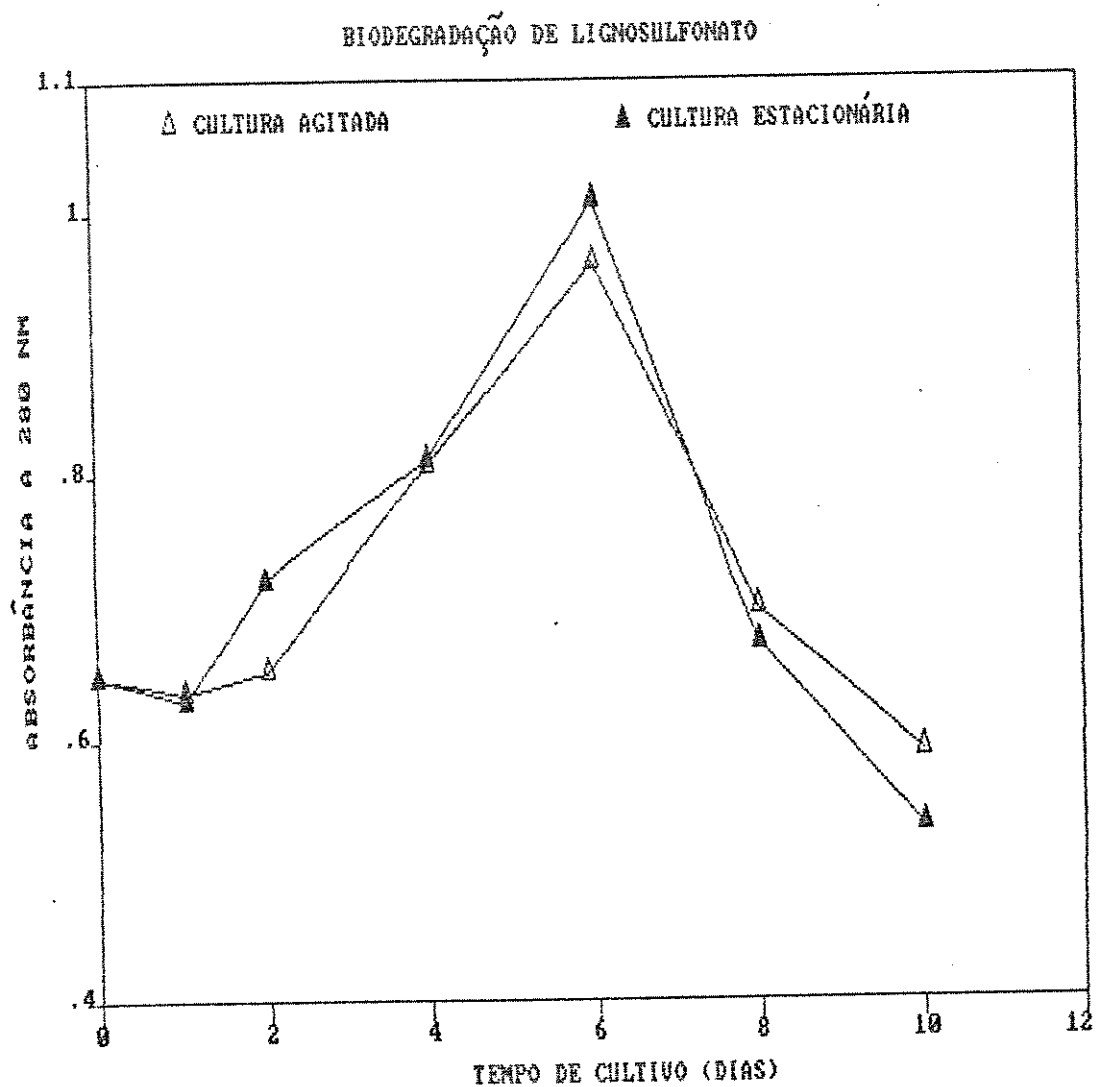


FIGURA 11. Absorbância a 280 nm de meio de cultivo contendo LS (0,1 %, os espectros foram realizados diluindo os caldos 10 vezes). --▲-- : cultura estacionária, --△-- : cultura agitada.

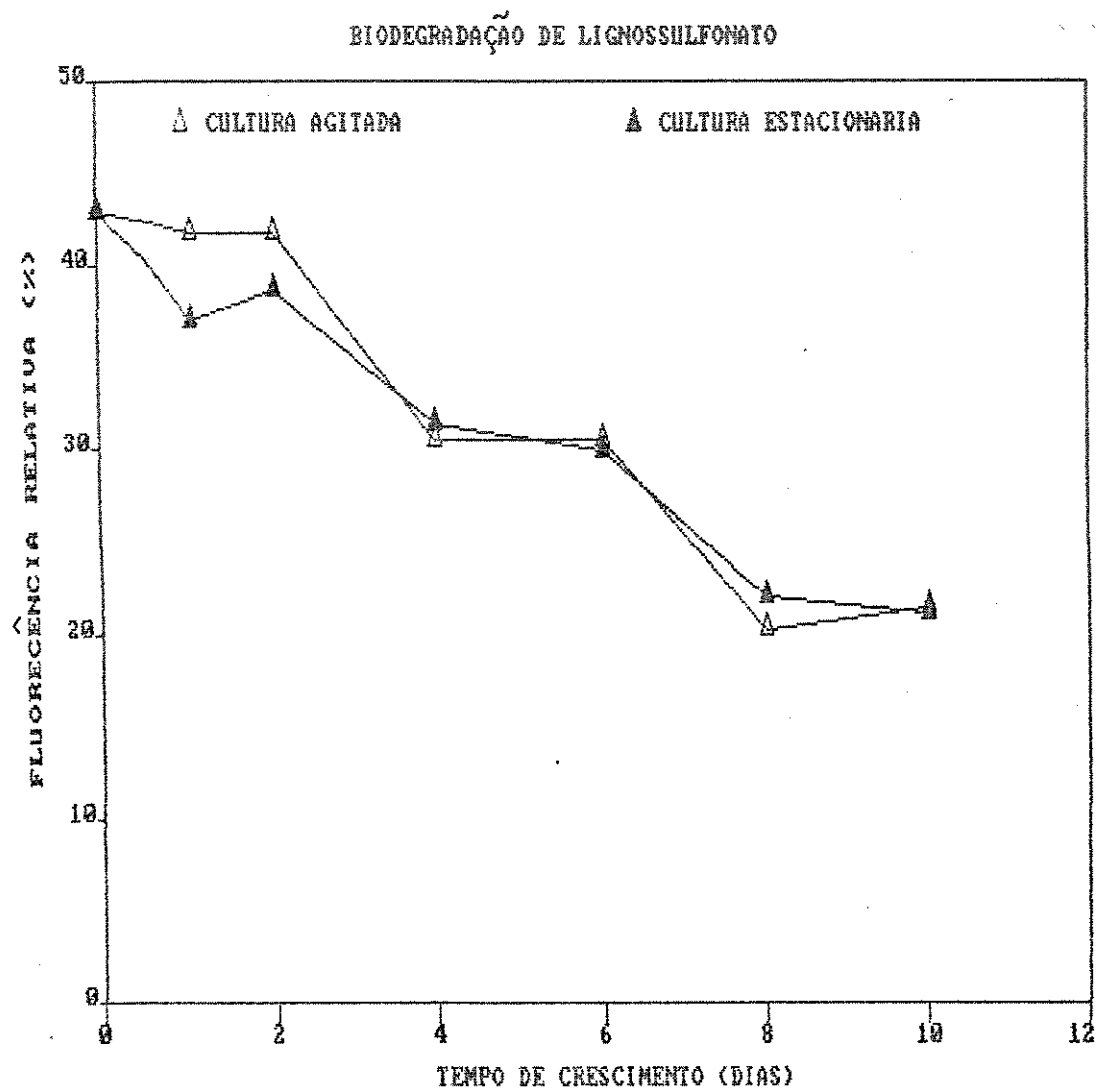


FIGURA 12. Comportamento da fluorescência dos meios de cultivo contendo LS 0,1 % (amostras diluídas 10 vezes). λ de excitação = 335 nm, λ de emissão = 400 nm). --▲-- cultura estacionária, --△-- cultura agitada.

3.2.2 Efeito da concentração de nitrogênio e da oxigenação.

A importância da concentração de nitrogênio e da oxigenação no meio de cultivo de microorganismos que degradam lignina foi destacada anteriormente (ver 1.4, p.18).

O efeito da concentração de nitrogênio na massa micelar de C. sitophila é mostrado na figura 13. Com base nestes dados, escolhemos as concentrações de 76, 27 e 9 mmol de nitrogênio por litro, como concentração abundante, média e limitante, respectivamente, para serem estudados seus efeitos na biodegradação de LS.

A figura 14 (p.58) mostra o comportamento da fluorescência ($\lambda_{\text{emiss.}} = 400 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{exc.}} = 335 \text{ nm}$) do meio de cultivo contendo LS e diferentes concentrações de nitrogênio (sem borbulhar oxigênio). Pode ser observado que existe uma queda de 70 % da fluorescência quando o meio contém 76 mMol de nitrogênio / litro, sendo esta queda superior às obtidas com concentrações mais baixas de nitrogênio. Comparando-se estes valores com os obtidos quando foi borbulhado oxigênio no meio, figura 15 (p.59), novamente observamos que a maior queda da fluorescência, 50 % ao 9º dia, corresponde à cultura contendo 76 mMol de nitrogênio / litro, porém este valor não alcança o obtido quando não foi borbulhado oxigênio (70 %).

As figuras 16 e 17 (p.60 e 61) mostram o comportamento da absorbância a 280 nm dos caldos contendo LS, sem e com oxigenação respectivamente. Nestas figuras nota-se, como nas modificações da fluorescência, que as maiores modificações na absorbância ocorrem quando o meio contém 76 mMol de nitrogênio/l. Ainda que as transformações dos LS na presença de oxigênio (76 mMol, figura

17) produzam um aumento maior da absorbância a 280 nm, esta não cai posteriormente aos níveis de quando não é borbulhado oxigênio.

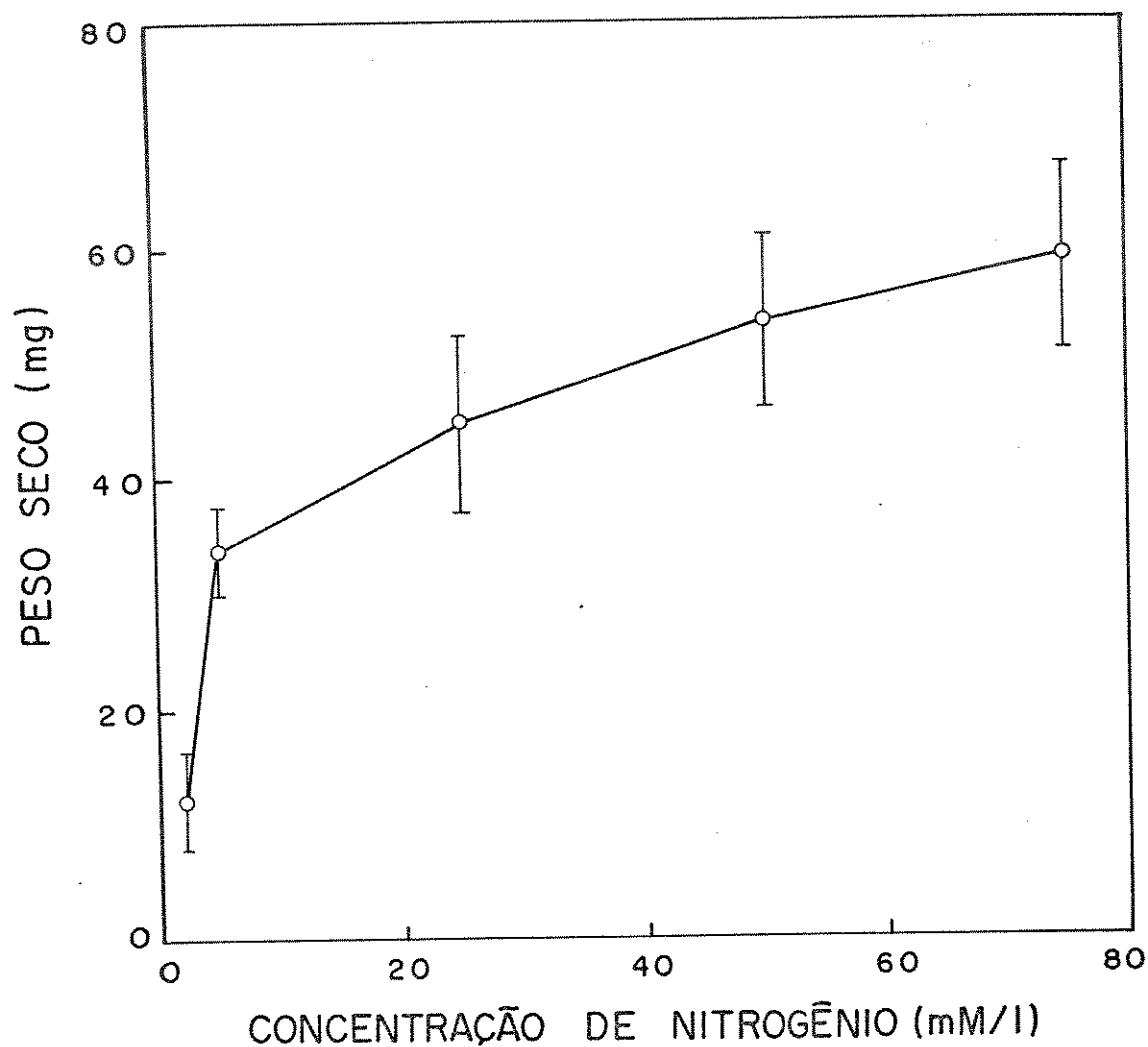


FIGURA 13. Efeito da concentração de nitrogênio no crescimento de *C. sitophila*. Os pontos correspondem ao dia de máximo peso seco obtido (este foi diferente para cada concentração de nitrogênio). Culturas em erlenmeyer de 125 ml contendo 20 ml de meio Fries tamponado.

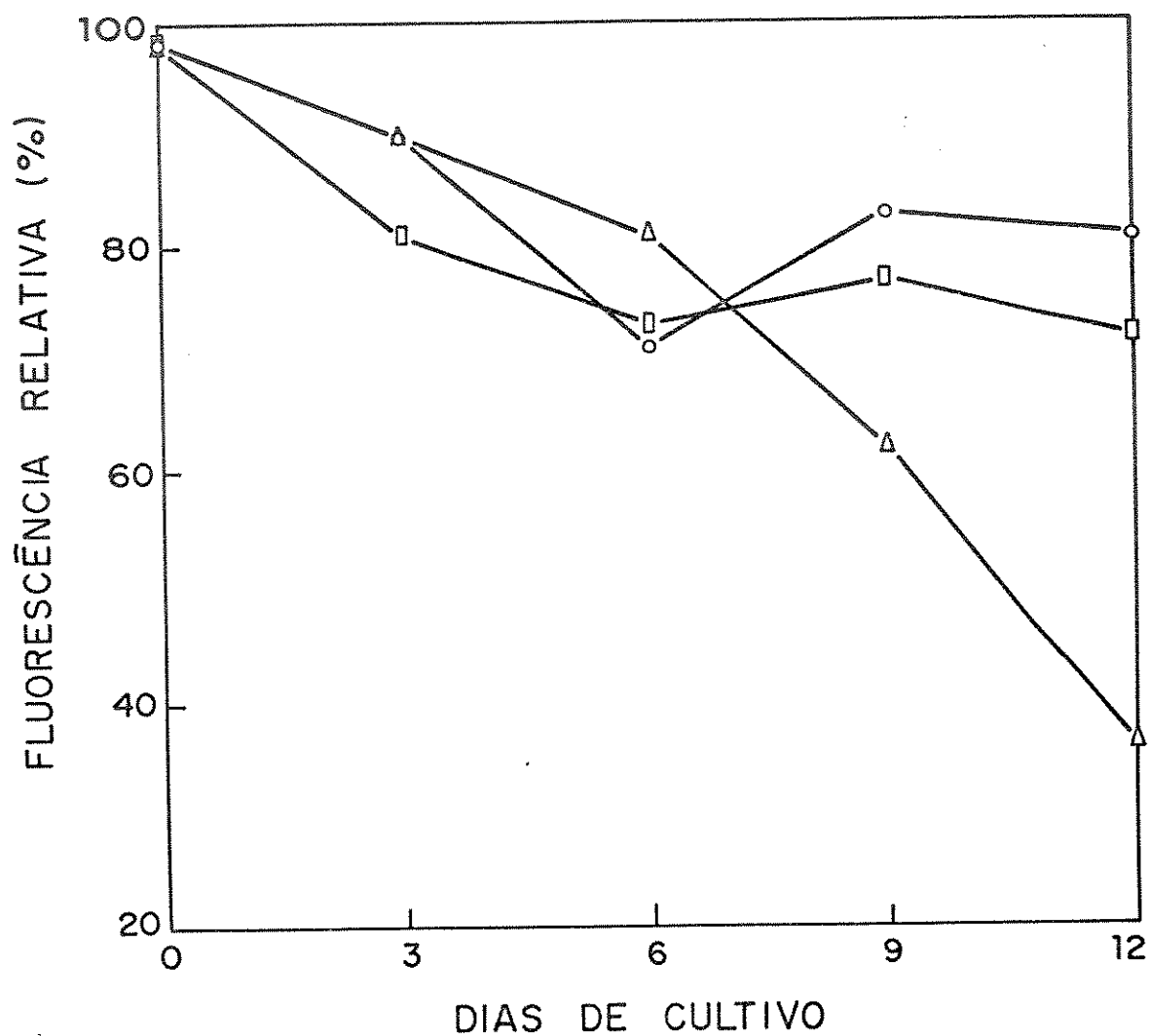


FIGURA 14. Fluorescência dos meios de cultivo contendo 0,1 % LS (λ de excitação = 335nm; λ de emissão = 400 nm). Meio Fries não oxigenado contendo: (---○---) 9 mmol N/l, (---□---) 27 mmol N/l e (---△---) 76 mmol N/l.

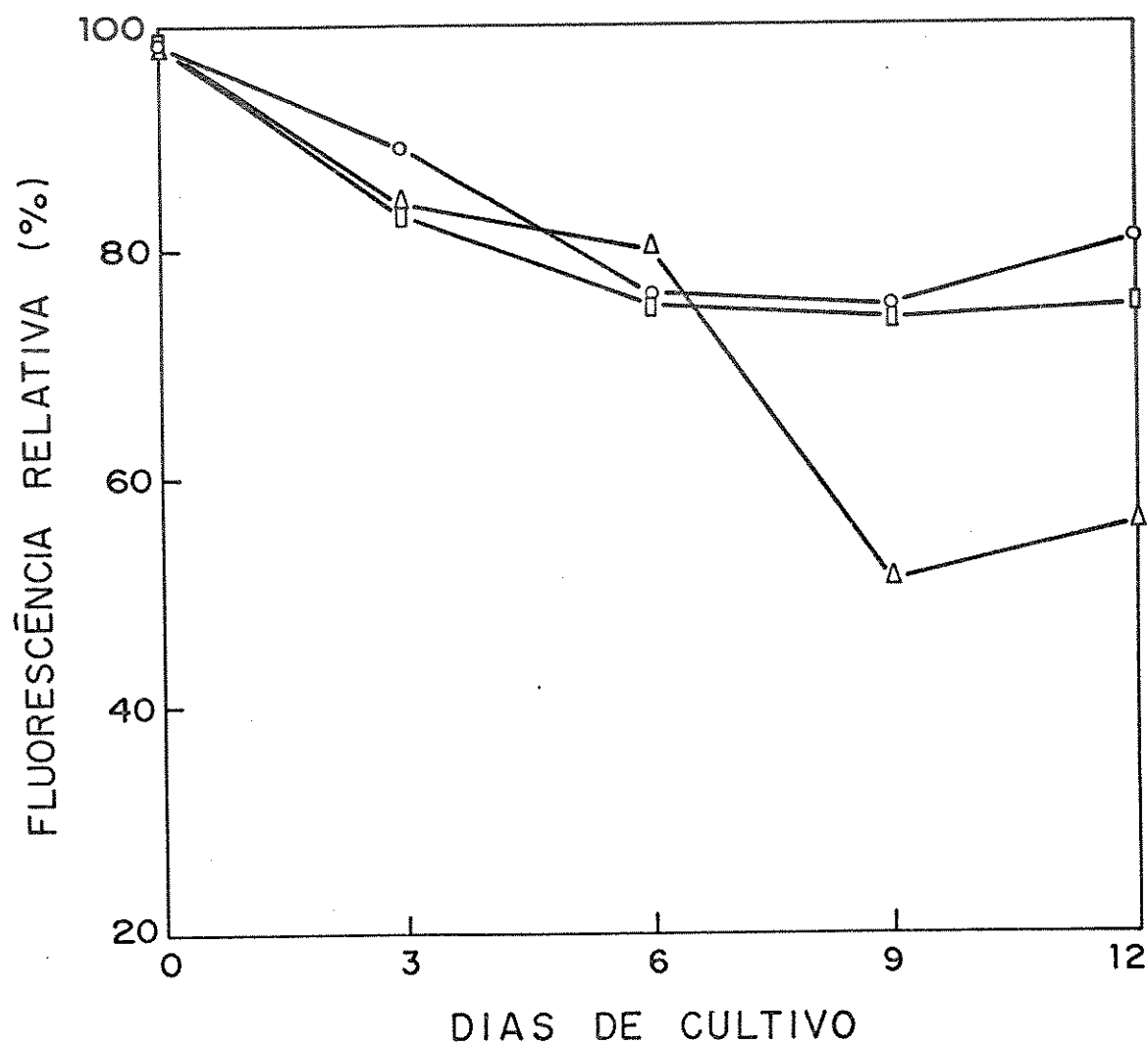


FIGURA 15. Fluorescência dos meios de cultivo contendo 0,1 % LS (λ de excitação = 335nm; λ de emissão = 400 nm). Foi borbulhado oxigênio no meio de cultivo durante 10 min a cada 3 dias. Meio Fries contendo (---O---) 9 mmol N/l, (---□---) 27 mmol N/l e (---Δ---) 76 mmol N/l.

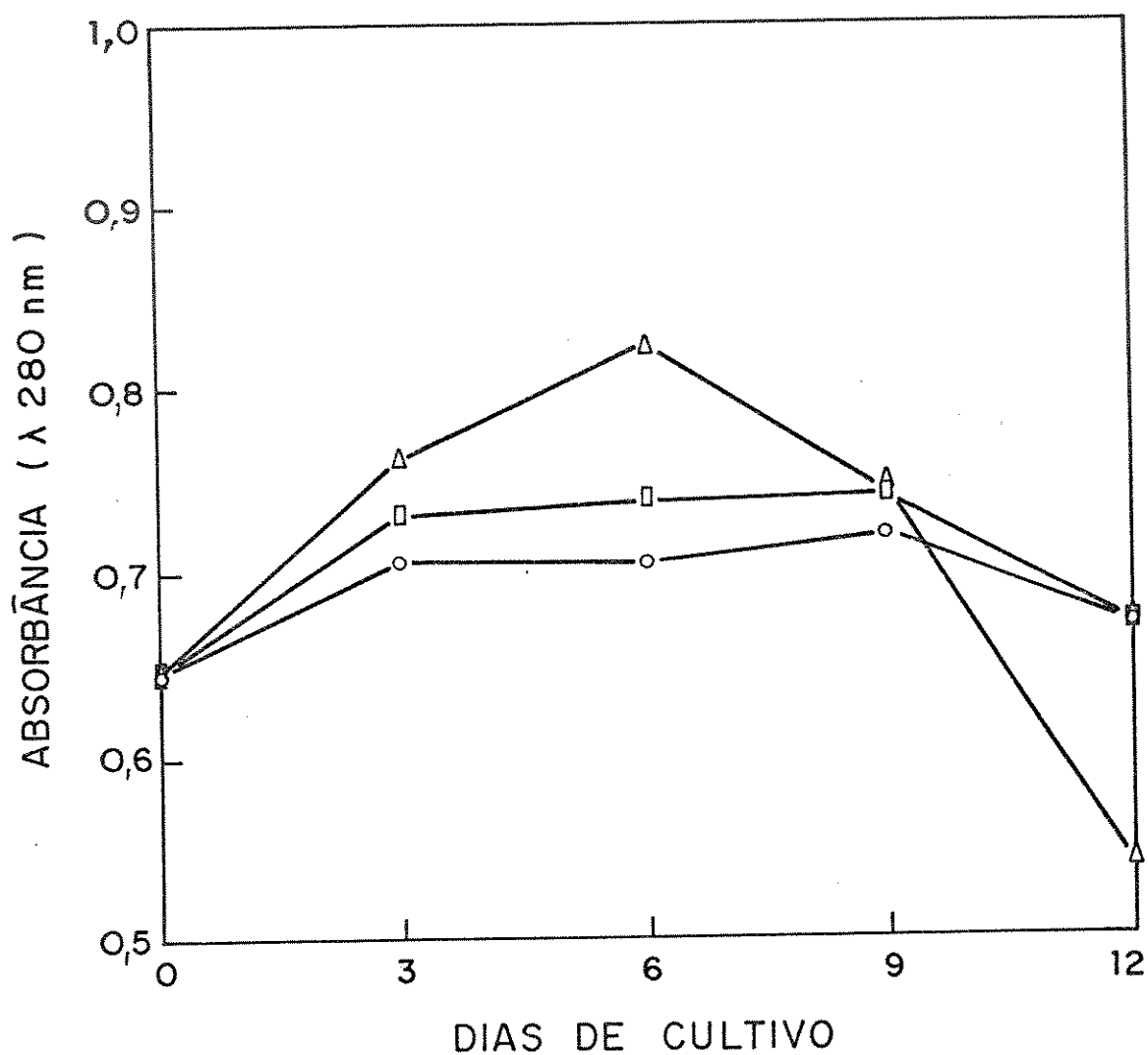


FIGURA 16. Absorbância a 280 nm dos meios de cultivo contendo 0,1 % LS. Meio Fries não oxigenado contendo: (---O---) 9 mmol N/l, (---□---) 27 mmol N/l e (---Δ---) 76 mmol N/l. As amostras foram diluídas 10 vezes.

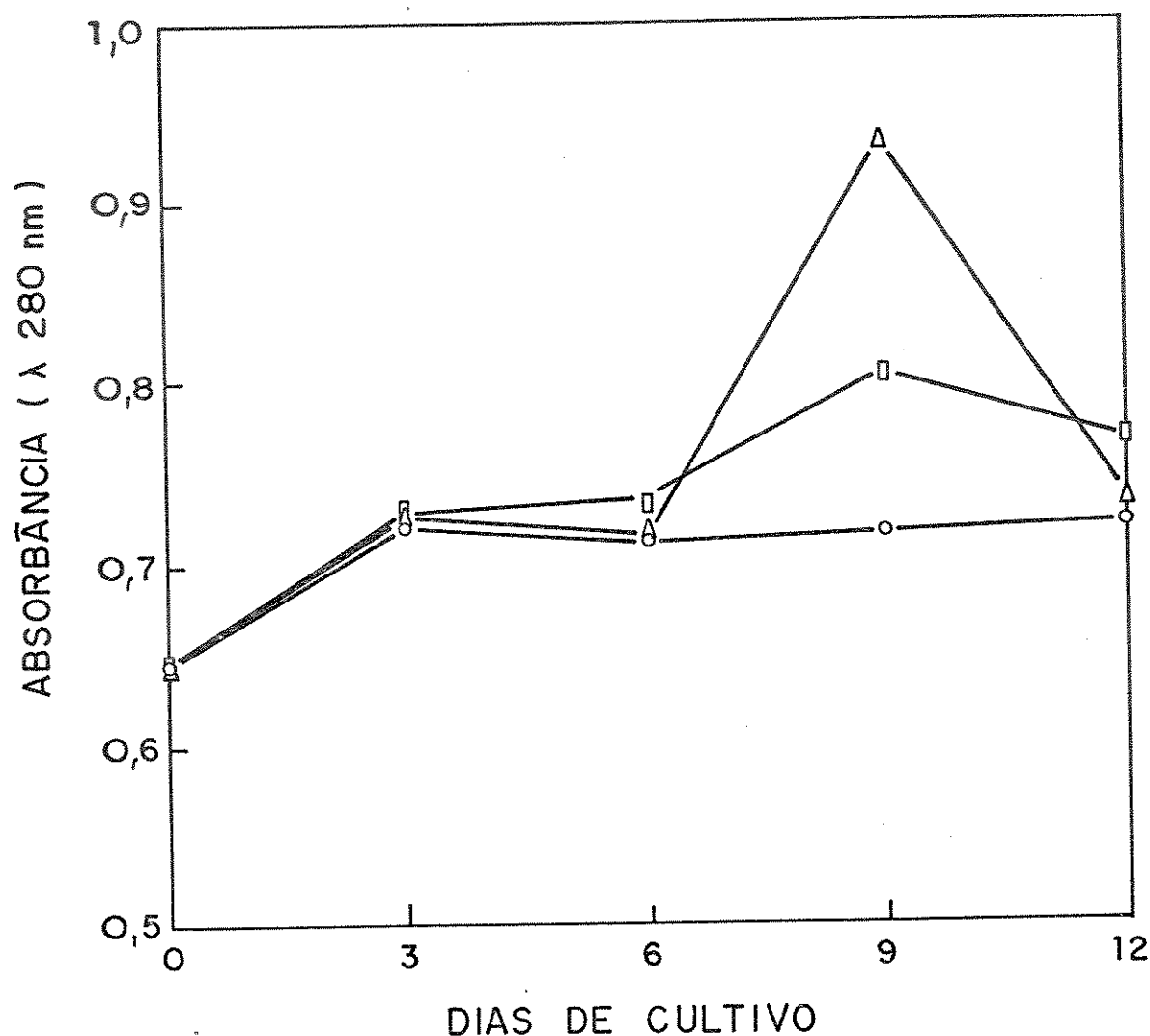


FIGURA 17. Absorbância a 280 nm dos meios de cultivo contendo LS. Meio Fries oxigenado durante 10 min a cada 3 dias contendo: (---O---) 9 mmol N/l, (---□---) 27 mmol N/l e (---Δ---) 76 mmol N/l. As amostras foram diluídas 10 vezes.

A distribuição dos pesos moleculares dos LS biodegradados é mostrada nas figuras 18 e 19. Destes cromatogramas de permeação em gel, podemos concluir que a despolimerização dos LS é máxima nas concentrações maiores de nitrogênio. Também pode-se observar um perfil diferente na despolimerização das culturas com e sem oxigenação.

Estes resultados podem ser considerados comparáveis aos obtidos com cultivos de P. chrysosporium nos quais o lignossulfonato foi degradado para pesos moleculares de aproximadamente 1.400 (Ulmer e col. 1983).

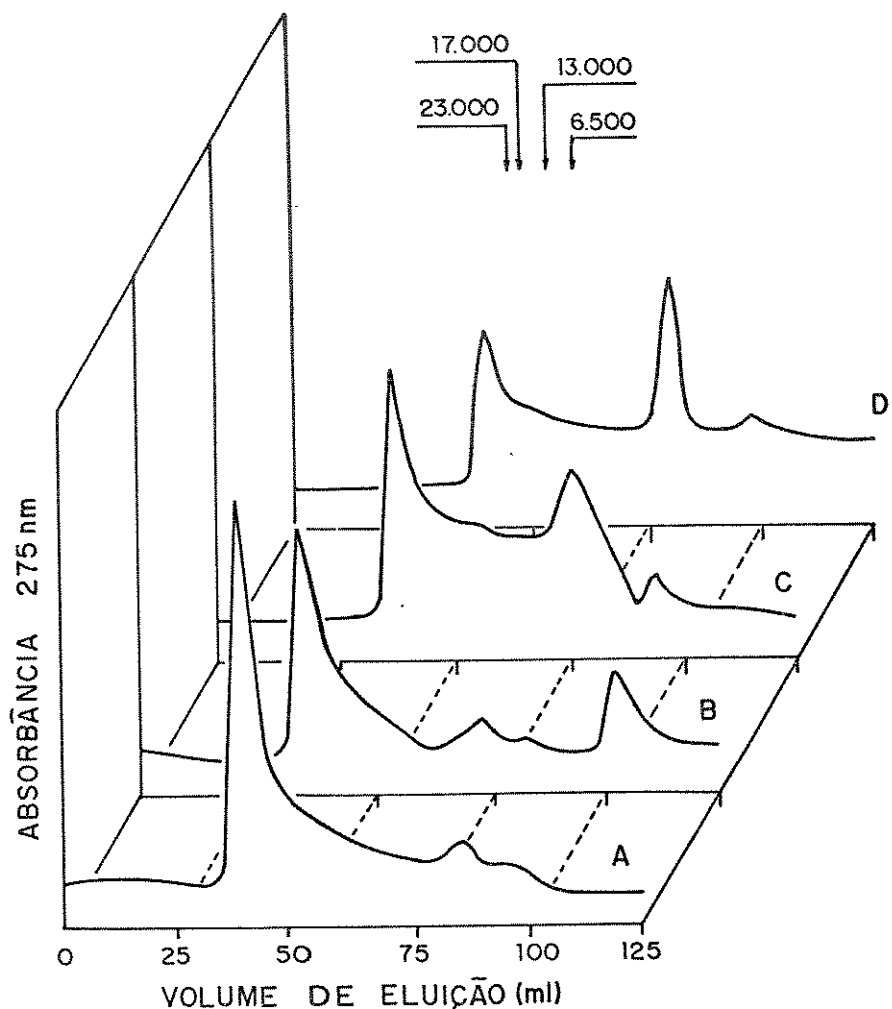


FIGURA 18. Cromatograma de permeação em gel em Sephadex G-50 (ver 2.21) de culturas de C. sitophila contendo lignossulfonato e diferentes concentrações de nitrogênio, sem borbulhar oxigênio. A: LS não tratado. B: 9 mmol N/l. C: 27 mmol N/l. D: 76 mmol N/l.

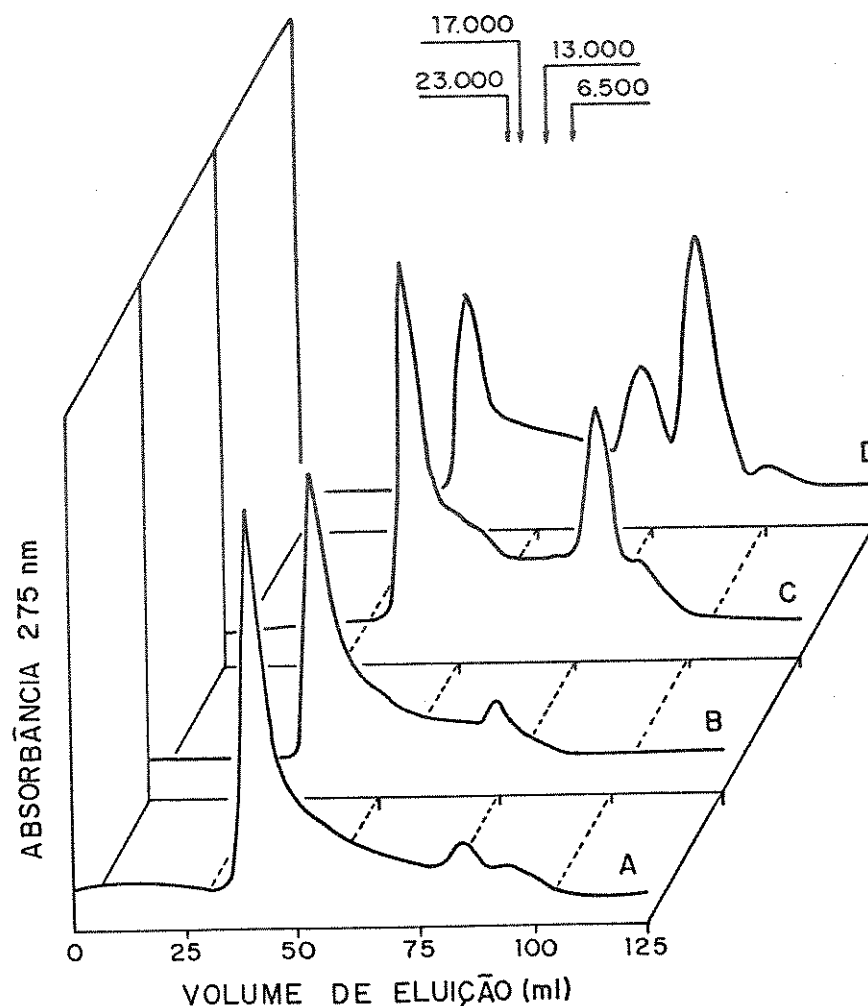


FIGURA 19. Cromatograma de permeação em gel em Sephadex G-50 de culturas de *C. sitophila* contendo lignossulfonato e diferentes concentrações de nitrogênio, foi borbulhado oxigênio durante 10 min. a cada 3 dias. A: LS não tratado. B: 9 mmol N/l. C: 27 mmol N/l. D: 76 mmol N/l.

A figura 20 mostra uma curva de calibração da coluna usada para estudar a distribuição de pesos moleculares dos LS. Observa-se uma linearidade entre os pesos de 23.000 a 6.500.

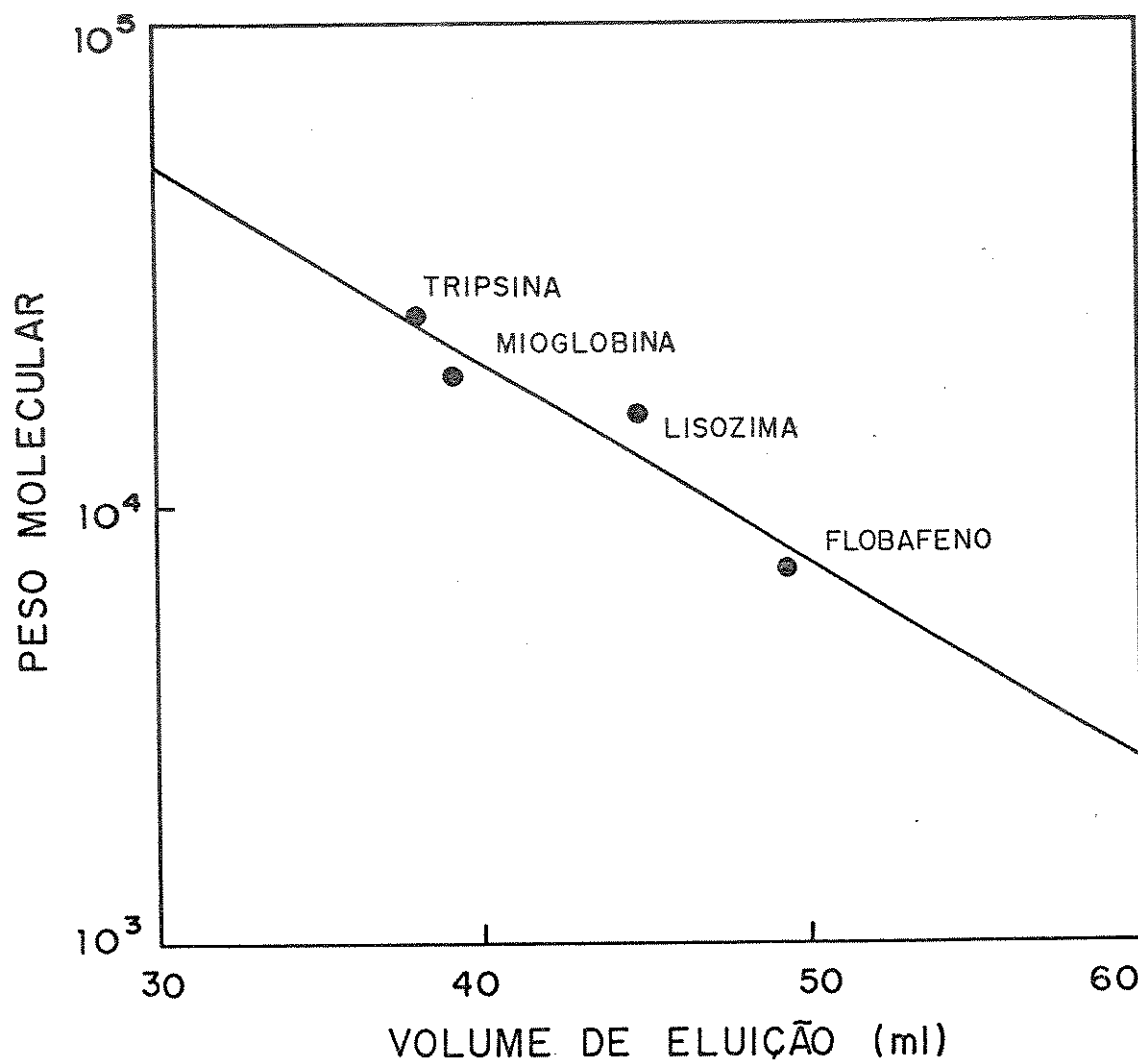


FIGURA 20. Curva de calibração da coluna de Sephadex G-50.

PM (Tripsina)=23.000, (Mioglobina)=17.000, (Lisosi-
ma)=13.900, (Flobafeno)=6.500 (ver 2.21).

Não sendo possível medir a atividade "ligninase" (oxidação de álcool veratrílico a veratraldeído) num meio contendo lignina ou lignossulfonato, como neste caso devido à alta absorbância dos mesmos a 310 nm, foi medida a atividade fenol-oxidase (oxidação de o-dianisidina), que também foi máxima (0,20 U/l no sexto dia, figura 21) nos caldos contendo maior concentração de nitrogênio (76 mmol de N/l sem borbulhar oxigênio). Nas culturas onde foi borbulhado oxigênio, os valores obtidos foram inferiores (figura 22).

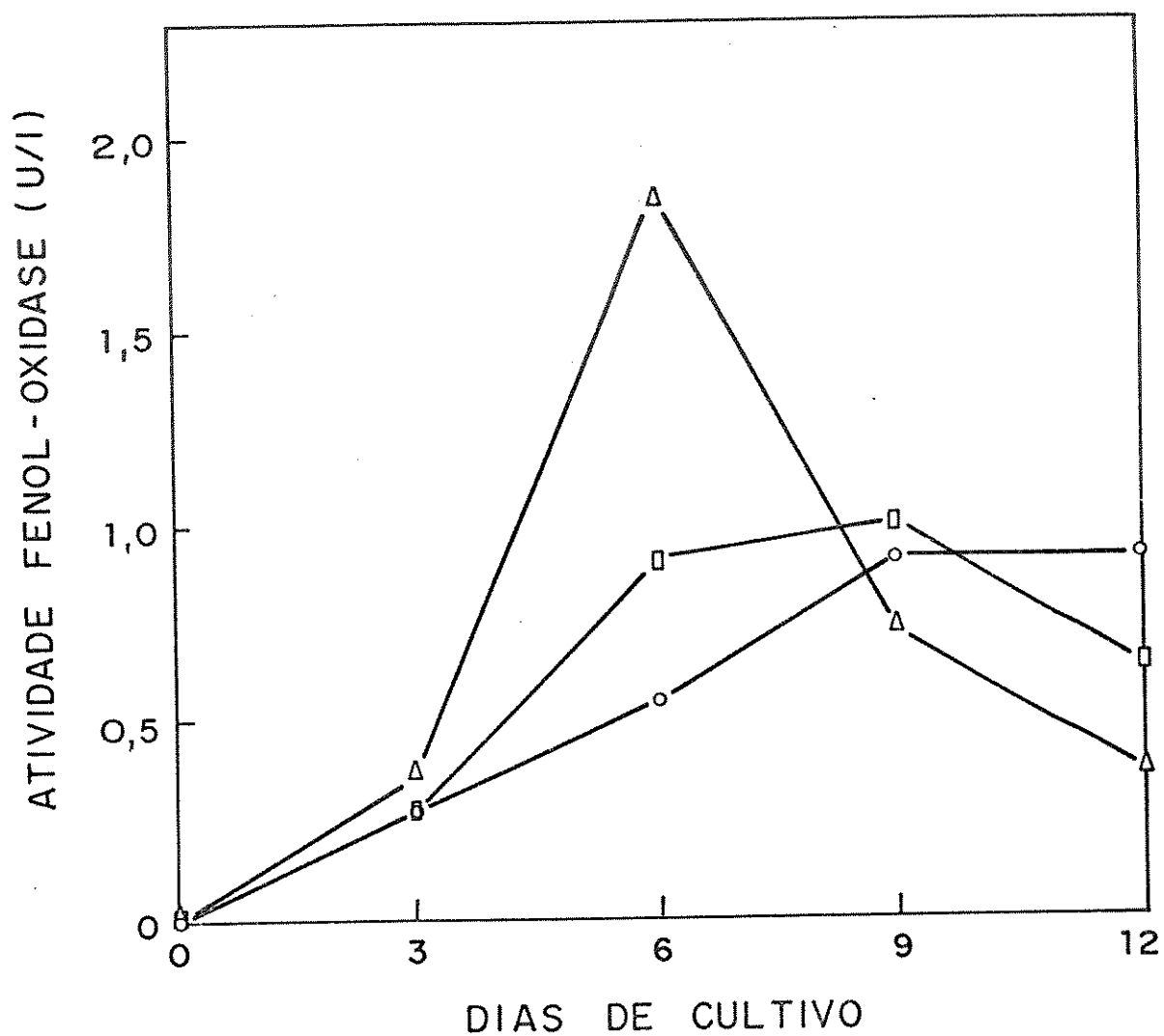


FIGURA 21. Produção de fenol-oxidase por *C. sitophila* na presença de 0,1 % LS. Meio Fries oxigenado contendo : (---O---) 9 mmol N/l, (---□---) 27 mmol N/l e (---Δ---) 76 mmol N/l. Ver 2.5).

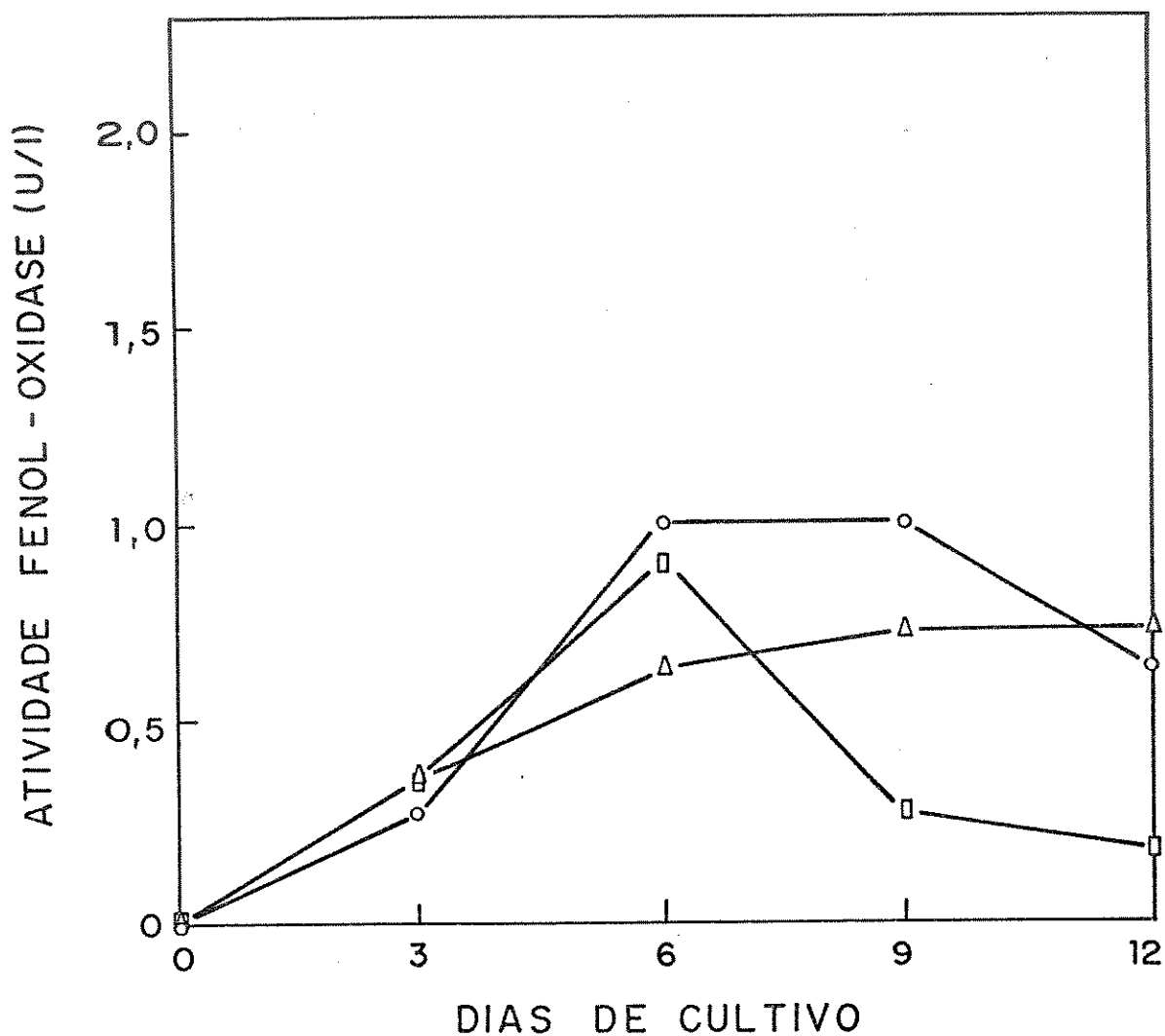


FIGURA 22. Produção de fenol-oxidase por *C. sitophila* na presença de LS. Meio Fries oxigenado contendo : (---O---) 9 mmol N/l, (---□---) 27 mmol N/l e (---Δ---) 76 mmol N/l. Ver 2.5).

As culturas nas quais foram observadas as máximas modificações dos LS coincidem com aquelas de máxima atividade fenol-oxidase, sendo clara a participação destas enzimas na biodegradação de LS.

O conteúdo dos grupos OH fenólicos do LS biodegradado a diferentes concentrações de nitrogênio após 12 dias com e sem borbulhamento de oxigênio é mostrado na tabela 4.

Na tabela 4 podemos ver que o teor de OH fenólicos do LS biodegradado em meio contendo 76 mmol de nitrogênio/l, na ausência de oxigenação, apresentou um aumento de 18,6 % em relação ao controle não inoculado. No entanto em concentrações menores de nitrogênio o teor de OH fenólico do LS diminuiu. Para as amostras em que foi borbulhado oxigênio não foi observada uma correlação entre a concentração de nitrogênio presente no meio de cultivo e a percentagem de OH fenólico.

TABELA 4. TEOR DE OH FENÓLICOS (%) APÓS A BIODERADAÇÃO POR 12 DIAS.

N mmol/l	NHO TRATADO	CONDIÇÕES					
		Ar (a)			OXIGÊNIO (b)		
		76	27	9	76	27	9
% OH(c,d)	1,05	1,29	1,20	0,76	1,08	1,18	1,14

a) Cultura estacionária na presença de ar.

b) Cultura estacionária com oxigenação a cada 3 dias por 10 min.

c) gramas de OH por 100 g. de lignina.

d) Erro máximo de 4 %.

A produção de H_2O_2 em culturas contendo 76 mmol N/l com e sem oxigenação é mostrada na figura 23. A produção de H_2O_2 em culturas de P. chrysosporium é muito superior quando a cultura é oxigenada (Faison e Kirk, 1983), porém em nosso caso só foi observado um aumento a partir do nono dia que posteriormente diminuiu. Em menores concentrações de nitrogênio, valores inferiores foram obtidos (não mostrado).

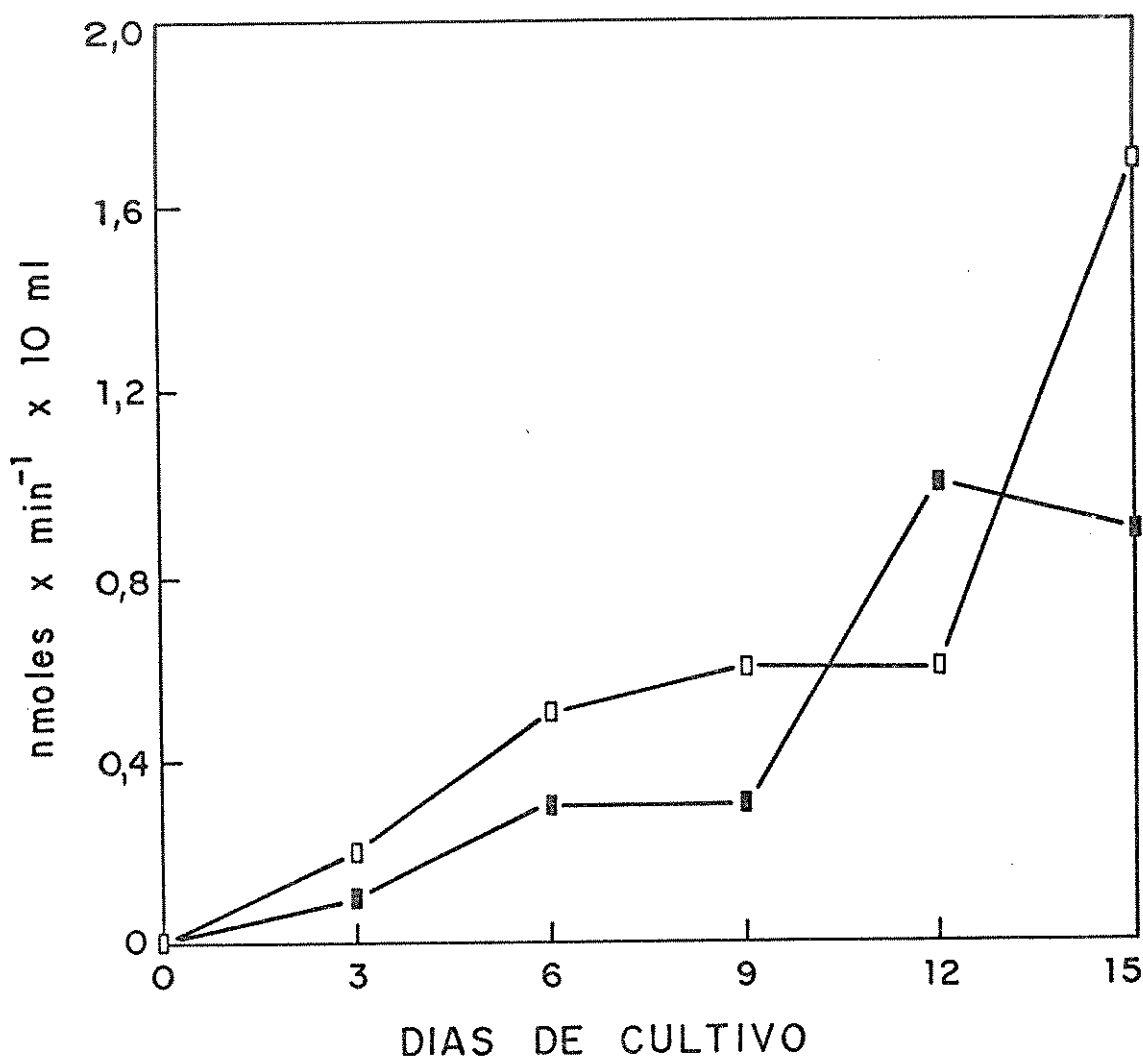


FIGURA 23. Produção de H_2O_2 por C. sitophila em culturas contendo 0,1 % de LS, 76 mmol N/l (---□---) cultura não oxigenada e (---■---) cultura oxigenada (ver 2.5).

A magnitude da biodegradação de lignossulfonato (LS) por C. sitophila foi quantificada pelo método da nitrosolignina. Apesar deste método ser baseado na reação de ácido nitroso com grupos fenólicos do LS (a percentagem de OH fenólico no LS residual varia durante a biodegradação), ele tem sido usado por Selin e col. (1975) para medir o consumo de LS por Polyporus dichrous (degradação observada 11 %) e por Kern (1983) para medir o consumo de LS por Trichoderma harzianum (degradação observada 35%). C. sitophila degradou um máximo de 42 % de LS seguindo a cinética mostrada na figura 24.

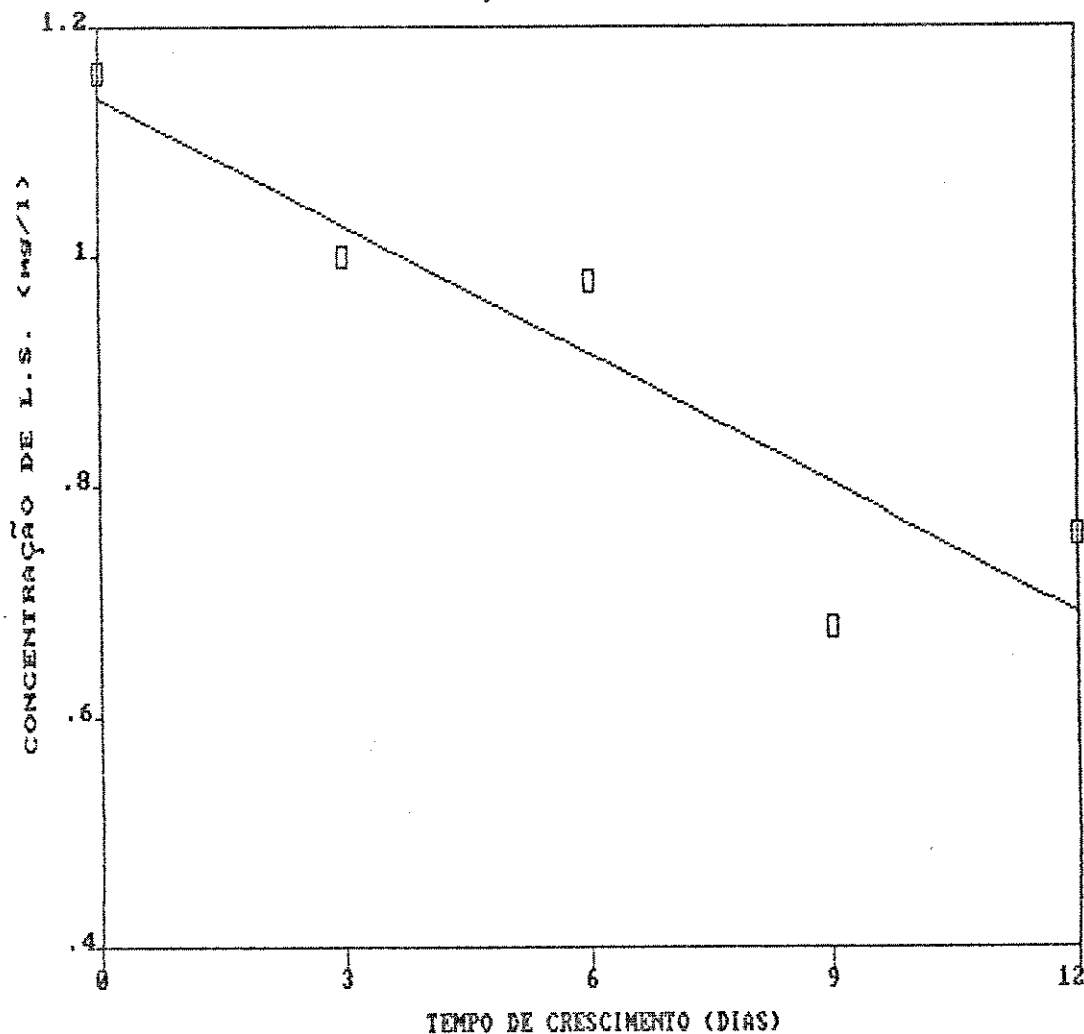


FIGURA 24. Consumo de Lignossulfonato por C. sitophila, segundo determinação através do método da nitrosolignina (meio Fries 0,1 de LS, 1,0 % de glicose)

As transformações que C. sitophila produz no LS em alta concentração de nitrogênio foram analisadas (tabela 5). A fração de menor peso molecular (fragmentos de LS) foi separada por exaustiva diálise contra água deionizada. Nestas condições foram separadas as frações com peso molecular menor que 10.000, possibilitando a análise do LS polimérico remanescente.

Na tabela 5 são comparadas as mudanças do LS não tratado e o LS biodegradado. A percentagem de OH fenólico aumenta 14 %, metoxilas por unidade fenil propano (C-9) aumenta 7 % e o conteúdo de α e γ carbonilas permanece praticamente inalterado.

TABELA 5. MUDANÇAS NOS GRUPOS FUNCIONAIS DE LS POR C. sitophila

	NÃO TRATADO	BIODEGRADADO
α [l g ⁻¹ cm ⁻¹]	11.91 $\pm$ 0,59	10.55 $\pm$ 0,25
Carbonilas α	0,004	0,006
γ	0,018	0,015
% OH fenólicos	1,57	1,82
OCH ₃ /C ₉	1,28	1,38

A partir da absorbância no infravermelho podemos obter outras evidências de alterações estruturais no LS biodegradado. Usando a razão de absorbância a 1040 cm⁻¹ (sulfonato)/ 1610 cm⁻¹ (aromático) foi observado um incremento relativo dos grupos sulfonatos/aromáticos de 0,34 para 0,48 no não tratado e biodegradado, respectivamente.

Portanto, com esta série de medidas, temos fortes evidências para acreditar que ao contrário do basidiomiceto P. chrysosporium, C. sitophila degrada lignina em cultura agitada e na presença de nitrogênio em concentrações tais que permitem um crescimento sem limitação de nutrientes. O sistema ligninolítico de P. chrysosporium só é ativado na carência de nutrientes, principalmente nitrogênio e excepcionalmente em cultura agitada. Este fato tem importantes consequências biotecnológicas, quando se pensa na produção de enzimas ligninolíticas, considerando que o crescimento não deve sofrer restrições e que culturas em biorreatores (não imobilizadas), devem ser agitadas. Grandes esforços têm sido feitos por outros grupos para produzir mutantes de P. chrysosporium capazes de produzir enzimas ligninolíticas na abundância de nutrientes (Kirk e Farrell, 1987). Outra exceção, como C. sitophila é L. edodes que expressa atividade ligninase durante o período de crescimento vegetativo (Leathan, 1986).

A influência do oxigênio na degradação de LS e na produção de fenol-oxidases, não pôde ser esclarecido totalmente com as experiências realizadas, considerando que não foram estudados diferentes fluxos ou como este sistema se comportaria se em lugar de oxigênio tivesse sido borbuhlado ar. Em princípio poder-se-ia dizer que o oxigênio nas condições usadas tem um efeito inibidor sobre a produção de enzimas pelo fungo. Inibição das enzimas ligninolíticas por oxigênio também foi observado em culturas de C. versicolor (Dodson e col., 1987).

3.3 INFLUÊNCIA DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO NA PRODUÇÃO DE LIGNINASE

A produção de ligninases, por C. sitophila apresenta grandes variações entre as culturas, mesmo em condições idênticas. Isto é um fato comum em fungos ligninolíticos (Jonsson e col., 1987; experiência pessoal com P. chrysosporium, não mostrada). Desta forma, foram realizadas tentativas para aumentar e normalizar a produção de ligninase através de imobilização do fungo e uso de detergente no meio de cultivo.

3.3.1 Imobilização em suportes poliméricos

A imobilização do fungo foi realizada em suportes de nylon e espuma de poliuretano. Os resultados obtidos mostraram que o nylon é um suporte adequado se comparado com o micélio livre e o micélio imobilizado em poliuretano (figura 25). No dia de máxima atividade, C. sitophila imobilizado em nylon produziu 2 vezes mais enzima que o micélio livre. Cabe resaltar que os valores absolutos desta experiência são baixos se comparados com outros valores obtidos com este fungo (Ver 3.4, 3.5 e Rodríguez , 1987).

Ensaio de imobilização em nylon e poliuretano têm sido realizados com P. chrysosporium. Kirkpatrick e Palmer (1987) reportaram poliuretano como um excelente suporte, sendo que para Linko e Zhong (1987), nylon foi o melhor suporte para a produção de ligninases por este fungo. Trabalhando com um biorreator de 10 l e usando P. chrysosporium imobilizado em cubos de nylon foi obtida uma grande produção de ligninases (Linko, 1988). Em nosso caso, não foram observadas grandes variações na produção de ligninase, entre os dois suportes.

O uso de nylon para imobilizar C. sitophila poderá ter aplicações na produção de ligninases por este fungo, uma vez que sejam melhor compreendidos outros fatores envolvidos na sua produção.

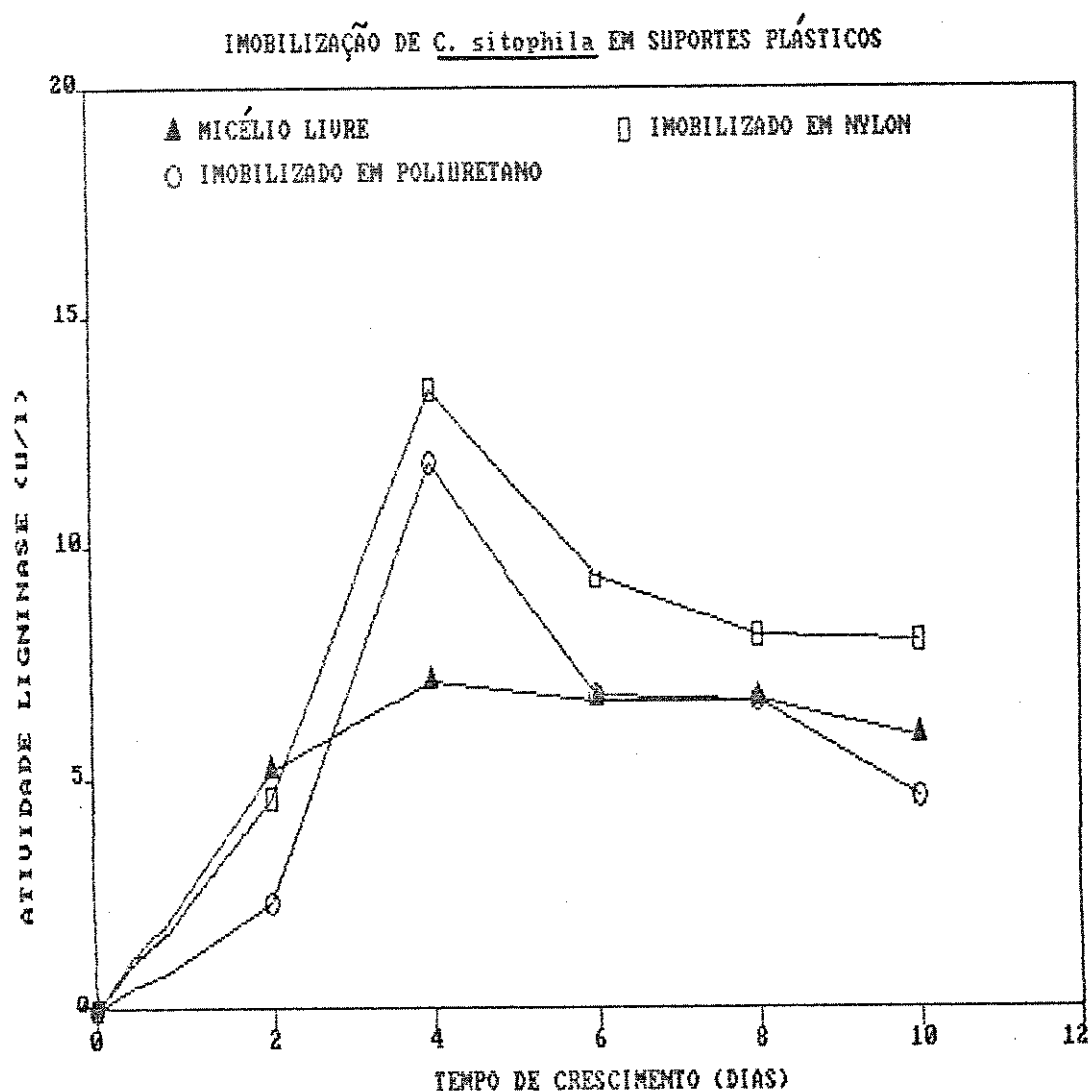


FIGURA 25. Atividade ligninase (U/l) de C. sitophila livre e imobilizado em suporte de nylon e espuma de poliuretano (ver 2.9).

3.3.2 Adição de detergentes.

Resultados obtidos na degradação de LS (ver 3.2.2) e madeira (Ferraz, comunicação pessoal) nos quais sempre o sistema ligninolítico atua eficientemente, nos levaram a considerar a possibilidade da enzima permanecer unida ao micélio e a mudança de atividade ligninase entre as culturas estar relacionada à alterações na liberação das enzimas.

Foi sugerido que as enzimas extracelulares são sintetizadas em polissomas ligados à membrana. Os precursores destas proteínas contêm sequências de aminoácidos hidrofóbicos os quais são clivados por proteases específicas durante a secreção da enzima (Chethan, 1985 e referências ali incluídas).

O rendimento da secreção das enzimas pode ser incrementado pela adição de surfactantes no meio de cultivo. O mecanismo pelo qual os surfactantes aumentam a produção de enzimas extracelulares em fungos filamentosos não foi até agora estabelecido, mas tem sido sugerido por vários autores que este fenômeno está associado com a permeabilidade da membrana (Ashter e col., 1987).

Jager e col. (1985) mostraram que a adição de surfactantes não iônicos tais como sorbitan polioxi-etileno monooleato (Tween 80), sorbitan polioxi-etileno monolaureato (Tween 20) ou 3-(3-colamidopropil)-dimetil-amônio 1-propanosulfonato (CHAPS) aumentam a produção de ligninases com agitação. Asther e col. (1987) aumentaram a produção de ligninases adicionando ácido oleico emulsionado com Tween 80 ao meio de crescimento de P. chrysosporium.

Na intenção de liberar a enzima unida ao micélio, foi estudada a influência dos detergentes Tween 80 e Triton X-100. A figura 26 mostra as atividades obtidas nestas condições. Pode ser

observado que Tween 80 não aumenta a produção de ligninase, porém Triton X-100 produz um aumento no oitavo dia de 4,5 vezes se comparado com a cultura sem detergente (máximo no 4º dia), o que pode estar mostrando a liberação da enzima da membrana celular.

Na figura 27 podemos observar que Triton X-100 tem um efeito negativo no crescimento de C. sitophila, provocando uma drástica queda no peso de micélio. Por outro lado, Tween 80 estimula o crescimento mas não a produção de ligninases, isto pode estar associado à presença de ácidos graxos neste detergente os quais podem ser metabolizados pelo fungo. Quanto a Triton X-100, apesar da forte queda no crescimento das culturas, estas apresentaram mais alta atividade ligninase.

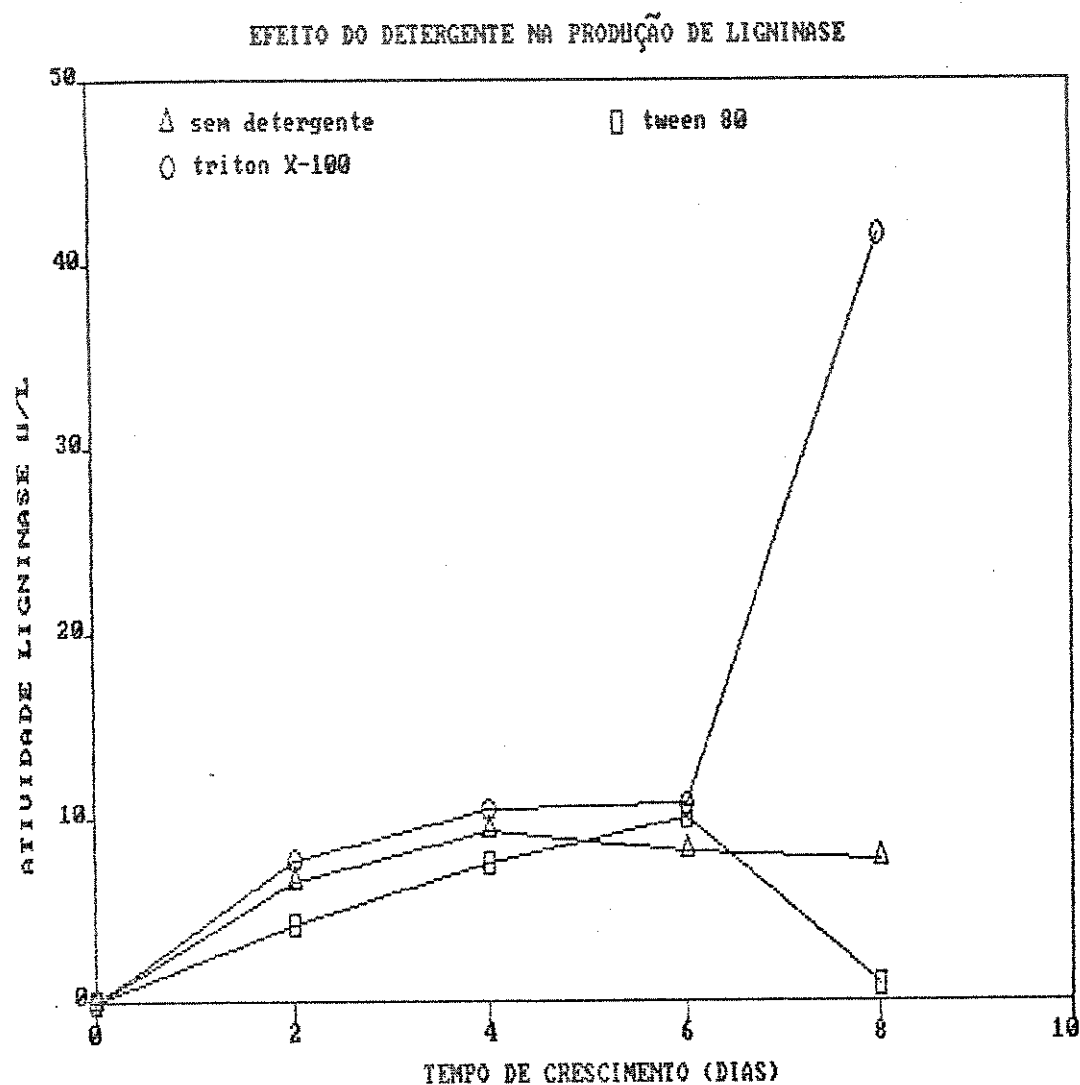


FIGURA 26. Efeito da adição de detergentes ao meio de cultivo na produção de ligninases por C. sitophila. Os surfactantes (0,5 mg/ml) foram incorporados ao meio no início da cultura (ver 2.10).

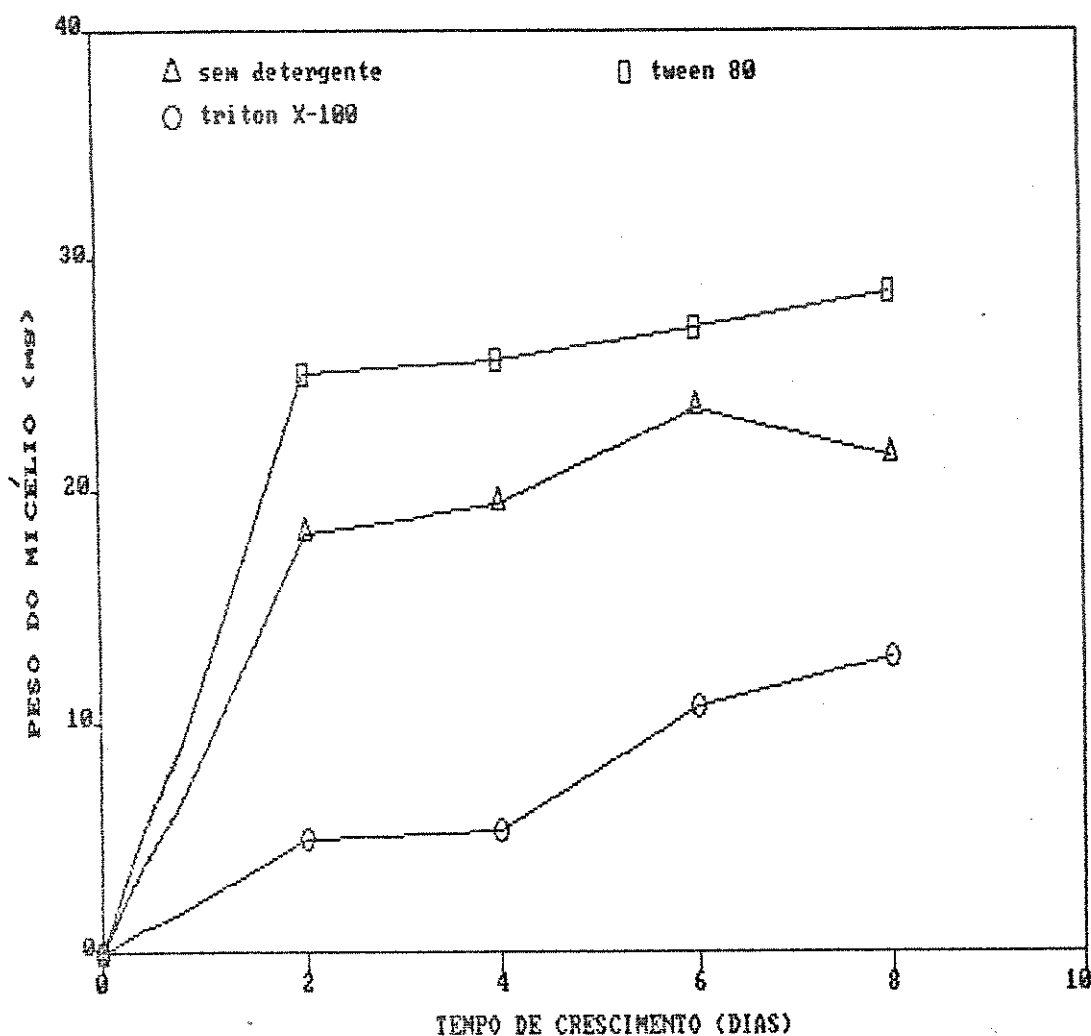


FIGURA 27. Peso seco de micélio de *C. sitophila* em meio sem detergente, na presença de Tween 80 e Triton X-100. Os surfactantes (0,5 mg/ml) foram adicionados ao meio no início da cultura (ver 2.10).

Tentou-se obter um melhor crescimento e ao mesmo tempo uma maior produção de enzimas, adicionando o detergente após 72 horas de crescimento. Na figura 28 podemos ver que não existe neste caso um aumento na atividade ligninase, não obstante ter obtido um maior crescimento micelar (figura 29) em relação ao experimento onde foi adicionado Triton no início da cultura. Também podemos comprovar na figura 29 que a adição de Triton X-100 tem um efeito

negativo sobre o crescimento do fungo. Como se pode observar, a massa micelar começa a diminuir assim que o detergente é adicionado, enquanto a cultura sem Triton continua a crescer.

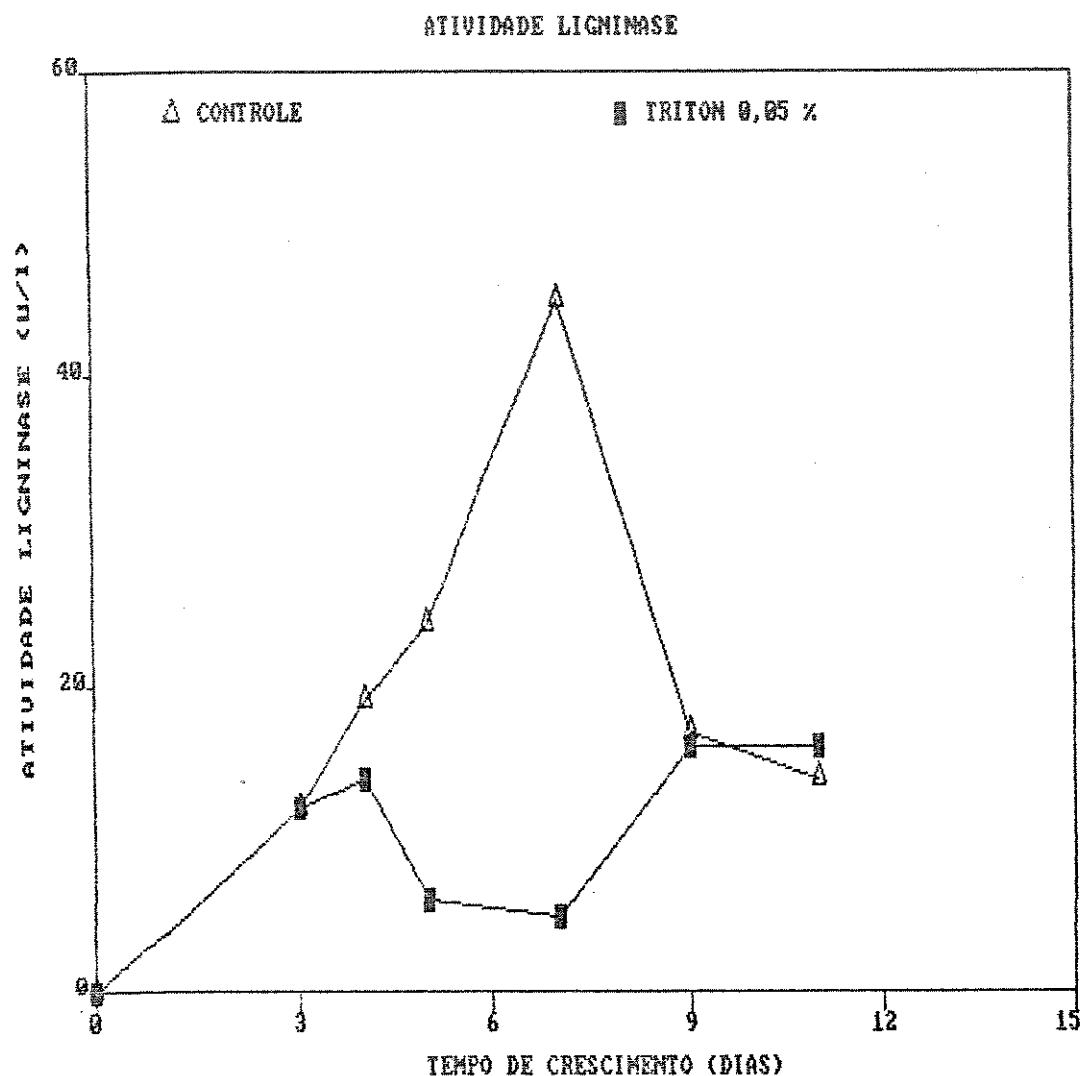


FIGURA 28. Efeito de Triton X-100 na atividade ligninase de C. sitophila. O detergente (0,5 mg/ml) foi adicionado após 72 horas de crescimento (ver 2.10).

Na figura 30 podemos ver que o detergente produz um aumento da proteína solúvel, mas como pode ser visto na figura 28, isto não corresponde a um aumento da atividade ligninase.

Numa outra experiência (não mostrada), na qual se pretendia constatar estes últimos resultados (produção de ligninase adicionando detergente após 72 h), observamos que a atividade ligninase aumenta em relação ao controle mantendo-se a queda na massa micelar. Podemos suspeitar que a ação do detergente está relacionada com a velocidade de crescimento da cultura o que depende, por sua vez, da magnitude e idade do inóculo. No momento da adição do detergente (após 72 horas), o micélio tinha alcançado a massa de 22 mg (não mostrado) enquanto que no primeiro exemplo o micélio tinha a massa de 30 mg.

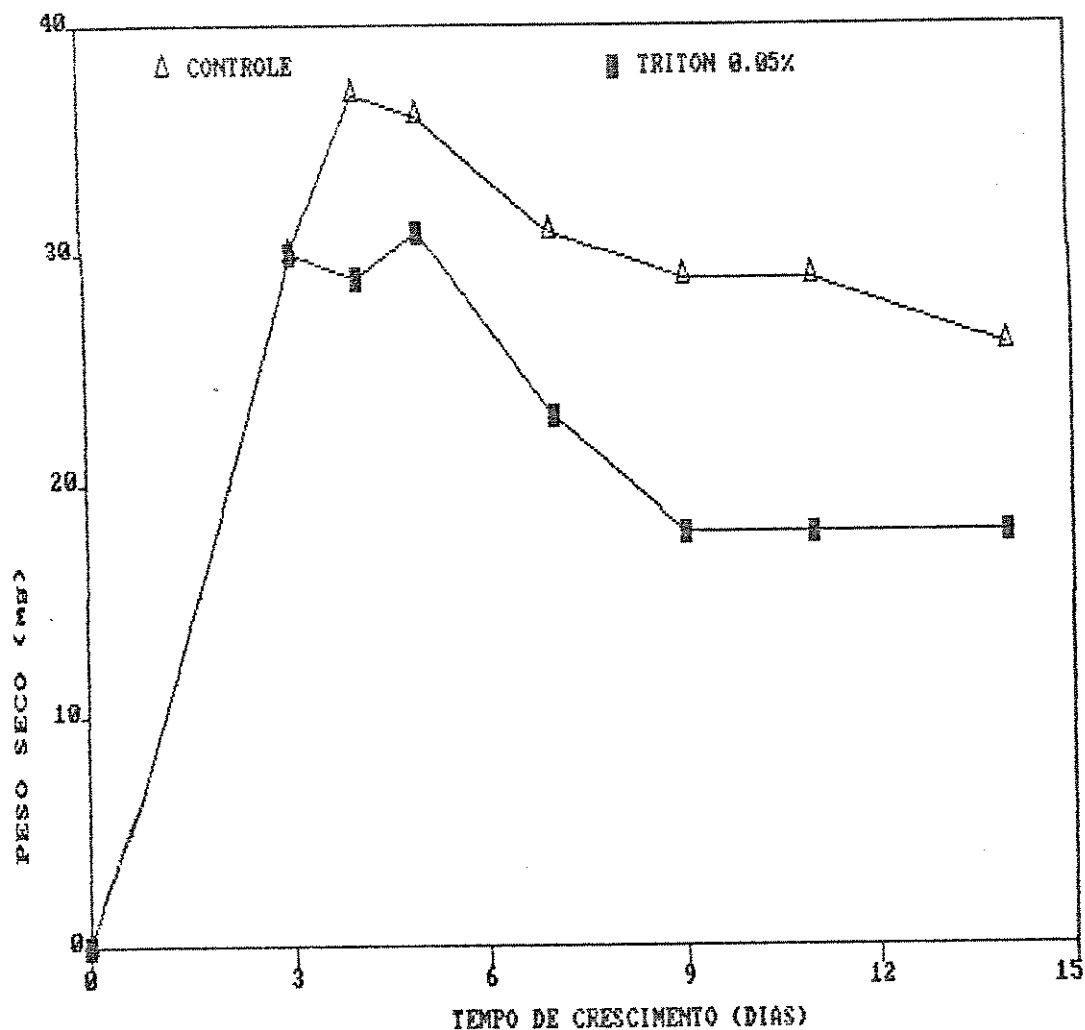


FIGURA 29. Efeito de Triton X-100 na massa micelar de C. sitophila. O detergente (0,5 mg/ml) foi adicionado após 72 horas de crescimento (ver 2.10).

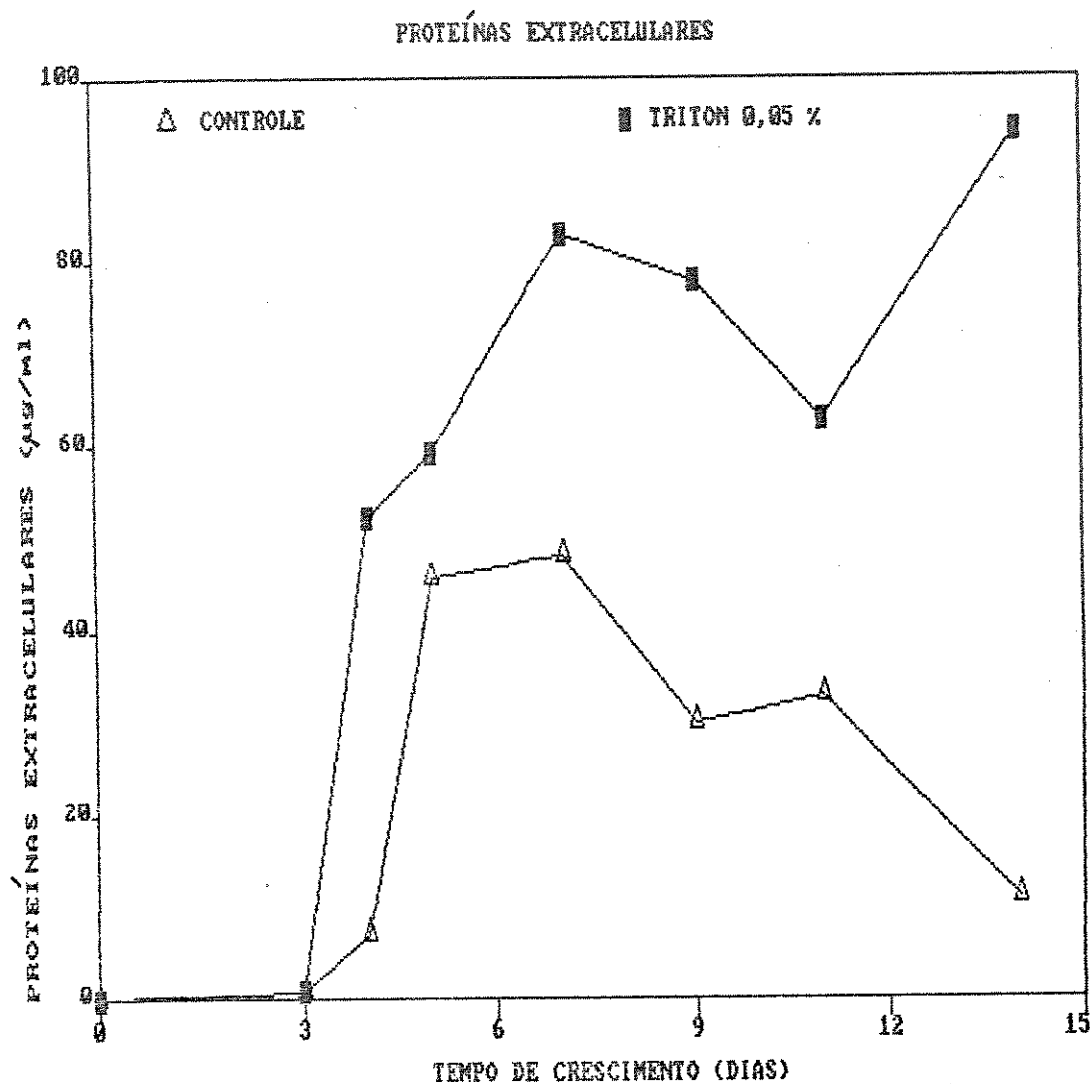


FIGURA 30. Efeito de Triton X-100 na produção de proteínas solúveis de *C. sitophila*. O detergente (0,5 mg/ml) foi adicionado após 72 horas de crescimento (ver 2.10).

Segundo os resultados apresentados, podemos ver que é possível aumentar a atividade ligninase imobilizando o fungo ou adicionando detergente no meio de cultivo, mas neste último caso, outros parâmetros devem ser verificados tais como a velocidade de crescimento da cultura e o tamanho do inóculo.

3.4 PURIFICAÇÃO DAS LIGNINASES

C. sitophila foi cultivada em Erlenmeyer de 2 l contendo meio Fries tamponado com biftalato de sódio 0,05 M a pH 6,0. Após 5 dias, a atividade ligninase obtida foi 91 U/L. Após armazenagem deste caldo em geladeira por alguns dias, a atividade ligninase aumentou para 103 U/l. O mesmo fenômeno já foi observado por Glumoff e col. (1990) com ligninase de P. chrysosporium que armazenada a 4 °C teve um aumento da atividade catalítica.

O perfil de eluição destas enzimas em DEAE-Sephadex A-50-120 é mostrado na figura 31. A presença de três proteínas com atividade ligninase podem ser observadas, as quais foram denominadas LiP-Cs I (lignina peroxidase de C. sitophila) LiP-Cs II e LiP-Cs III. A distribuição destas enzimas, calculada como a área sob a curva de hemoproteína (absorbância a 410 nm) foi de 33 %, 62 % e 5 % para LiP-Cs I, II e III respectivamente.

A pureza das frações I, II e III foi confirmada por focalização isoeletrica e eletroforese. Os pesos moleculares e pontos isoeletricos são mostrados na tabela 8.

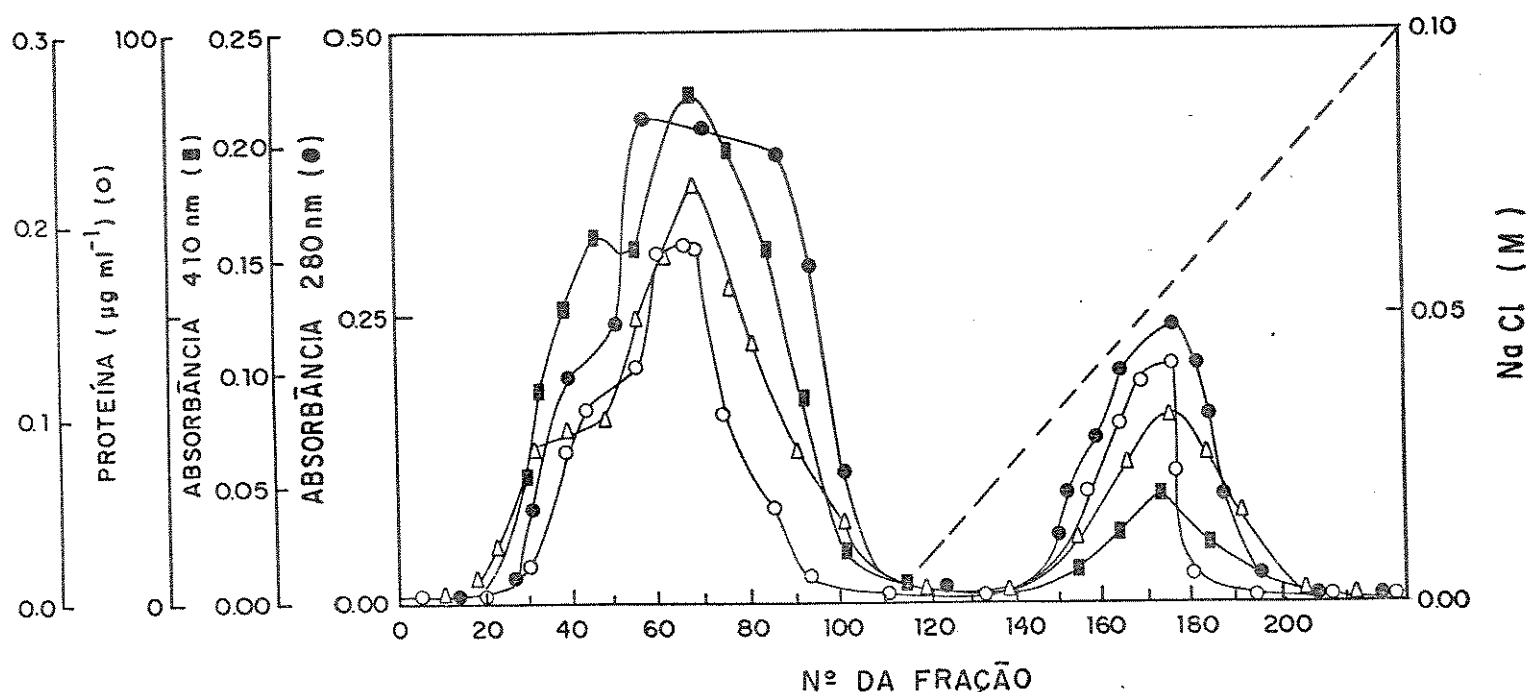


FIGURA 31. Perfil de eluição das ligninases de *C. sitophila* numa coluna de troca iônica DEAE-Sephadex (ver 2.14). As frações foram analisadas para a oxidação do álcool veratrílico ao aldeído (ligninase) e proteínas.

A principal enzima encontrada (abundância relativa) foi LiP-Cs II e seu espectro de absorção é mostrado na figura 32. A adição de 1-1,5 equivalentes de H_2O_2 à enzima, resulta num decréscimo da absorção a 400 nm e a posterior adição de fenol (0,5-1,0 equivalentes) desloca o máximo para 417 nm, sugerindo que esta apresenta um ciclo catalítico semelhante ao de peroxidase de raiz forte (HRP) e ao de lignina peroxidase de *P. chrysosporium* (Gold e col., 1989). A presença de um grupo heme foi confirmada pelo método hemocromo da piridina. Baseado na absorbância hemocromogênica da piridina a 557 nm, foram determinados os grupos heme por molécula de proteína (Tabela 6). A concentração ótima de H_2O_2 pa-

ra a atividade das enzimas oxidando álcool veratrílico foi 0,1 mM, que é próximo ao valor determinado para ligninase de P. chrysosporium, 0,15 mM.

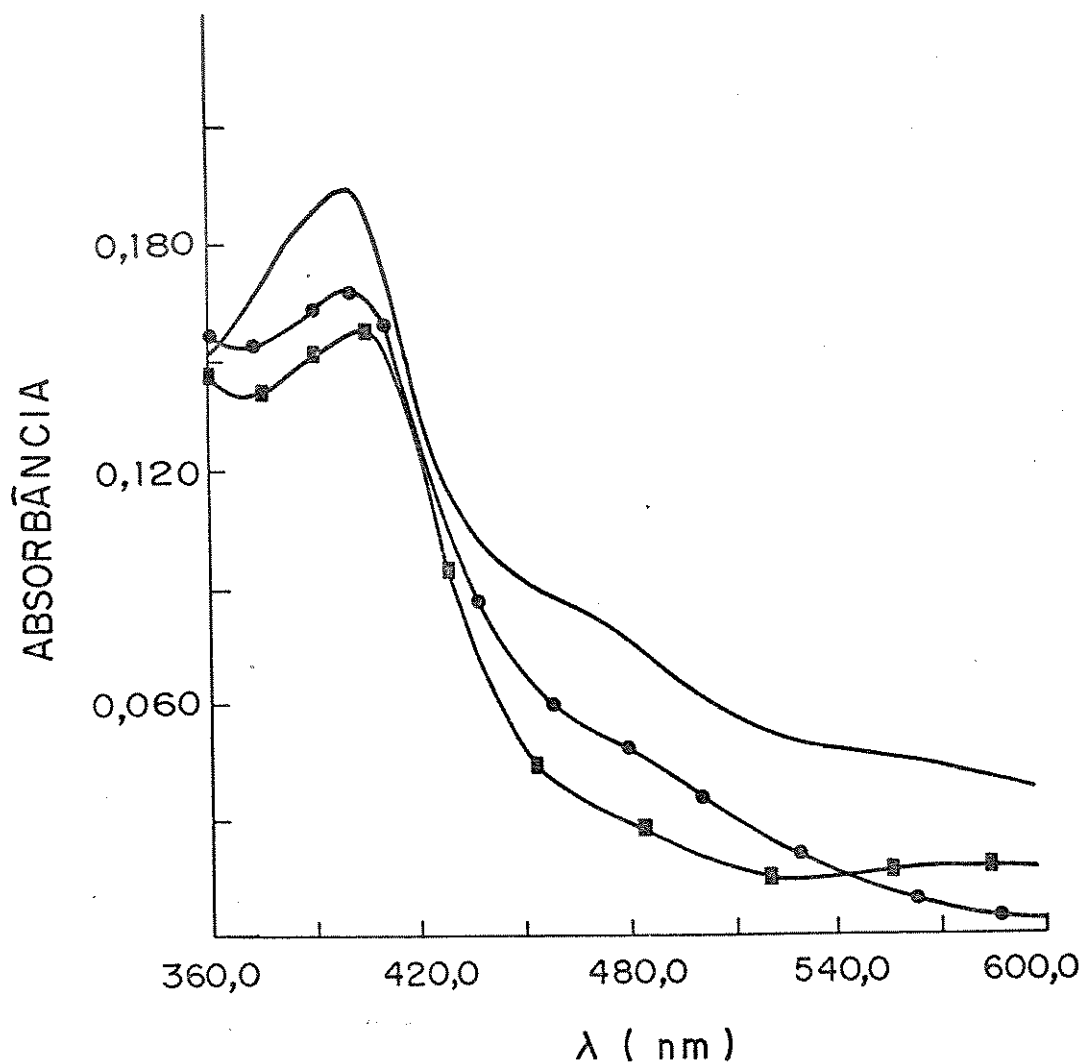


FIGURA 32. Espectro de absorção de LpCs II. (—) Enzima nativa, (---●---) Após adição de 1,5 equivalentes de H₂O₂ e (---■---) após adição de 1,5 equivalentes de H₂O₂ e 1,0 equivalentes de fenol. Todos os espectros foram realizados em tampão tartarato de sódio 0,1 M pH 4,5.

TABELA 6. CARATERISTICAS DAS LIGNINASES DE C. sitophila

	LiP-Cs I	LiP-Cs II	LiP-Cs III
Percentagem*	33 %	62 %	5 %
Ponto Isoelétrico	9,1	6,7	4,5
Peso Molecular (Da)	68.000	50.200	47.500
Fe/Heme	0,8	1,3	1,2
pH ótimo	3,0	5,0	4,0
Atividade específica [@]	6,0	4,4	9,1
K _m ap. álcool V. mM	0,37	0,30	0,12
V _{max} álcool V. nmol/min ml	9,09	8,30	2,50
K _m ap. H ₂ O ₂ μM	50	37	33
V _{max} H ₂ O ₂ nmol/min ml	6,67	7,20	4,80
H ₂ O ₂ ótimo (mM)	0,1	0,1	0,1
% de carboidrato	25,7	14,8	17,4

(*) Area sob a curva a 410 nm.

(@) Atividade específica na oxidação de álcool veratrílico para aldeído em nmol x min⁻¹ x mg⁻¹.

Algumas semelhanças foram encontradas entre as ligninases de C. sitophila e as de P. chrysosporium e P. radiata. Estas são glicoproteínas e têm pesos moleculares de mesma magnitude (48 KDa LpCs II; 42 KDa LiP de P. chrysosporium; 42-45 KDa de P. radiata). Estas enzimas diferem por não terem sido retidas pela coluna de troca iônica usada para separar as ligninases de P. chrysosporium (Tien e Kirk, 1984).

3.5 CULTIVOS EM BIORREATOR.

Cultivos de C. sitophila foram realizados num biorreator de 15 l. Diferentes condições foram experimentadas variando a velocidade de agitação, fluxo de ar e pH. Os parâmetros iniciais fixados para estas experiências, foram escolhidos de maneira um tanto aleatória, visando principalmente na primeira etapa, avaliar o comportamento de C. sitophila quando cultivado em biorreator. Os resultados obtidos são mostrados na tabela 7.

TABELA 7. Produção de ligninase por C. sitophila em biorreator: variação de alguns parâmetros.

	AGITAÇÃO	FLUXO AR	pH		TEMPO PARA	LIGNINASE
	rpm	l/min	máximo	mínimo	GLICOSE < 0,1 g/l	U/L
1	100	2,5	3,0(96h)	4,6(120h)	/	n.d.
2	100	Pulsado*	5,0(60h)	6,0(96h)	/	n.d.
3	100	Pulsado	3,3(42h)	6,5(96h)	/	20 (96h)
4	20	5,0	4,5(27h)	8,8(138h)	50 h	250 (140h)
5	20	5,0	ajustado a 6,0		65 h	107 (110h)
6	20	5,0	ajustado a 3,4		45 h	19 (180h)
7	20	10,0	3,0(48h)	6,1(177h)	n.d.	6 (144h)

(*) Pulsado: Foi borbulhado ar, até saturação de oxigênio, cada vez que este caiu para zero (ver 2.11).

Na tabela 7, podemos ver que as melhores condições, entre as experimentadas, foram as da batelada 4. Repetidas bateladas nes-

tas condições deram resultados semelhantes.

Na figura 33 é mostrado em detalhe o andamento da cultura no biorreator. Glicose é totalmente consumida às 50 horas o que coincide com o aumento do oxigênio dissolvido. O pH inicial (6,0) cai nas primeiras 24 horas até 4,5 e posteriormente aumenta em forma constante até pH 8,8. A queda do oxigênio dissolvido entre 90 e 116 horas, pode ser atribuída à adesão de micélio sobre o eletrodo ou ao consumo de oxigênio pelo microorganismo, coincidindo com o aumento da produção de ligninase, o que tem sido observado com certa frequência.

A produção de ligninases foi detectada a partir das 16 horas de cultivo (5,0 U/L) chegando até 250 U/l no fim da cultura.

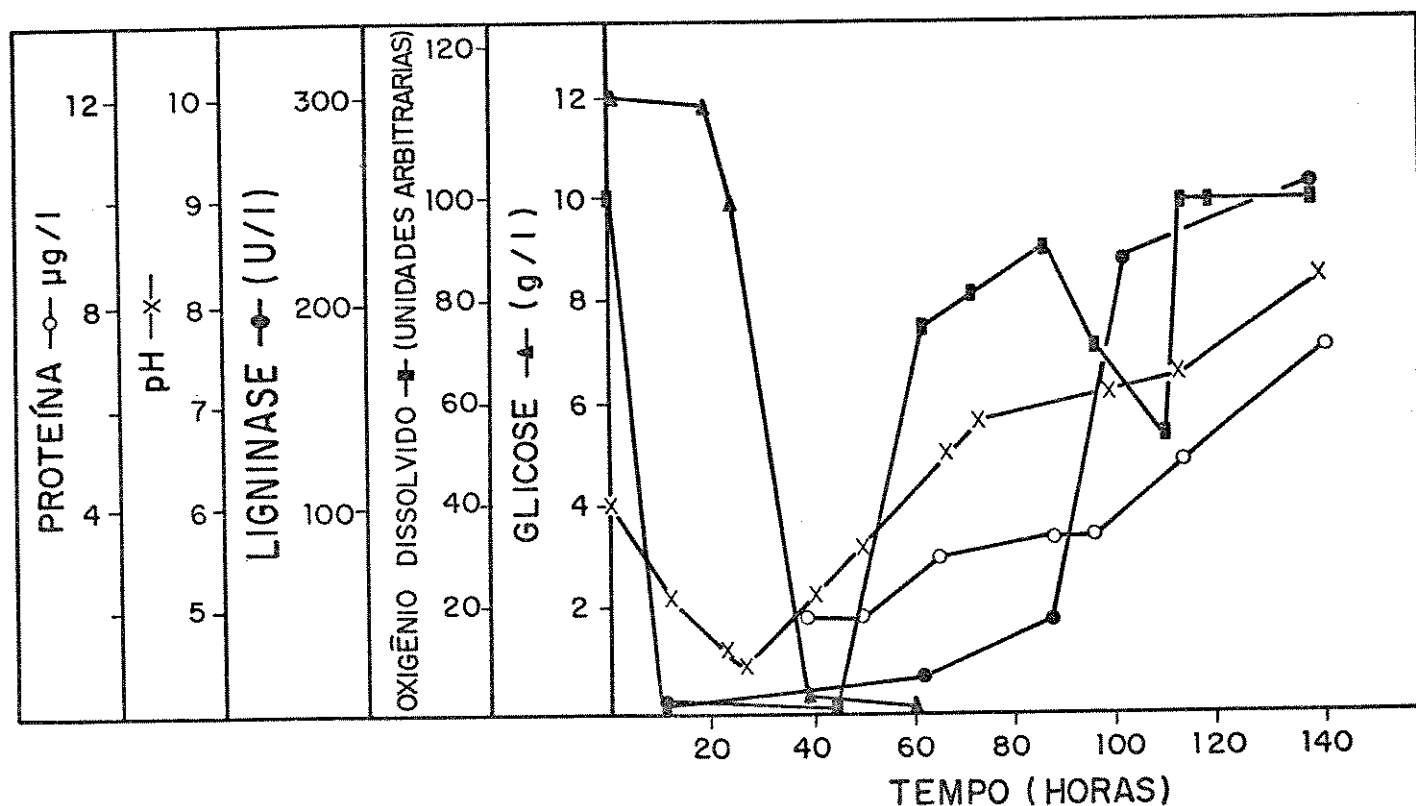


FIGURA 33. Comportamento da cultura de C. sitophila em biorreator, na condição 4 da tabela 7.

A medida da atividade ligninase apresentou um inusitado problema. Foi detectada queda da absorbância do branco (tampão tartrato + caldo de cultivo + peróxido de hidrogênio) durante o ensaio de atividade ligninase, como mostrado na figura 34-B. Considerando que o peróxido estava sendo consumido, usamos concentrações maiores de H_2O_2 para medir atividade ligninase como mostrado na figura 35, na qual podemos também observar as cinéticas de oxidação para diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio.

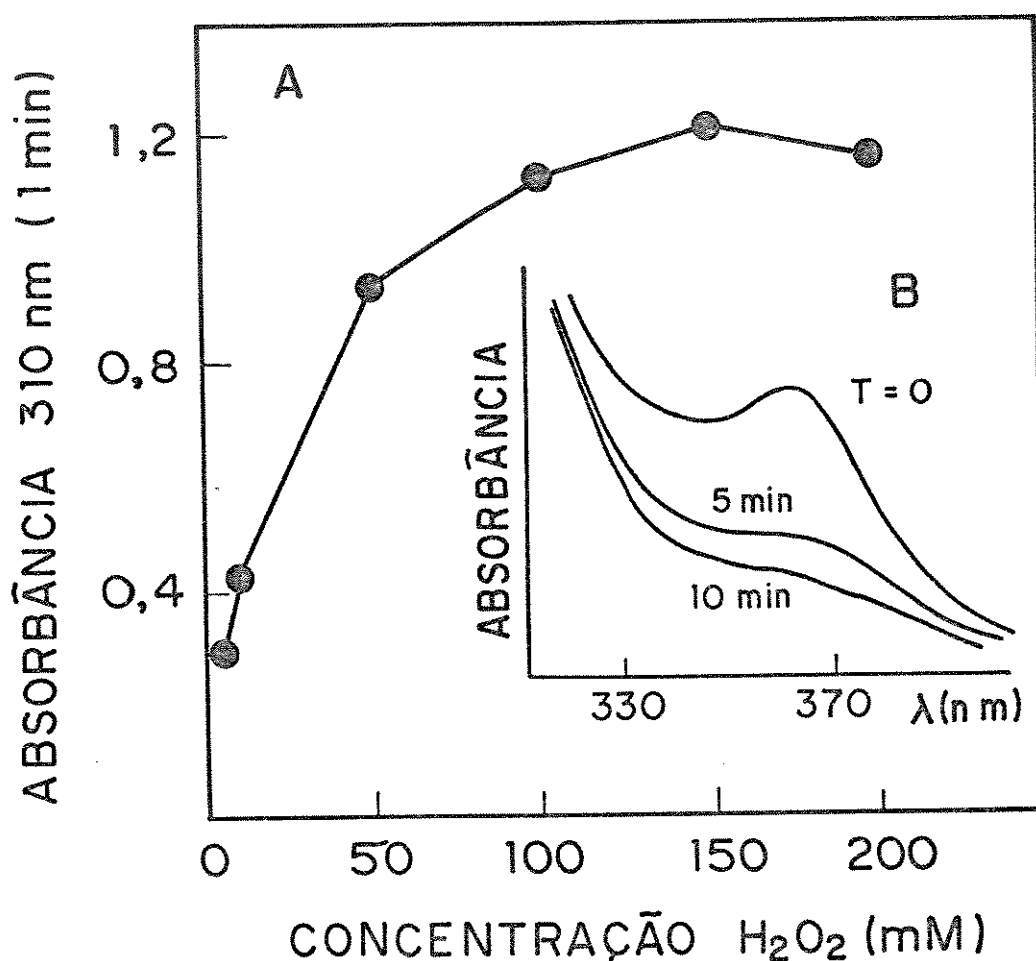


FIGURA 34. A: Oxidação de álcool veratrílico pelo meio extracelular de *C. sitophila* em diferentes concentrações de H_2O_2 . B: Diminuição da absorbância do caldo na presença de H_2O_2 150 mM. A concentração de peróxido foi verificada pela absorbância a 230 nm ($\epsilon = 72,4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) da solução estoque.

Como a concentração ótima de peróxido para a medida de atividade ligninase muda com a idade da cultura analisada, foram necessárias três diferentes concentrações de peróxido para cada ponto monitorado. Observamos que existe uma concentração ótima após a qual a atividade começa a diminuir (figura 34-A). Os controles realizados indicaram que H_2O_2 não atua diretamente sobre o álcool veratrílico nestas condições.

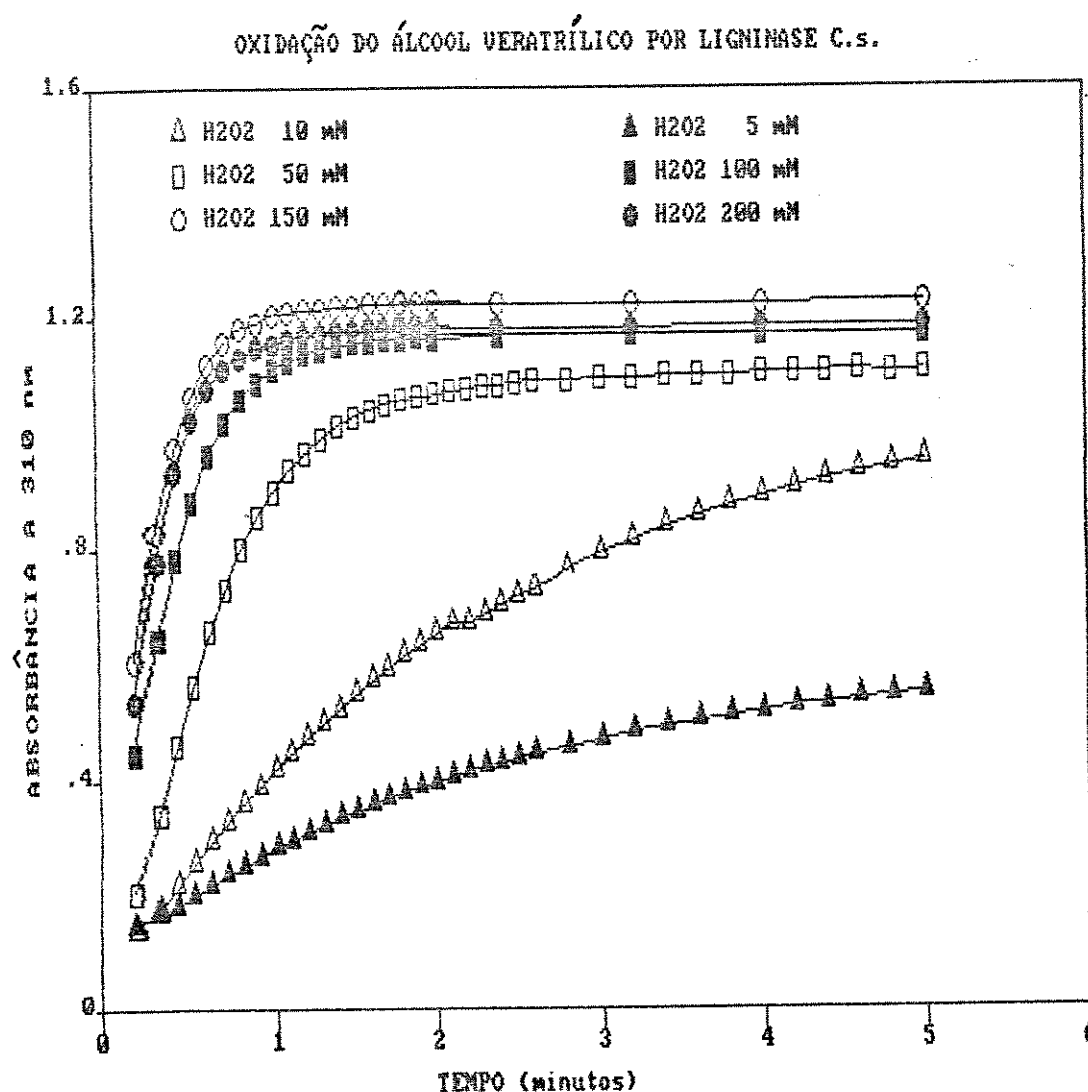


FIGURA 35. Cinética da oxidação de álcool veratrílico ao aldeído, pelo meio extracelular de C. sitophila, em diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio.

As tentativas para determinar a natureza da diminuição da absorbância a 360 nm e a relação deste fenômeno com a atividade ligninase foram mal sucedidos.

Suspeitou-se da presença no meio extracelular de C. sitophila de peptídeos transportadores de ferro (chamados de sideróforos) já encontrados no meio extracelular de N. crassa os que eventualmente poderiam reagir com H_2O_2 . A metodologia já descrita (Wong e col., 1983) foi adaptada para separá-los dos caldos de cultivos. Na figura 39 é mostrada a separação destes compostos numa coluna de sephadex LH-20.

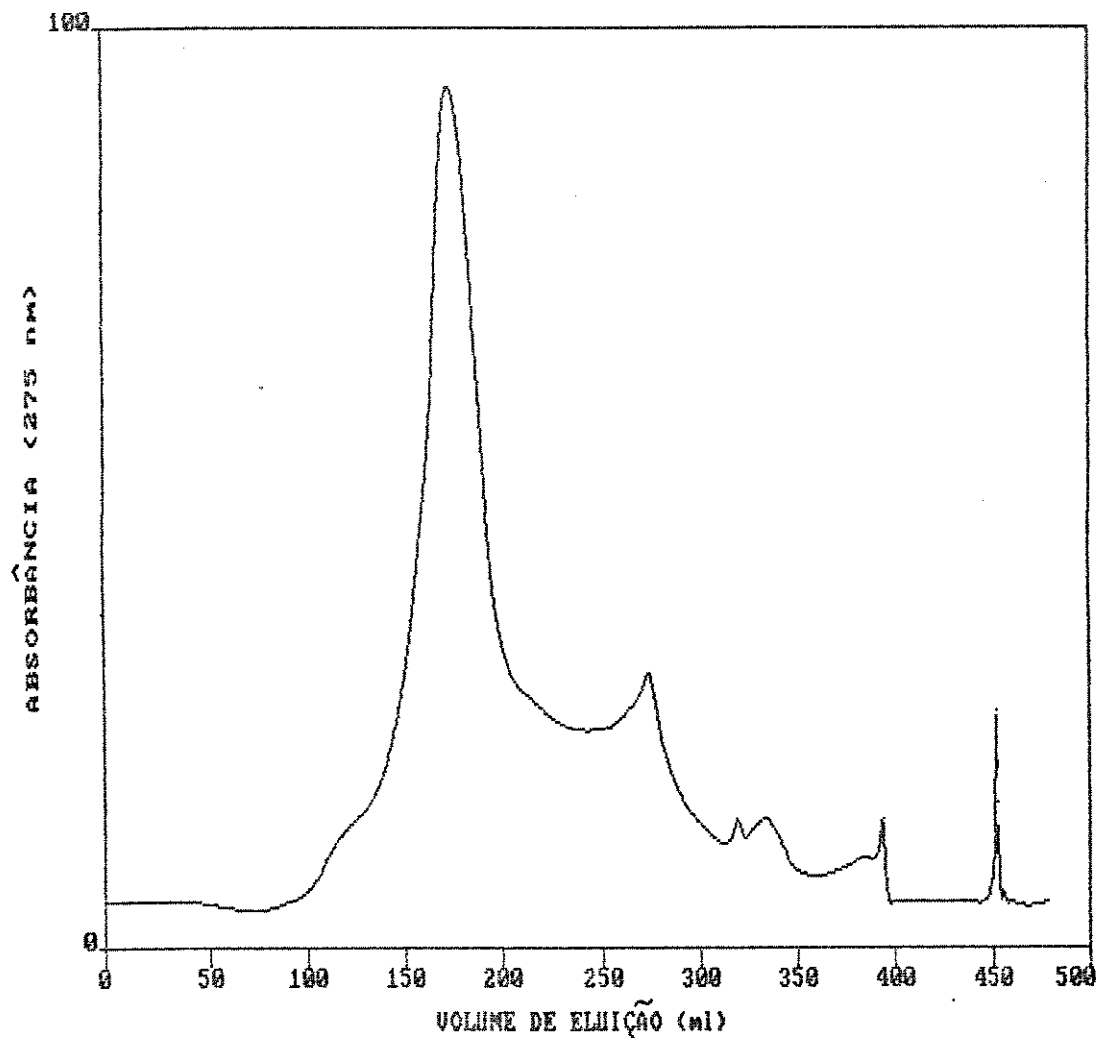


FIGURA 36. Separação de compostos do caldo de cultivo em Sephadex LH-20, fase móvel: metanol; amostra aplicada: 0,715mg (ver 2.20).

Sete compostos foram obtidos, mas nenhum reagiu com peróxido de hidrogênio nem com peróxido mais álcool veratrílico. Na tabela 8 são mostradas as características de absorção UV destes compostos. A maior caracterização deles pode ser objeto de um trabalho centrado neste objetivo.

TABELA 8. Características UV dos compostos obtidos a partir do caldo de cultivo.

Nº da fração	λ máximo	ombro
1	225	261
2	236/427	/
3	236	261
4	212	403
5	234	270
6	239/298	/
7	212/222	/

O alto requerimento de H_2O_2 do caldo extracelular para oxidar álcool veratrílico a aldeído é um fato inusitado e este não pôde até agora ser resolvido. Isto abre uma área de pesquisa muito interessante e no momento é objeto de outra tese de doutorado.

3.6 BIOSÍNTESE E DEGRADAÇÃO DE ÁLCOOL VERATRÍLICO PELO MEIO EXTRACELULAR DE C. SITOPHILA.

3.6.1 Biossíntese de álcool veratrílico

No extrato-CH₂Cl₂ proveniente dos caldos obtidos no biorreator foram detectados dois compostos por HPLC (figura 37). Um deles, com tempo de retenção de 5,6 min, foi identificado como álcool veratrílico por comparação dos tempos de retenção em coluna de fase reversa C₁₈, usando acetonitrila:água / (1:4) e metanol:água / (1:10) como fases móveis, por co-injeção com amostra padrão e pelo espectro de absorbância UV (figuras 37-38). O outro composto, com tempo de retenção de 14,7 min, apresentou o mesmo tempo de retenção que o aldeído veratrílico por comparação (Figura 37-38) e por co-injeção, usando os mesmos sistemas de solventes acima mencionados. Considerando que alguma diferença pode ser observada nos espectros de absorbância UV deste último composto, a identidade permaneceu desconhecida.

A importância do álcool veratrílico na produção de ligninase e na biodegradação de lignina foi demonstrada por vários pesquisadores (ver 1.3.1). Da mesma maneira que não existem outros informes de ligninases em ascomicetos além do caso por nós descoberto, esta é primeira vez que é relatada a biossíntese de álcool veratrílico por um ascomiceto. Isto sugere que a produção do álcool veratrílico possa ser um fenômeno associado à produção de lignina-peroxidases, sejam estes fungos basidiomicetos ou ascomicetos.

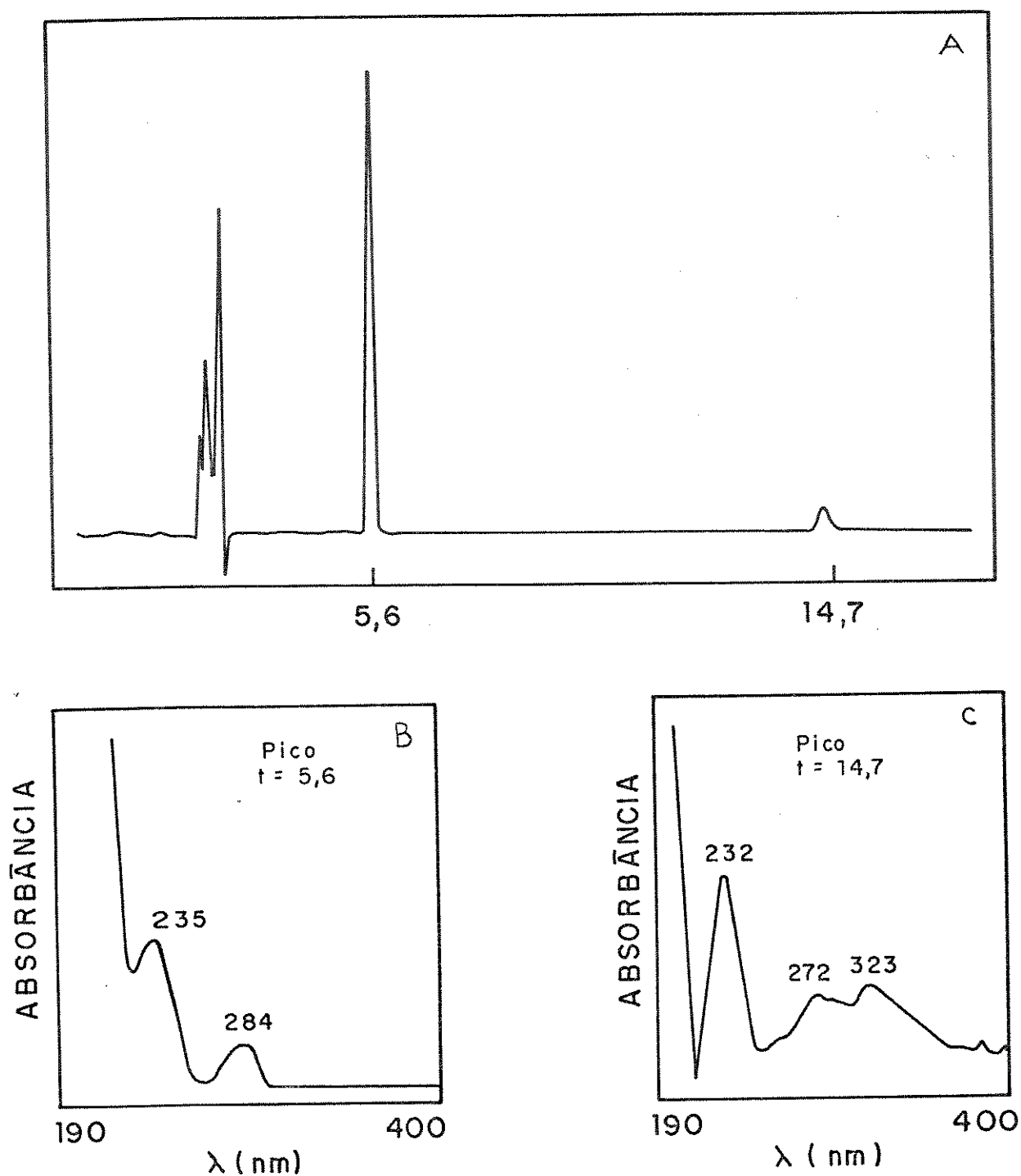


FIGURA 37. A: HPLC dos compostos extraídos com diclorometano do caldo de cultivo de C. sitophila. Coluna C₁₈, fase móvel acetonitrila:água (1:4). B: Espectro de absorção UV do composto com tempo de retenção 5,6 min. C: Espectro de absorção UV do composto com tempo de retenção 14,7 min.

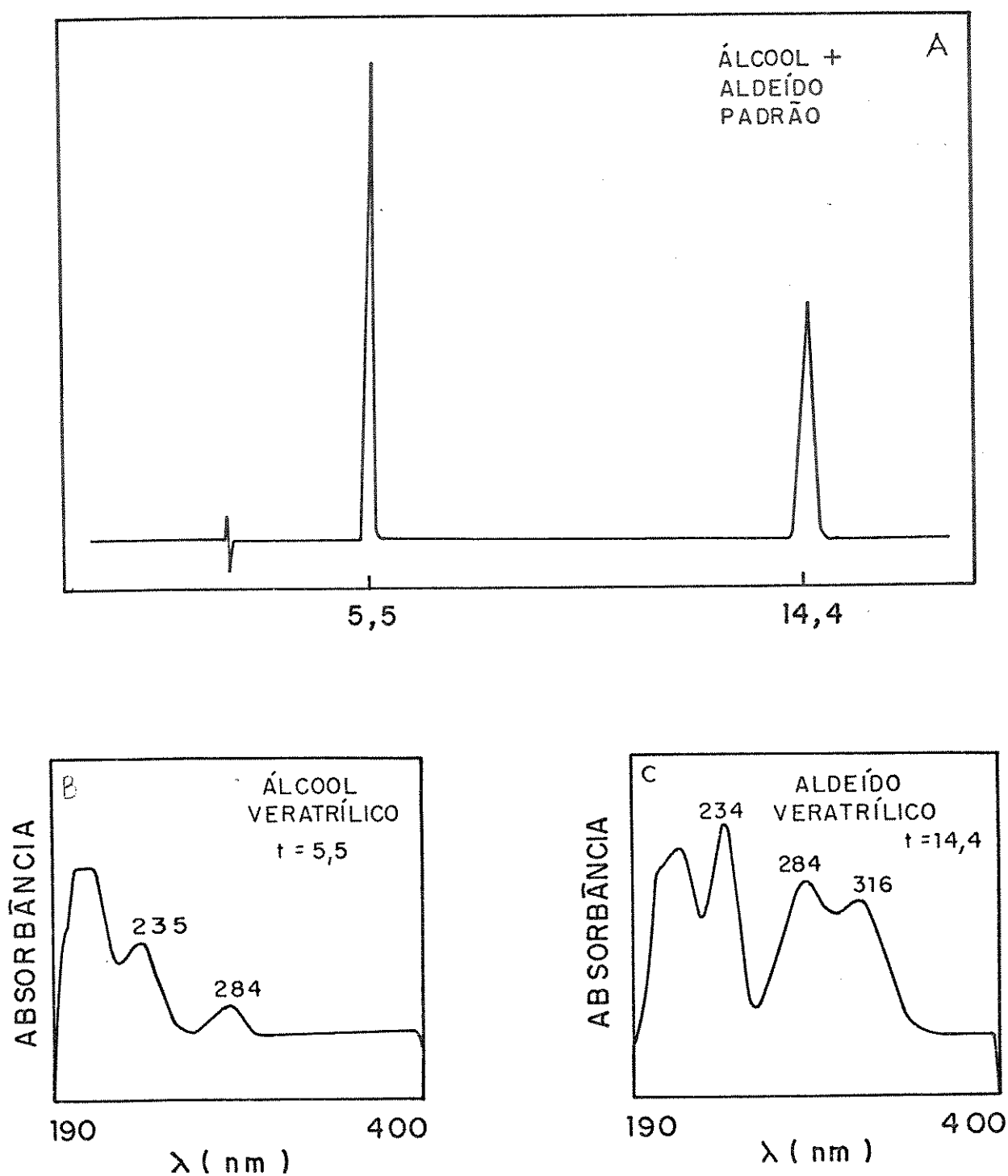


FIGURA 38 A: HPLC dos padrões álcool e aldeído veratrílico. Coluna C_{18} ; fase móvel acetonitrila:água (1:4). B: Espectro de absorção UV do álcool veratrílico. C: Espectro de absorção UV do aldeído veratrílico.

3.6.2 Biodegradação de álcool veratrílico.

Os produtos da biodegradação de álcool veratrílico (tempo de retenção 5,5 min, figura 38 A); na presença de H_2O_2 pelo meio extracelular de C. sitophila obtido em biorreator, foram estudados por HPLC (figura 39). O principal produto obtido foi aldeído veratrílico (tempo de retenção 14,4 min). Outros picos foram observados e seus espectros de absorção registrados (figuras 40). Estes compostos não apresentaram as bandas de absorção correspondentes às quinonas e lactonas obtidas na degradação de álcool veratrílico por P. chrysosporium, mas foi observada forte coloração amarela no meio de reação após a degradação. É possível que outras enzimas atuem sobre o álcool ou seus produtos de degradação dando diferentes compostos.

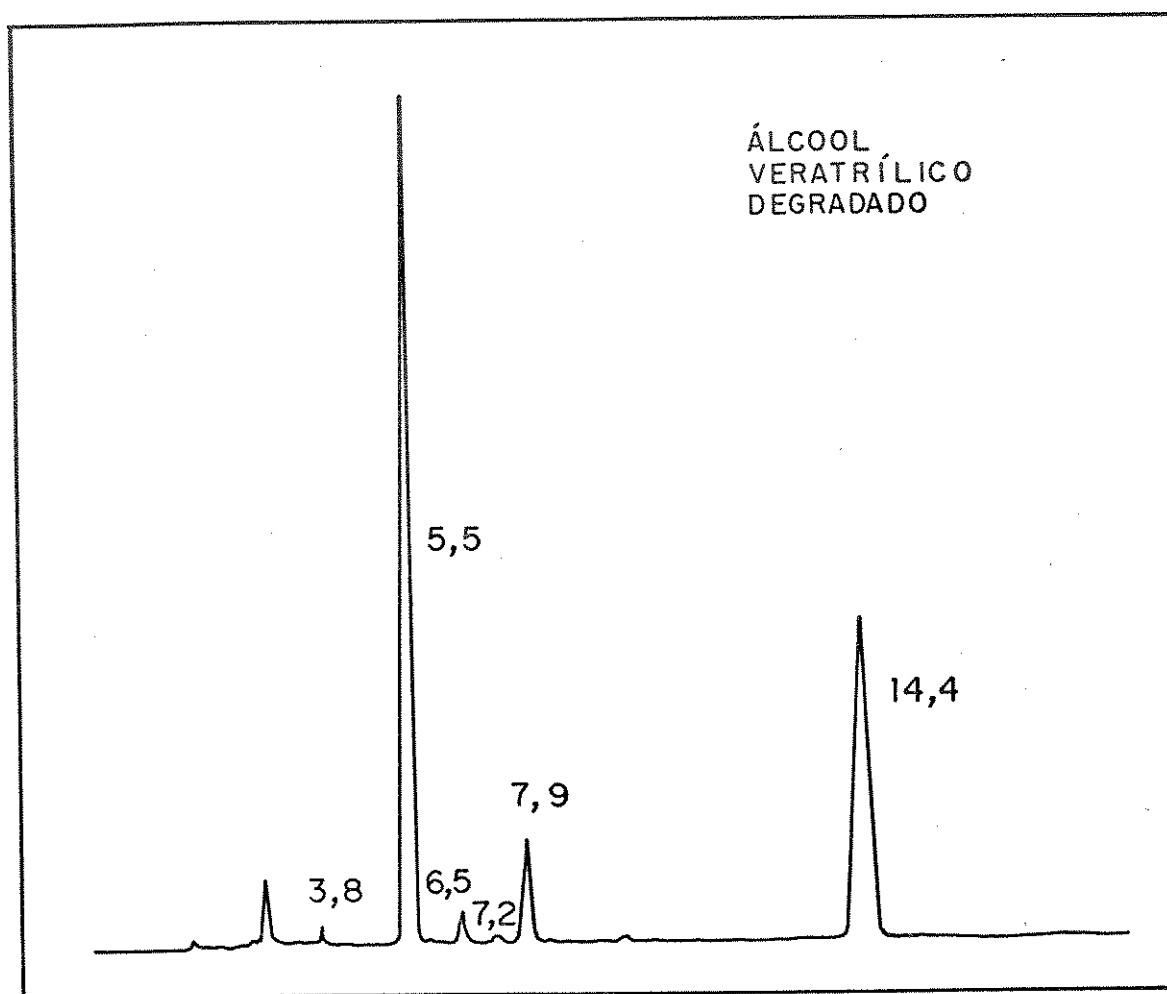


FIGURA 39. HPLC dos produtos da degradação de álcool veratrílico em coluna C₁₈; fase móvel acetonitrila:água (1:4).

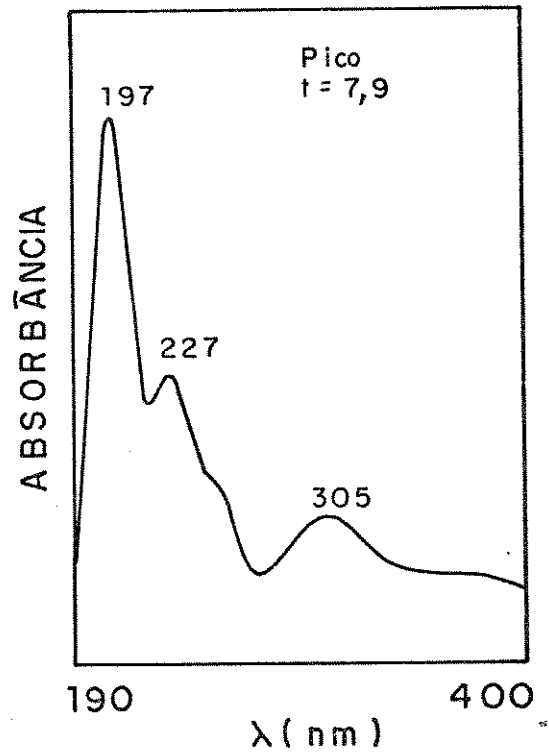
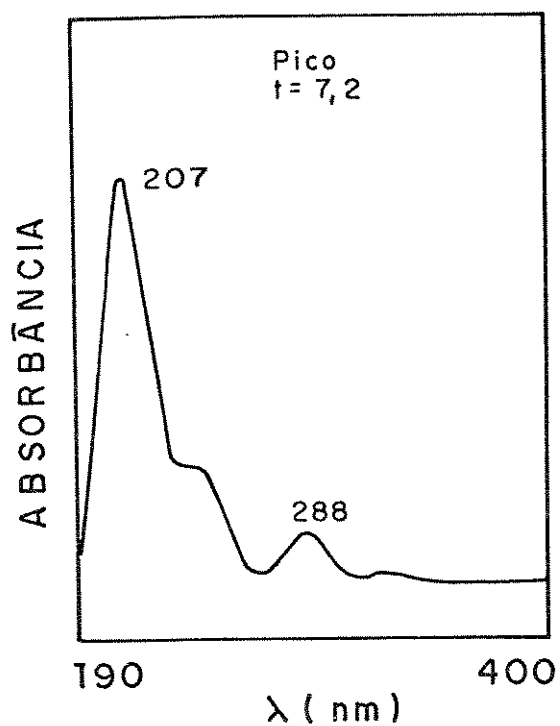
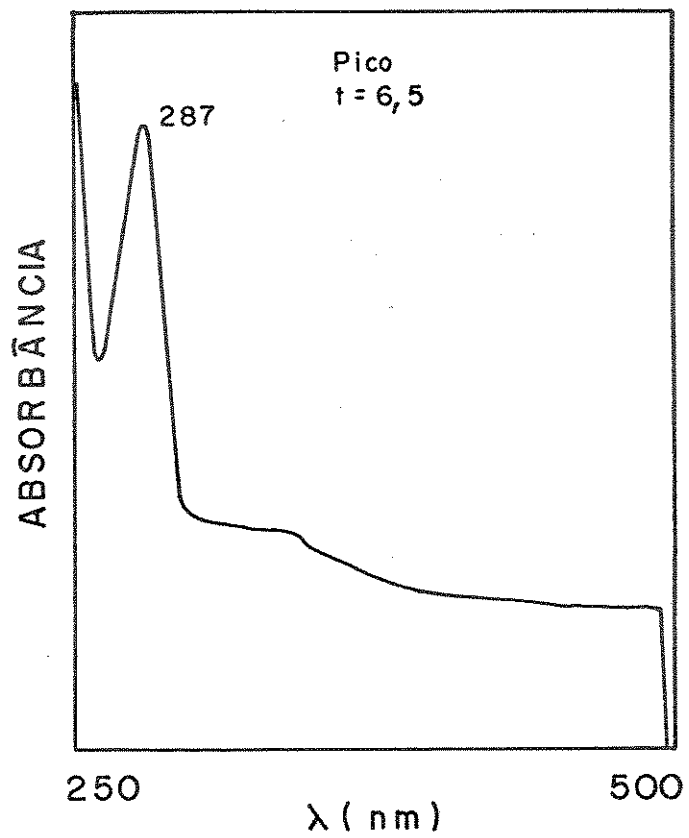
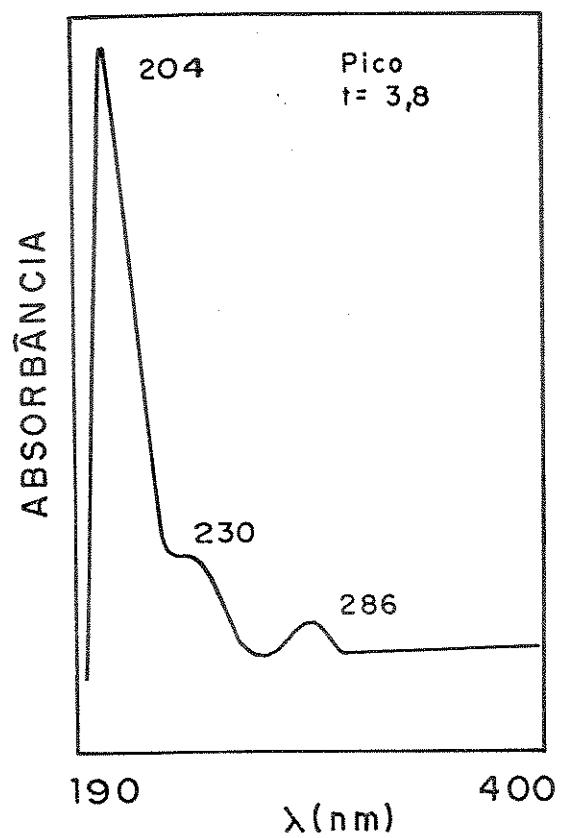


FIGURA 40. Espectros UV dos produtos da degradação do álcool veratrílico detectados por HPLC.

3.7 MEDIDA DA ATIVIDADE LIGNINASE POR QUINILUMINESCÊNCIA.

A atividade ligninase é medida pela oxidação de álcool veratrílico ao correspondente aldeído, que é monitorado a 310 nm e a atividade ligninolítica total de uma cultura é medida pela produção de $^{14}\text{-CO}_2$ a partir de $^{14}\text{-C}$ -lignina.

No intuito de encontrar um método mais geral que o espectrofotométrico e mais simples que aquele com compostos marcados e que possa quantificar as múltiplas enzimas envolvidas na biodegradação de lignina, foi medida a emissão de fótons produzidos na recombinação de compostos radicalares produzidos pelas enzimas de C. sitophila atuando em lignina.

A emissão de fótons de um extrato cru de ligninase atuando em lignina dioxano é mostrado na figura 41. Após 20 segundos esta comportou-se de maneira linear. Este ensaio foi realizado a dois valores de pH e pôde ser observado que a pH 5,0 foi obtida uma maior emissão de fótons, indicando provavelmente, que a LiP-Cs II (pH ótimo 5,0) seja mais ativa sobre lignina.

A atividade ligninase expressa em U/l pôde ser linearmente correlacionada com a emissão de fótons da enzima atuando sobre lignina dioxano, como mostrado na figura 42., indicando que é possível medir a atividade enzimática do caldo atuando diretamente em lignina. Este poderá chegar a ser um método de uso geral para medir a capacidade ligninolítica total de um microorganismo, pela sua simplicidade e por ser capaz de quantificar a ação de todas as enzimas que atuam sobre lignina e que são capazes de gerar radicais.

Sugere-se o teste deste novo método com outros caldos enzimáticos, provenientes de outros microorganismos

ligninolíticos conhecidos, a fim de mostrar sua aplicabilidade geral.

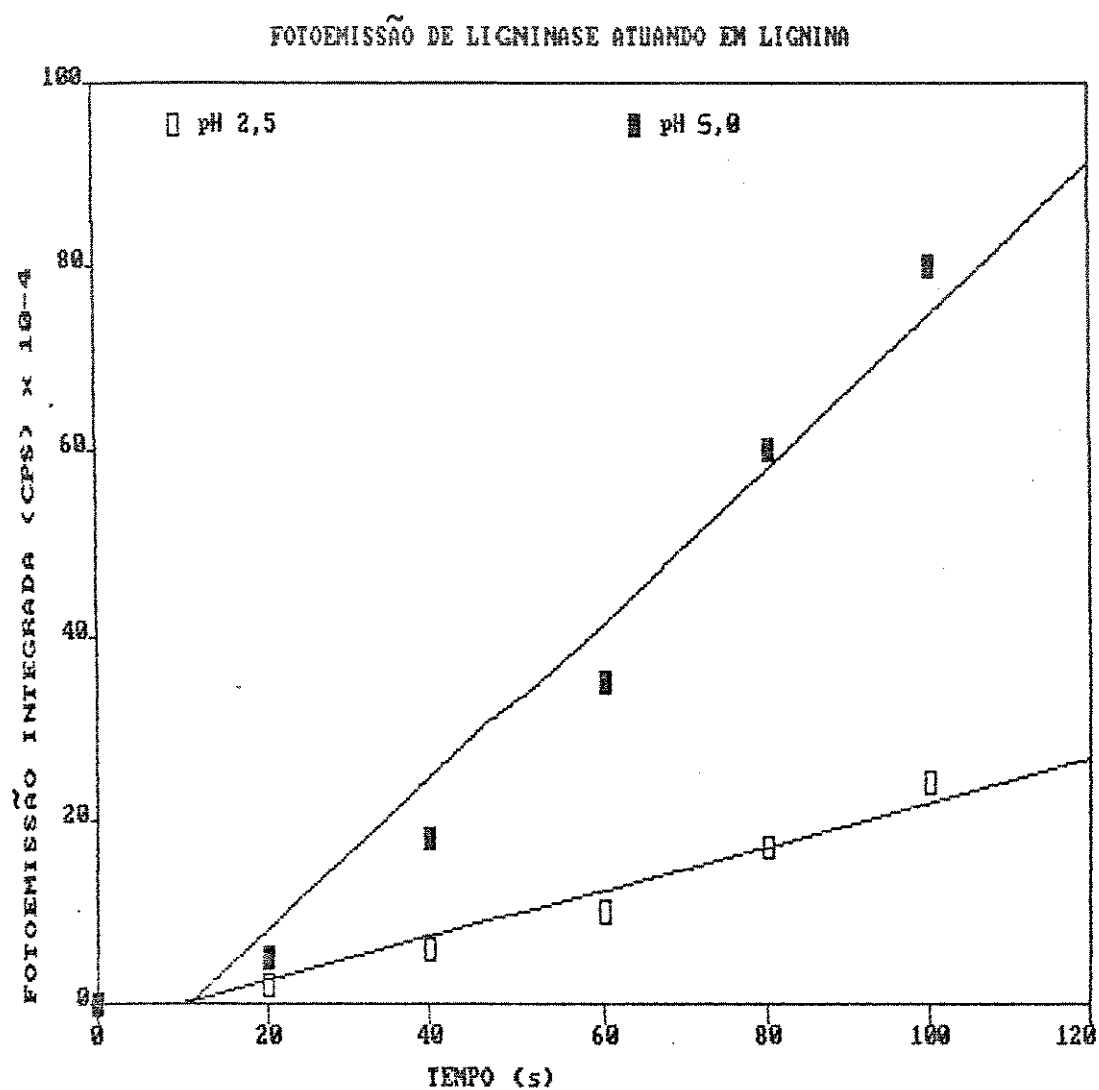


FIGURA 41. Emissão de fótons de um extrato cru de C. sitophila atuando sobre lignina dioxano em dois diferentes pH (ver 2.7).

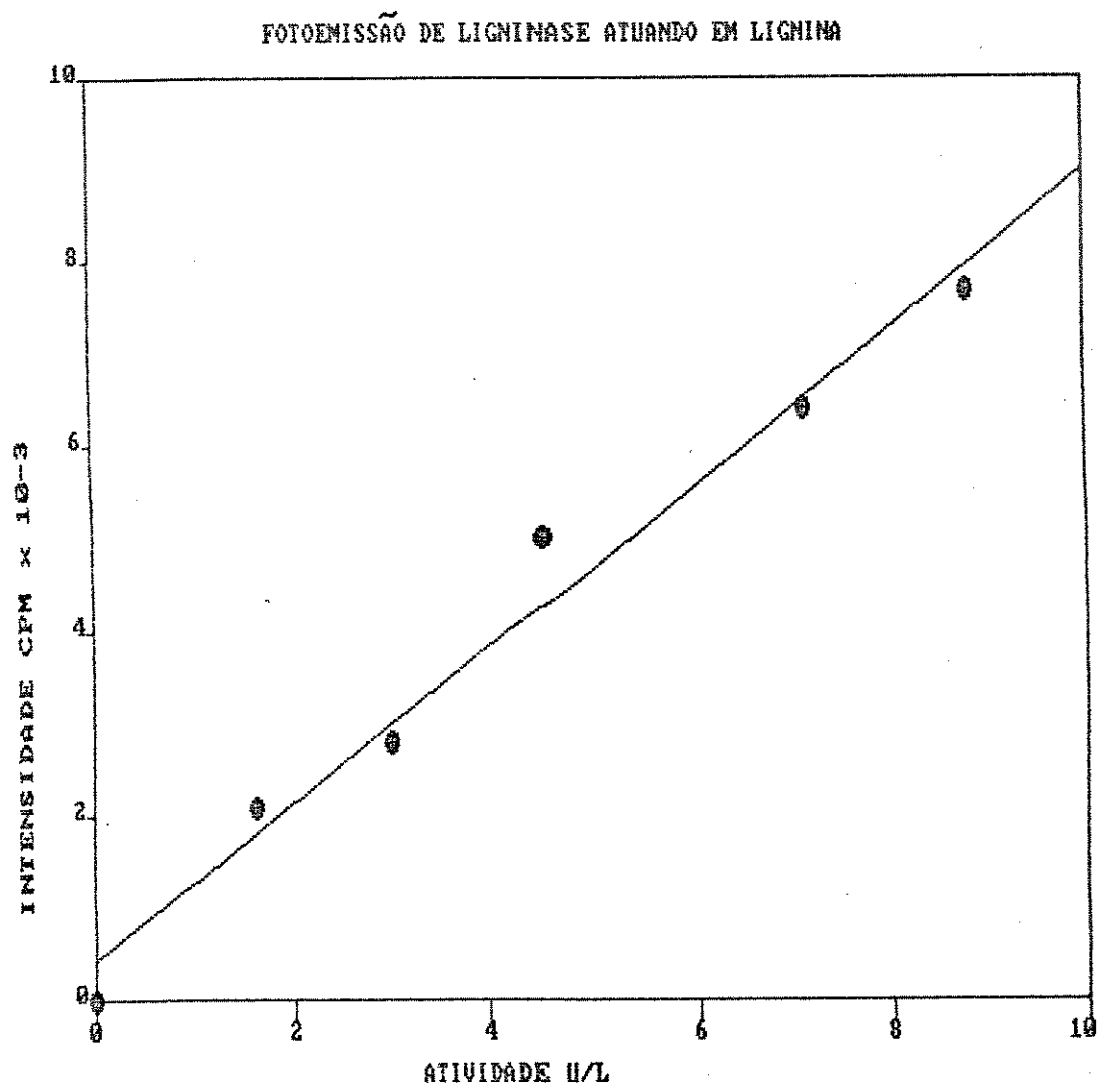


FIGURA 42. Correlação entre a atividade ligninolítica e a emissão de fótons das ligninases de C. Sitophila atuando sobre lignina dioxano (ver 2.7).

3.8 TRATAMENTO COMBINADO FOTOQUÍMICO MICROBIOLÓGICO DO LIGNOSSULFONATO

Considerando que a fotodegradação de lignina e a biodegradação são processos radicalares, parece interessante comparar os efeitos da fotoirradiação e a biodegradação no LS bem como a combinação destes dois processos. É possível considerar aplicações ao tratamento de efluentes da indústria papaleira num processo que combine estes tratamentos.

Com este fim, foram conduzidas experiências capazes de mostrar o efeito da irradiação fotoquímica nos LS. Estudos da degradação de lignina, celulose, efluentes e outros materiais lignocelulósicos usando luz UV e fungos, foram relatados previamente pelo nosso grupo (Durán e col. 1988 b,c).

As irradiações do LS foram realizadas em solução aquosa contendo 0,1 % de LS, amostras foram analisadas no intervalo de 3 a 12 horas. As seguintes características foram estudadas: absorbância, fluorescência e quimiluminescência. Estas técnicas são comumente usadas para estudar mudanças nas ligninas fotoirradiadas (Mansilla, 1986) e evidenciam o aumento ou diminuição de grupos funcionais.

Na figura 43 pode-se observar a diminuição da absorbância em 280 nm, o que pode ser interpretado como proveniente da perda de aromaticidade do polímero ou desaparecimento de duplas ligações e carbonilas conjugadas com anéis aromáticos (Mansilla, 1986).

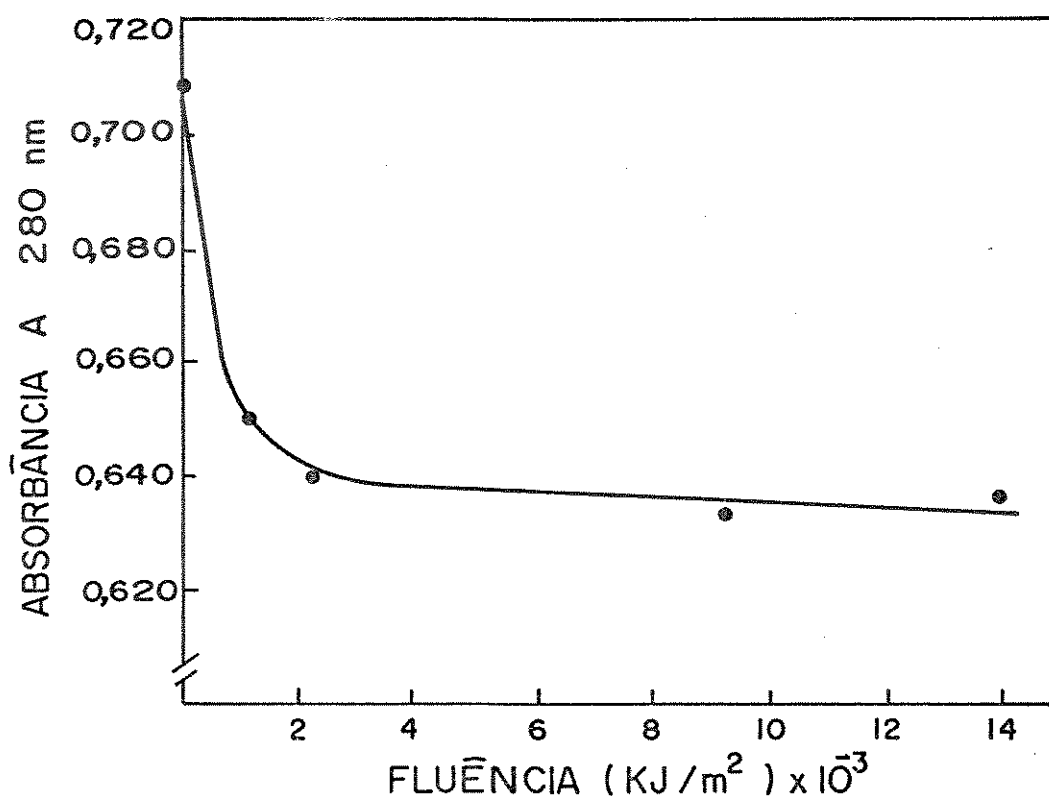


FIGURA 43. Absorbância da solução de LS fotoirradiado (0,1 % diluído 10 vezes) Vs a fluência de irradiação (ver 2.24).

O espectro de fluorescência dos LS evidencia a presença de estruturas de tipo estilbeno (Lundquist e col., 1981) onde a diminuição de fluorescência (figura 44) pode ser atribuída à quebra destas estruturas (possivelmente à quebra de duplas ligações).

A reação de autooxidação em meio básico do LS, apresenta quimiluminescência com uma cinética característica (figura 45-A). Na figura 45-B pode ser observado o aumento da quimiluminescência com o tempo de irradiação. Foi demonstrado por Mansilla (1986) que esta técnica é adequada para encontrar o tempo de irradiação onde ocorrem as maiores modificações em ligninas, quem também discutiu em detalhes os mecanismos de reação envolvidos neste fenômeno.

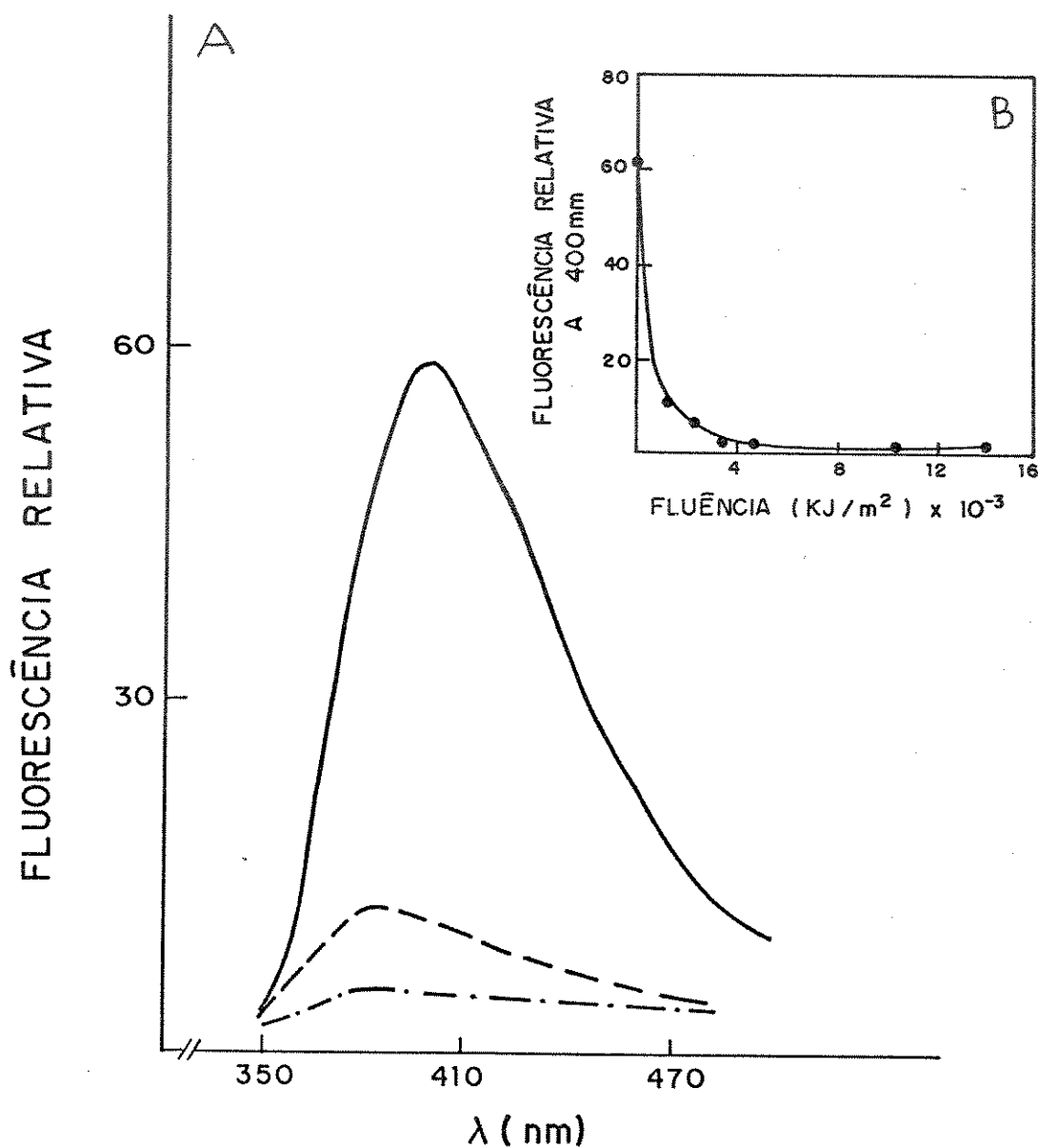


FIGURA 44. Fluorescência da solução de LS fotoirradiado (0,1 % diluído 10 vezes). A: Espectros das amostras (—) não irradiada, (---) após 3 horas de irradiação e (-·-·-) após 36 horas de irradiação. λ de exc. = 335 nm. A: cinética de decaimento Vs a fluência de irradiação. λ de exc. = 335 nm, λ de emiss. = 400 nm. (ver 2.24).

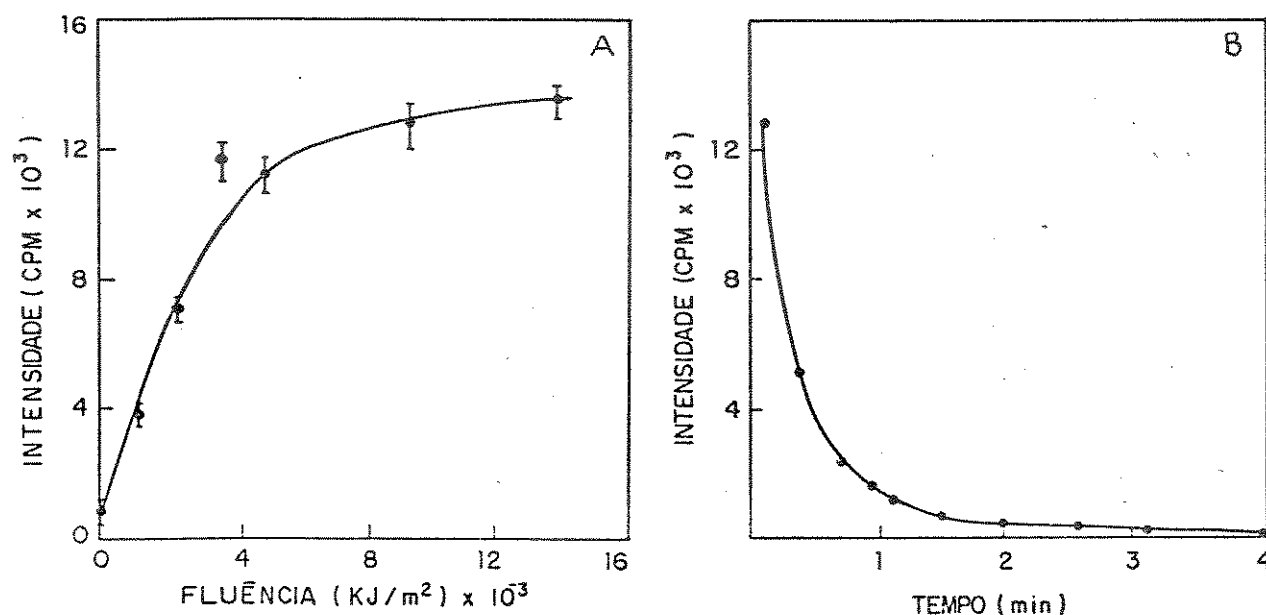


FIGURA 45. Quimiluminescência em meio básico da solução de LS fotoirradiado (conc. 0,1 %). A: Intensidade da quimiluminescência após 0,3 minutos da adição de NaOH Vs a fluência de irradiação. B: Cinética de decaimento da quimiluminescência após adição de NaOH. (ver 2.24).

Para o estudo combinado fotoquímico-microbiológico escolhemos o tempo para o tratamento fotoquímico de 3 horas (fluência = 1,2 KJ/m² $\times 10^3$). Isto foi feito considerando as máximas modificações no menor tempo de irradiação.

O LS irradiado foi posteriormente biodegradado por 12 dias. A absorbância em 280 nm, 420 nm e a razão entre elas, conhecida como coeficiente de coloração (Slawinska e col., 1979) varia como mostrado na tabela 9.

TABELA 9. ABSORBANCIA DO LIGNOSSULFONATO (0,1 %) SUBMETIDO A DIFERENTES TRATAMENTOS E SUA RELAÇÃO COM O COEFICIENTE DE COLORAÇÃO. (Irradiação 3 h, $f=1,2 \text{ Kj/m}^2$, biodegradação por 12 dias). (ver 2.21, 2.24)

	*ABS (280 nm)!	ABS (420 nm)!	ABS (280)/ABS (420)!
NMO IRRADIADO	0,729	0,172	42,4
IRRADIADO	0,669	0,239	28,0
NMO IRR. BIOD.	$0,686 \pm 0,011$	$0,218 \pm 0,004$	$31,5 \pm 0,06$
IRR. BIODEGR.	$0,519 \pm 0,011$	$0,319 \pm 0,028$	$16,2 \pm 1,1$

* Diluído 10 vezes.

A razão $\text{ABS (280)} / \text{ABS (420)}$ conhecida como coeficiente de coloração é usada para medir as oxidações de polifenóis (Slawinska e col., 1979). Segundo descrito por Slawinska e col. (1979) e por Durán e col. (1984), trabalhando com taninos e com lignina dioxano (Durán e col., 1988d,) quanto maior o valor do coeficiente, menos polimerizado está o polifenol. Nos dois casos anteriormente citados existe, nas repolimerizações dos polifenóis, um aumento da absorbância tanto a 278 nm como a 420, sendo esta última a uma velocidade maior que a primeira. Em nosso caso observamos uma diminuição desta razão no LS irradiado e biodegradado devido à queda da absorbância a 280 nm e um aumento em 420 nm, contrariando as permeações em gel que mostraram a despolimerização dos LS.

Estes resultados indicam que a relação 280 /420 nm, não está relacionada somente ao grau de polimerização, mas também ligado à perda de aromaticidade (280 nm) e à formação de quinonas (420 nm)

no polímero.

Nos diferentes tratamentos, a fluorescência diminui após os tratamentos fotoquímico e biológico (figura 46). Quando estes processos são combinados, esta não diminui para níveis inferiores aos já alcançados, logo não existe efeito sinérgico.

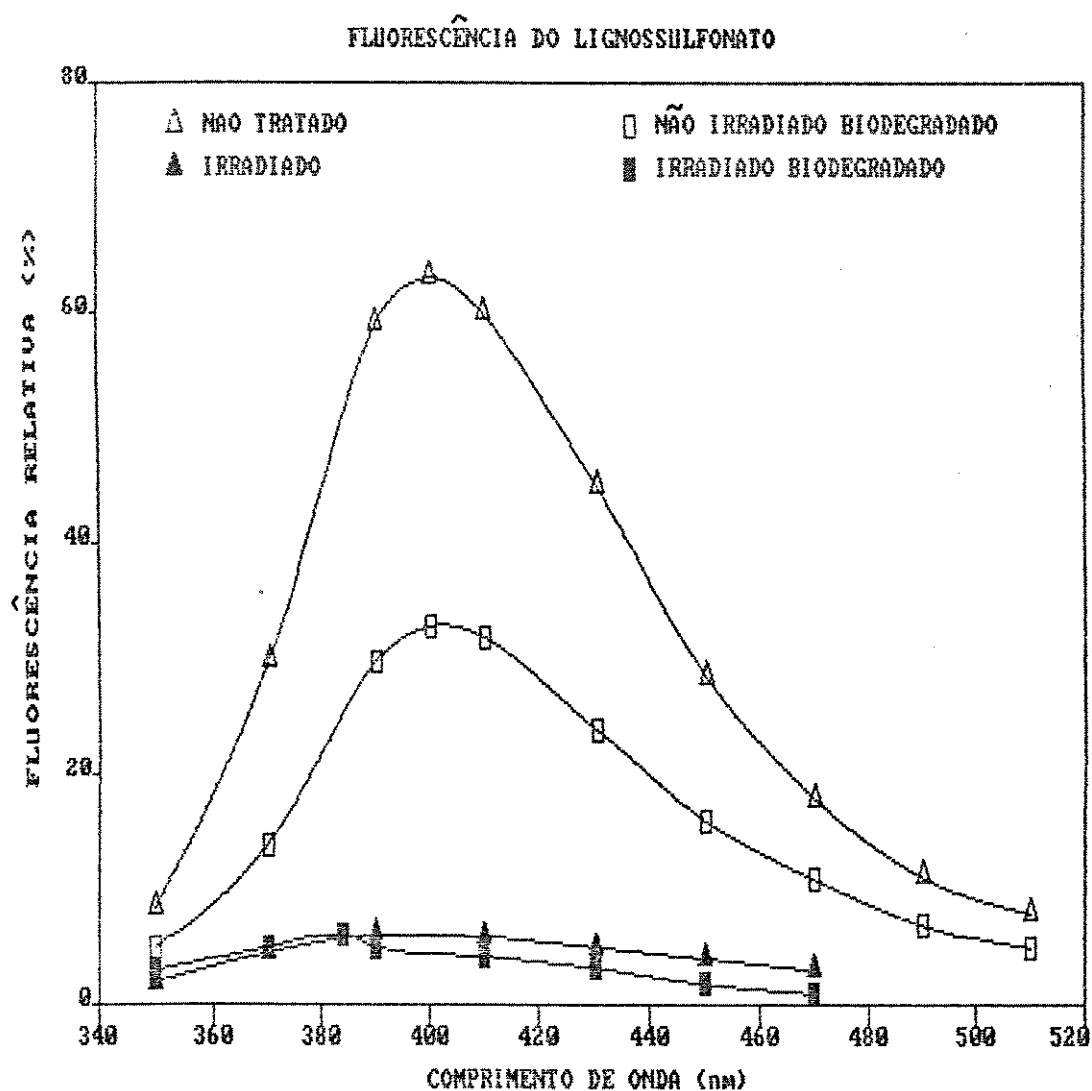


FIGURA 46. Fluorescência de lignossulfonatos submetidos a diferentes tratamentos. Irradiação por 3 horas (ver 2.24) e a biodegradação por 12 dias (ver 2.21).

A irradiação dos LS por 3 horas, produz uma queda da fração de maior peso molecular (acima de 23.000) e um aumento não localizado de pesos moleculares menores (figura 47-A). Após a biodegradação aparece um pico de baixo peso molecular (menor que 6.500. Figura 47-B). No caso do LS previamente irradiado, a biodegradação causa uma diminuição (aproximadamente 24 %, considerando a área baixo da curva) da fração de maior peso molecular.

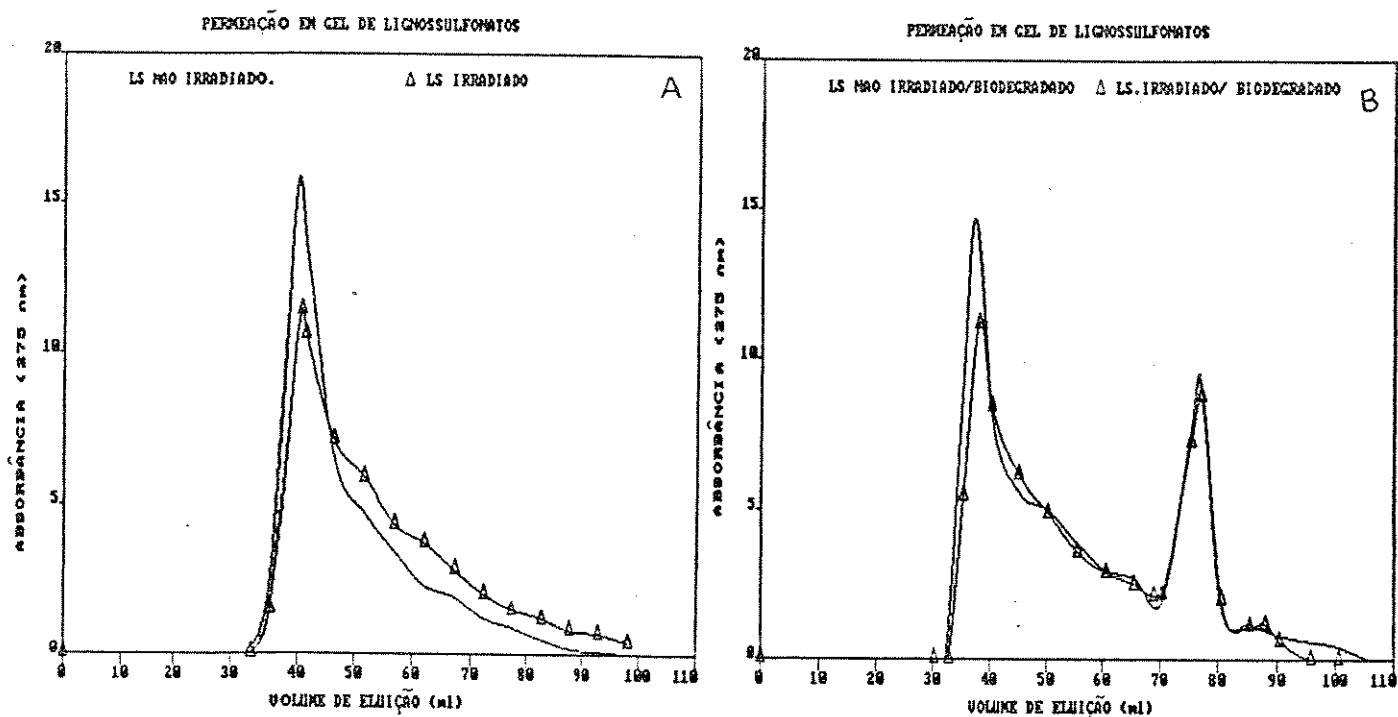


FIGURA 47. Distribuição de pesos moleculares do LS submetido a diferentes tratamentos. A: LS não tratado e irradiado por 3 horas. B: LS biodegradado por 12 dias e irradiado/biodegradado (ver 2.21, 2.24).

A absorbância no infravermelho ajuda a evidenciar as mudanças que os tratamentos fotoquímico e biológico ocasionam no LS (Tabela 10). A comparação da absorção a 1515 cm^{-1} (anéis aromáticos), com as bandas em outros comprimentos de onda, mostram um decréscimo relativo dos anéis aromáticos (Tabela 10) (Ban e Glan-ser, 1979). Uma banda a 1400 cm^{-1} não pôde ser atribuída, mas que deve corresponder à presença de proteínas residuais.

TABELA 10. Mudanças na razão das absorbâncias entre 1515 cm^{-1} e outros comprimentos de onda característicos.

	1.515/1.470	1.515/1.425	1.515/1.270	1.515/1.040
LS	1.68	2.00	0.95	1.10
LS(irr)	1.53	1.77	0.87	0.76
LS(bio)	n.d.	n.d.	0.84	0.58

n.d. bandas não definidas.

1515 cm^{-1} Vibração de anéis aromáticos.

1470 cm^{-1} Deformação assimétrica C-H.

1425 cm^{-1} Vibração de anéis aromáticos.

1270 cm^{-1} Vibração de anel tipo guaiacil.

1040 cm^{-1} Grupos sulfonato.

Comparando o comportamento de LS fotoirradiado e biodegradado pode-se destacar os seguintes fatos:

- a) A absorbância do LS biodegradado aumenta no início da biodegradação e posteriormente diminui, enquanto que na fotoirradiação só é observada a diminuição.
- b) A fluorescência cai nos dois casos.
- c) Na biodegradação é observada despolimerização do LS, obtendo-se picos de menor peso molecular. Na fotoirradiação a distribuição de pesos moleculares é pouco alterada.
- d) A biodegradação após o tratamento fotoquímico, pouco altera as características do LS.

Portanto, podemos concluir que a diferença fundamental entre a degradação fotoquímica e microbiológica do LS é que só a microbiológica causa uma extensiva despolimerização. As potencialidades de C. sitophila ao tratamento de efluentes da indústria papelreira são evidentes considerando que os tratamentos clássicos não diminuem o peso molecular das frações maiores. No entanto, a fotodecomposição de efluentes catalisada por dióxido de titânio tem tido êxito (Kobayakawa e col., 1989) e a combinação desse método com a subsequente degradação por C. sitophila mostrou excelentes resultados e foi por nós relatada (Durán e col., 1990b).

4. CONCLUSÃO GERAL.

O estudo do sistema ligninolítico de Chrysonilia sitophila é de importância relevante por tratar-se este de um fungo da classe ascomiceto. Os fungos desta classe não eram conhecidos como produtores de ligninases até nosso descobrimento em 1987 (Durán e col., 1987). Assim aplicamos muito do conhecimento acumulado por outros grupos ao redor do mundo, no estudo do basidiomiceto Phanerochaete chrysosporium, à nossa pesquisa. Porém, tanto quanto as semelhanças encontradas facilitaram o trabalho, algumas diferenças fundamentais apresentaram-nos outros desafios que tiveram que ser resolvidos de maneira diferente. Esta é uma primeira tentativa de desvendar o sistema pelo qual este microorganismo degrada lignina.

A produção de fenol-oxidases e de peróxido de hidrogênio foi induzida por substratos contendo lignina. A participação destas enzimas, na degradação de lignossulfonato (LS) foi estabelecida.

O LS foi biodegradado em maior extensão na abundância de nitrogênio no meio de cultivo tanto em cultura agitada como estacionária. Isto é diferente do encontrado em culturas de P. chrysosporium que não degrada lignina em abundância de nutrientes e excepcionalmente degrada lignina em cultura agitada. As análises de distribuição de pesos moleculares por cromatografia de permeação em gel, mostraram a efetiva biodegradação do LS por C. sitophila.

A purificação de três hemoproteínas com atividade ligninase e a despolimerização que este fungo ocasiona no LS, permitem classificar C. sitophila como um fungo de decomposição branca. Como outros fungos reportados na literatura, este também produz

álcool veratrílico no meio extracelular.

As culturas realizadas em biorreator mostraram que C. sitophila é capaz de produzir ligninase em altas quantidades. Até recentemente, o maior impedimento para o estudo das ligninases de qualquer dos fungos conhecidos, era a baixa produção destas enzimas nas culturas.

O método quimiluminescente proposto para quantificar a atividade ligninolítica total de uma cultura poderá ter uma aplicação geral, porém é necessário ainda testá-lo com outros fungos com capacidade ligninolítica conhecida.

Uma avaliação da bio- e foto- degradação do LS, bem como a conciliação dos dois tratamentos, permitiu estabelecer algumas diferenças e semelhanças entre os dois processos, dos quais só a biodegradação proporcionou uma despolimerização significativa.

Ainda que o sistema ligninolítico não pôde ser totalmente esclarecido, os resultados mostrados nesta tese aprofundam nosso conhecimento deste ascomiceto produtor de ligninase e destaca as potencialidades deste microorganismo para estudos e aplicações.

5. BLIOGRAFIA

- Adler, E. e Marton, J. (1959). Zur Kenntnis der Carbonylgruppen im Lignin. I. Acta Chemica Scandinavica 13:76-96.
- Akaki, M. (1951). Utilization of Waste Sources by Monilia sitophila II. Journal of Fermentation Technology 29:327-335.
- Akaki, M. (1952a). Utilization of Waste Sources by Neurospora sitophila III. Culture Test in Rice Straw Hydrolyzate. Journal of Fermentation Technology 30:81-86.
- Akaki, M. (1952b). Utilization of Waste Sources by Neurospora sitophila IV. Culture Test in Rice Straw Hydrolyzate. Journal of Fermentation Technology 30:440-447.
- Ander, P. e Eriksson, K.-E. (1976). The importance of Phenol-oxidase Activity in Lignin Degradation by the White-rot Fungus Sporotrichum pulverulentum. Archives of Microbiology 109:1-8.
- Ander, P. e Eriksson, K.-E. (1978). Lignin Degradation and Utilization by Microorganisms. In Progress in Industrial Microbiology 14:1-58. Ed: Bull, M.J., Elsevier Scientific Publishing Company. Amsterdam-Oxford-New York.
- Ander, P. e Eriksson, K.-E. (1987). Determination of Phenoloxidase Activity Using Vanillic Acid Decarboxylation and Syringaldazine Oxidation. Biotechnology and Applied Biochemistry 9:160-169.
- Arora, D.S. e Sandhu, D.K. (1985). Laccase Production and Wood Degradation by a White-Rot Fungus Daedalea flavida. Enzyme Microbial Technology 7:405-408.
- Ashter, M., Corrieu, G., Drapron, R. e Odier, E. (1987). Effect of Tween 80 and Oleic Acid on Ligninase Production by Phanerochaete chrysosporium INA-12. Enzyme and Microbial Technology 9:245-249.
- Baeza, J., Pedreros, A., Urizar, S., Freer, J., Schmidt, E. e Durán, N. (1990). Organosolv Pulping II. Formic Acid Delignification of Pinus Radiata D. Don. Biomass no prelo.
- Beuchat, L.R. (1976). Fungal Fermentation of Peanut Press Cake. Economic Botany 30:227-234.
- Berry, R.K. e Dekker, R.F.H. (1986). Fractionation of the Cellulolytic Enzymes Produced by a Species of Monilia; Purification and Properties of an Extracellular B-D-Glucosidase. Carbohydrate Research 157:1-12.
- Biswas-Hawkes, D., Dodson, A.P.J., Harvey, P.J. e Palmer, J.M. (1987). Ligninases from White-rot Fungi. In Lignin Enzymic and Microbial Degradation 40:125-130. Ed: INRA, Paris.
- Bourbonnais, R. e Paice, M.G. (1988). Veratryl Alcohol oxidases from the Lignin-degrading Basidiomycete Pleurotus saior-caju. Biochemical Journal 255:445-450.
- Bradford, M.M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. Analytical Biochemistry 72:248-254.
- Browning, B.L. (1967) em: Methods of Wood Chemistry V II. John Wiley & Sons, New York. pp. 660-665.
- Bumpus, J.A. e Aust, S.D. (1987). Biodegradation of Environmental Pollutants by the White Rot Fungus Phanerochaete chrysosporium: Involvement of the Lignin Degrading System. BioEssays 6:166-170.
- Burdsall, H.H. e Esllyn, W.E. (1974). A New Phanerochaete with a chrysosporium Imperfect State. Mycotaxon 1:123-133.
- Campos, V., Salas, E., Durán, N., Rodríguez, J. e Baeza, J. (1986). Isolation of cellulolytic Chrysonilia sitophila from Tribolium

- ferrugineum. Boletín Micológico de Chile. 2:161-165.
- Cheetham, P.S.J. (1985). The applications of Enzymes in Industry. Em: Handbook of Enzyme Biotechnology; Ed: Wiseman, A. p. 288.
- Chen, C.L. e Chang, H.M. (1985). Chemistry of Lignin Biodegradation p. 535-555. Em: Biosynthesis and Biodegradation of Wood Components. Ed: Higuchi, T., Academic Press, Inc. New York.
- Crawford, D.L., Pometto III, A.L. e Crawford, R.L. (1983). Lignin Degradation by Streptomyces viridosporus: Isolation and Characterization of a New Polymeric Lignin Degradation Intermediate Applied Environmental Microbiology 45:898-904.
- Deobald, L.A. e Crawford, D. (1989). Lignin Biotransformations by an Aromatic Aldehyde Oxidase Produced by Streptomyces viridosporus T7A. Applied Biochemistry and Biotechnology 20/21:153-163.
- Dodson, P.J., Evans, C.S., Harvey, P.J. e Palmer, J.M. (1987). Production and Properties of an Extracellular Peroxidase from Coriolus vesicolor which Catalyses C-C Cleavage in a Lignin Model Compounds. FEMS Microbiology Letter 42:17-22.
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. e Smith, F. (1956). Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. Analytical Chemistry 28:350-356.
- Durán, N., Rojas, N., Nascimento, M. G., Freer, J. e Baeza, J. (1984). Biomass Photochemistry II: Chemiluminescence in the Peroxidation of Tannin, Phlobaphene and Catechin. Cellulose Chemistry and Technology 18:411-419.
- Durán, N., Rodríguez, J., Ferraz, A. e Campos, V. (1987). Chrysonilia sitophila TFB 27441: A Hyperlignolytic Strain. Biotechnology Letters 9:357-360.
- Durán, N., Ferrer, I. e Rodríguez, J. (1988a). Ligninase from Chrysonilia sitophila (TFB 27441 strain). Applied Biochemistry Biotechnology 16:157-168.
- Durán, N., Rodríguez, J., Gómez, E., Campos, V. e Baeza, J. (1988b). "Biomass Photochemistry XI: Photochemical Pre-Treatment of Cellulose and its Fungal Degradation". Biotechnology Bioengineering 41:215-219.
- Durán, N., Ferrer, I., Rodríguez, J., Mansilla, H. e Baeza, J. (1988c). Biomass Photochemistry XIII: Pre-Irradiated Lignin from Pinus radiata D. Don and its Degradation by Ligninase and Horseradish Peroxidase. Journal of Photochemistry and Photobiology 41:261-267.
- Durán, N., Mansilla, H., Leite, L.C.C. e Faljoni-Alario, A. (1988). Peroxidase-Hydrogen Peroxide System Acting on Lignin. Journal of Inorganic Biochemistry 34:105-115.
- Durán, N., Reyes, J.L., Baeza, J. e Campos, V. (1988e). Biomass Photochemistry: XII. Chemical and Photochemical Pretreatment of Rice Hull and Its Fungal Degradation. Biotechnology and Bioengineering, 32:564-568.
- Durán, N., Ferraz, A. e Mansilla, H. (1990a). Biopulping: A New View on Wood Delignification. Arquivo de Biología e Tecnologia 33:295-315.
- Durán, N., Rodríguez, J., Dezotti, M., Ferrer, I. e Innocentini-Mei, L. (1990b). "Descoloração de Lignina de Efluentes Kraft por Sistemas Fotoquímicos e Fotobiológicos". Livro de Resumos SBQ, AP-20.
- Eldrige, J. P. (1972). Utilization of Products Derived from Photolytically Treated Ligninsulfonates by Pseudomonas putida. Tese de Doutorado, Oregon State University, USA.

- Enoki, A., Tanaka, H. e Fuse, G. (1988). Degradation of Lignin-Related Compounds, Pure Cellulose, and Wood Components by White-Rot and Brown-Rot Fungi. Holzforschung 42:85-93.
- Eriksson, K.-E., Johnsrud, S.C. e Vallander, L. (1983). Degradation of Lignin Model Compounds by Various Mutants of the White-Rot Fungus Sporotrichum pulverulentum. Archives of Microbiology 135:161-168.
- Eriksson, K.-E. (1985). Swedish Developments in Biotechnology Related to the Pulp and Paper Industry. Tappi Journal. 68:46-55.
- Eriksson, K.-E. (1987a). Production of H_2O_2 in Phanerochaete chrysosporium During Lignin Biodegradation. Philosophical Transactions of The Royal Society of London 321:455-459.
- Eriksson, K.-E. (1987b). Breakthroughs in Biotechnology Shows Promise for Paper Industry. Pulp & Paper May:114-117.
- Eriksson, K.-E. (1990). Biotechnology in The Pulp and Paper Industry. Wood Science Technology 24:79-101.
- Faison, B.D. e Kirk, T.K. (1983). Relationship Between Lignin Degradation and Production of Reduced Oxygen Species by Phanerochaete chrysosporium. Applied Environmental Microbiology 46:1140-1145.
- Faison, B.D. e Kirk, T.K. (1985). Factors Involved in the Regulation of a Ligninase Activity in Phanerochaete chrysosporium. Applied and Environmental Microbiology. 49:299-304.
- Faison, B.D., Kirk, T.K., e Farrell, R.L. (1986). Role of Veratryl Alcohol in Regulating Ligninase Activity in Phanerochaete chrysosporium. Applied and Environmental Microbiology 2:251-254.
- Fardiaz, D. e Markakis, P. (1981). Oligosaccharides and Protein Efficiency Ratio of Oncom (Fermented Peanut Press Cake). Journal of Food Science 46:1970-1971.
- Farmer, V.C., Henderson, M.E.K. e Russell, J.D. (1960). Aromatic-Alcohol Oxidase Activity in the Growth Medium of Polystictus versicolor. Biochemical Journal 74:257-262.
- Farrell, R.L., Murtagh, K.E., Tien, M., Mozuch, M.D. e Kirk, T.K. (1989). Physical and Enzymatic Properties of Lignin Peroxidases Isoenzymes from Phanerochaete chrysosporium. Enzyme and Microbial Technology 11:322-328.
- Fengel, D. e Wegener G. (1984). Wood: Chemistry, Ultrastructure, Reactions. Walter de Gruyter Berlin-New York.
- Ferraz, A. e Durán, N. (1989). Effect of Various Condition on the Chrysonilia sitophila "TFB 27441" Growth. Revista Microbiológica (Brasil) 20:240-245.
- Forney, L.J., Reddy, C.A., Tien, M. e Aust, S.D. (1982). The Involvement of Hydroxyl Radical Derived from Hydrogen Peroxide in Lignin Degradation by the White-Rot Fungus Phanerochaete chrysosporium. Journal of Biological Chemistry 257:11455-11462.
- Forrester, I.T., Grabski, A.C., Mishra, C., Kelley, B.D., Strickland, W.N., Leatham, F. e Burgess, R.R. (1990). Characterization and N-Terminal Amino Acid Sequence of a Manganese Peroxidase Purified from Lentinula edodes Cultures Grown on a Commercial Wood Substrate. Applied Microbiology and Biotechnology 33:359-365.
- Forss, K., Jokinen, K., Savolainen, M. e Williamson, H. (1989). Utilization of Enzymes for Effluent Treatment in the Pulp and Paper Industry. Paperi ja Puu - Paper and Timber 10:1108-1112.
- Freer, J., Palma, G., Baeza, J., Campos, V., Salas, E., Ferraz, A. e Durán, N. (1990). Production of Microbial Protein from Forest Products. Biomass 23:155-162.

- Seiger, J.P., Rio, B., Nandris, D. e Nicole, M. (1986). Laccases of Rigidoporus lignosus and Phellinus noxius. I Purification and Some Physicochemical Properties. Applied Biochemistry Biotechnology 12:121-133.
- Glenn, J.K., Morgan, M.A., Mayfield, M.B., Kuwahara, M. e Gold, M.H. (1983). An Extracellular H₂O₂-requiring Enzyme Preparation Involved in Lignin Biodegradation by the White-rot Basidiomycete Phanerochaete chrysosporium. Biochemistry and Biophysical Research Communication 114:1077-1083.
- Glenn, J.K. e Gold, M.H. (1985). Purification and Characterization of an Extracellular Mn(II)-Dependent Peroxidase from the Lignin-Degrading Basidiomycete Phanerochaete chrysosporium. Archives of Biochemistry and Biophysics 242:329-341.
- Glenn, J.K., Akileswaran, L. e Gold, M.H. (1986). Mn(II) Oxidation is the Principal Function of the Extracellular Mn-peroxidase from Phanerochaete chrysosporium. Archives of Biochemistry and Biophysics 251:688-696.
- Glumoff, T., Harvey, P.J., Molinari, S., Goble, M., Frank, G., Palmer, J.M., Smit, J.D.G. e Leisola, M.S.A. (1990). Lignin Peroxidase from Phanerochaete chrysosporium. Molecular and Kinetic Characterization of Isozymes. European Journal of Biochemistry 187:515-520.
- Gold, M.H., Kuwahara, M., Chiui, A.A. e Glenn J.K. (1984). Purification and Characterization of an Extracellular H₂O₂-Requiring Diarilpropane Oxygenase from the White Rot Basidiomycete Phanerochaete chrysosporium. Archives of Biochemistry and Biophysics 234:353-362.
- Gold, M.H., Wariishi, H. e Valli, K. (1989). Extracellular Peroxidases Involved in Lignin Degradation by the White Rot Basidiomycete Phanerochaete chrysosporium. ACS Symposium Series N 389 Biocatalysis in Agricultural Biotechnology 9:127-140. Ed.: J.R. Whiteker e P.E. Sonnet.
- Goldschmid, O. e Maranville, L.F. (1959). Improved Spent Sulfite Liquor Determination by the Nitrosolignin Method. Analytical Chemistry 31:370-374.
- Greene, R.V., Gould, J.M. (1984). Fatty Acyl-coenzyme A Oxidase Activity and H₂O₂ Production in Phanerochaete chrysosporium Mycelia. Biochemistry Biophysics Research Communications. 118:437-43.
- Guengerich, F.P. (1977). Preparations and Properties of Highly Purified Cytochrome P-450 and NADH-Cytochrome P-450 from Pulmonary Microsomes of Untreated Rabbits. Molecular Pharmacology 13:911-923.
- Guillén, F., Martínez, A.T. e Martínez, M.J. (1990). Production of Hydrogen Peroxide by Aryl-alcohol Oxidase from the Ligninolytic Fungus Pleurotus eryngii. Applied Microbiology Biotechnology 32:465-469.
- Haemmerli, S.D., Leisola, M.S.A., Sanglard, D. e Fiechter, A. (1986). Oxidation of Benzo(a)pyrene by Extracellular Ligninases of Phanerochaete chrysosporium. The Journal of Biological Chemistry, 261:6900-6903.
- Haemmerli, S.D., Schoemaker, H.E., Schmidt, H.W.H. e Leisola, M.S.A. (1987). Oxidation of Veratryl Alcohol by the Lignin Peroxidase of Phanerochaete chrysosporium. Involvement of Activated Oxygen. FEBS Letters 220:149-154.
- Haemmerli, S.D., Fiechter, A. e Leisola, M.S.A. (1988). Lignin Biodegradation: New Developments. International Biotechnology Symposium 8th 2:1034-1041.

- Harvey, P.J., Schoemaker, H.E. e Palmer, J.M. (1986). Veratryl Alcohol as a Mediator and the Role of Radical Cations in Lignin Biodegradation by Phanerochaete chrysosporium. FEBS Letters 195: 242-246.
- Hattaka, A.I., Mohammadi, O.K. e Lundell, T.K. (1989). The Potential of the White-Rot Fungi and their Enzymes in the Treatment of Lignocellulosic Feed. Food Biotechnology 3:45-58.
- Hawksworth, D.L., Sutton, B.C. e Ainsworth, G.C. (1983). Dictionary of the Fungi. Commonwealth Mycological Institute, Inglaterra.
- Higuchi, T. (1989). Mechanism of Lignin Degradation by Lignin Peroxidase and Laccase of White-Rot Fungi. ACS Symposium Series, 35:482-502. Ed.: Lewis, N.G. e Paice, M.G.. American Chemical Society, Washington DC.
- Horowitz, N.H. e Shen, S.-C. (1952). Neurospora Tyrosinase. Journal of Biological Chemistry 197:513.
- Imrie, F.K.E. e Tilbury, R.H. (1972). Polysaccharides in Sugar Cane and Its Products. Sugar Technology Reviews. 1:291-361.
- Jager, A., Croan, S. e Kirk, T.K. (1985). Production of Ligninase and Degradation of Lignin in Agitated Submerged Cultures of Phanerochaete chrysosporium. Applied Microbiology and Biotechnology 50:1274-1278.
- Jager, A.G., Kern, H.W. e Wandrey, C. (1989). Lignin Peroxidase Production by Cells of Phanerochaete chrysosporium Immobilized on Sintered Glass. Fourth International Conference, Biotechnology in the Pulp and Paper Industry, Raleigh, North Caroline, USA.
- Johansson, T. e Nyman, P.O. (1987). A Manganese(II)-Dependent Peroxidase from the White-Rot Fungus Trametes versicolor. Acta Chemica Scandinavica B41:762-765.
- Johnsrud, S.C., Fernandez, N., Lopez, P., Gutierrez, I., Saez, A. e Eriksson, K.-E. (1987). Properties of Fungal Pretreated High Yield Bagasse Pulps. Nordic Pulp Paper Research Special Issue 75:47-52.
- Jonsson, L., Johansson, T., Sjostrom, K. e Nyman, P.O. (1987). Purification of Ligninase Isozymes from the White-Rot Fungus Trametes versicolor. Acta Chemica Scandinavica B41:766-769.
- Jurasek, L. e Paice, M. (1986). Pulp, Paper, and Biotechnology Chemtech June:360-365.
- Kantelinen, A., Hatakka, A., e Viikari, L. (1989). Production of Lignin Peroxidase and Laccase by Phlebia radiata (1989). Applied Microbiology and Biotechnology 31:234-239.
- Kern, H.W. (1983). Transformation of Lignosulfonates by Trichoderma harzianum. Holzforschung 37:109-115.
- Kern, H.W. (1983). Increased Bioxidation of Lignosulfonates by Sporotrichum pulverulentum in the Presence of Polyacrylic Acid. European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology 17:182-186.
- Kern, H.W., Haider, K., Pool, W., Leeuw J. W. de e Ernst L. (1989). Comparison of the Action of Phanerochaete chrysosporium and its Extracellular Enzymes (Lignin Peroxidases) on Lignin Preparations. Holzforschung 43:375-384.
- Kern, H.W. (1989). Improvement in the Production of Extracellular Lignin Peroxidases by Phanerochaete chrysosporium: Effect of Solid Manganese(IV)Oxide. Applied Microbiology and Biotechnology 32:223-234.
- Kersten, P.J. e Kirk, T.K. (1987). Involvement of a New Enzyme, Glyoxal Oxidase, in Extracellular H₂O₂ Production by Phanerochaete chrysosporium. Journal Bacteriology 169:2195-2202.

- (irk, T.K. e Chang, H.M. (1981). Potential Applications of Bio-ligninolytic Systems. Enzyme and Microbial Technology 3:189-196.
- (irk, T.K., Croan, S., Tien, M., Murtagh, K.E. e Farrell, R.L. (1986a). Production of Multiple Ligninases by Phanerochaete chrysosporium: Effect of Selected Growth Conditions and Use of a Mutant Strain. Enzyme and Microbial Technology 8:27-32.
- (irk, T.K. e Farrell, R.L. (1987). Enzymatic "Combustion": The Microbial Degradation of Lignin. Annual Review Microbiology 41:465-505.
- (irkpatric, N. e Palmer, J. (1987). Semi-Continuous Ligninase Production Using Foam Immobilized Phanerochaete chrysosporium. Em: Lignin Enzymic and Microbial Degradation. Ed.: Odier E. pp.191-195.
- Kobayakawa, K., Sato, Y., Nakamura, S. e Fujishima, A. (1989). Photodecomposition of Kraft Lignin Catalyzed by Titanium Dioxide Bulletin of The Chemical Society of Japan 62:3433-3436.
- Kuwahara, M., Glenn, J.K., Morgan, M.A. e Gold, M.H. (1984). Separation and Characterization of Two Extracellular H₂O₂-Dependent Oxidases from Ligninolytic Cultures of Phanerochaete chrysosporium. FEBS 169:247-250.
- Kuwahara, M. e Asada, Y. (1987). Production of Ligninases, Peroxidases and Alcohol Oxidase by Phanerochaete chrysosporium and its Mutant. In Lignin Enzymic and Microbial Degradation 40:171-176. Ed: INRA, Paris.
- Leatham, G.F. (1986). The Ligninolytic Activities of Lentinus edodes and Phanerochaete chrysosporium. Applied Microbiology and Biotechnology 24:51-58.
- Leisola, M.S.A. e Fiechter, A. (1985). New Trends in Lignin Biodegradation. Advances in Biotechnological Processes 5:59-89.
- Leisola, M.S.A., Zozulic, B., Meussdoerffer F. e Fiechter, A. (1987). Homology Among Multiple Extracellular Peroxidase from Phanerochaete chrysosporium. The Journal of Biological Chemistry 262:419-424.
- Linko, S. e Zhong, L.-C. (1987). Comparison of Different Methods of Immobilization for Lignin Peroxidase Production by Phanerochaete chrysosporium. Biotechnology Techniques 1:251-256.
- Linko, S. (1988). Production and Characterization of Extracellular Lignin Peroxidase from Immobilized Phanerochaete chrysosporium in a 10-l Bioreactor. Enzyme and Microbial Technology 10:410-416.
- Lobarzewski, J. (1990). The Characteristics and Functions of the Peroxidases from Trametes versicolor in Lignin Biotransformation. Journal of Biotechnology 13:111-117.
- Lundquist, K. e Kirk, T.K. (1978). De Novo Synthesis and Decomposition of Veratryl Alcohol by a Lignin-Degrading Basidiomycete. Phytochemistry 17:1676.
- Lundquist, K., Egyed, I., Josefsson, B. e Nyquist, G. (1981). Lignin Products in Pulp Liquors and their Fluorescence Properties. Cellulose Chemistry Technology 15:669-679.
- Mansilla, H. (1986). Estudos da Degradação Fotoquímica e Enzimática de Ligninas. Tese de Doutorado, UNICAMP, Brasil.
- Miller, G.L. (1959). Use of Dinitrosalicylic Reagent salicylic Reagent for the Determination of Reducing Sugars. Analytical Chemistry 31:426-428.
- Miller, M.J. e Gennis, R.B. (1983). The Purification and Characterization of the Cytochrome d Terminal Oxidase Complex of the Escherichia coli Aerobic Respiratory Chain. The journal of Biological Chemistry 258:9159-9165.

- Nakazawa, B. e Yamasaki, I. (1951). Studies on Neurospora, Grown on Trunks of Tree which were Burned by Air Raid Fire, 1945. in Kyushu. Science Bulletin of Faculty of Agriculture, Kyushu 13:143-148.
- Nerud, F. e Misurkova, Z. (1989). Production of Ligninolytic Peroxidases by the White Rot Fungus Coriolopsis occidentalis. Biotechnology Letter 11:427-432.
- Niku-Paavola, M.L. (1987). Ligninolytic Enzymes of the White Rot Fungus Phlebia radiata. Em: Lignin Enzymic and Microbial Degradation 40:119-123. Ed: INRA, Paris.
- Niku-Paavola, M.L., Karhunen, E., Kantelinen, A., Viikari, L., Lundell, T. e Hatakka, A. (1990). The Effect of Culture Conditions on the Production of Lignin Modifying Enzymes by the White-rot Fungus Phlebia radiata. Journal of Biotechnology 13:211-221.
- Nishida, T. (1989). Lignin Biodegradation by Wood-Rotting Fungi IV. The Effect of Lignin Biodegradation by the Fungus IZU-154 on the Enzymatic Hydrolysis of Wood. Mokuzai Gakkaishi 35:649-653.
- Nogueira, R.F.P. (1990). Síntese e Biodegradação de Compostos-Modelo de Lignina por Chrysonilia sitophila (TFB 27441). Tese de Mestrado, Instituto de Química, UNICAMP (Brasil).
- O'Reilly, S., Erazo, S., Campos, V., Salas, E., Baeza, J., Rodríguez, J., Ferraz, A. e Durán, N. (No prelo). Production of Single Cell Proteins and Extracellular Enzymes by Chrysonilia sitophila (TFB 27441 strain). Applied Biochemical Biotechnology.
- Palmer, J.M., Harvey, P.J. e Schoemaker, H.E., (1987). The rol of Peroxidases, Radical Cation and Oxygen in the Degradation of Lignin. Philosophical Transactions of The Royal Society of London A321:495-505.
- Paszczynski, A., Huynh V.-B. e Crawford, R. (1985). Enzymatic Activities of an Extracellular, Manganese-Dependent Peroxidase from Phanerochaete chrysosporium. FEMS Microbiology Letters 29:3741.
- Paszczynski, A., Huynh, V.-B e Crawford R. (1986). Comparison of Ligninase-I and Peroxidase-M2 from the White-Rot Fungus Phanerochaete chrysosporium. Archives of Biochemistry and Biophysics 244:750-765.
- Pepper, J.N., Bayles, P.E.T. e Adler, E. (1959). The Isolation and Properties of Lignins Obtained by the Acidolysis of Spruce and Aspen Woods in Dioxane-Water Medium. Canadian Journal of Chemistry 87:1241-1248.
- Platt, M.W., Hadar, Y. e Chet, I. (1984). Fungal Activities Involved in Lignocellulose Degradation by Pleurotus. Applied Microbiology and Biotechnology 20:150-154.
- Rachamandra, M., Crawford, D.L e Pometto, III A.L. (1987). Extracellular Enzyme Activities During Lignocellulose Degradation by Streptomyces spp.: A Comparative Study of Wild-Type and Genetically Manipulated Strains. Applied Environmental Microbiology 53:2754-2760.
- Rachamandra, M., Crawford, D.L. e Hertel, G. (1988). Characterization of an Extracellular Lignin Peroxidase of the Lignocellulolytic Actinomicete Streptomyces viridosporus. Applied Environmental Microbiology 54:3057-3063.
- Rodríguez, J. (1987). Produção de Enzimas Lignocelulolíticas e Proteína Unicelular por Chrysonilia sitophila TFB 27441. Tese de Mestrado, Instituto de Química, UNICAMP (Brasil).
- Selin, J.F., Sundman, V. e Raika M. (1975). Utilization and Polimerization of Lignosulfonates by Wood Rotting Fungi. Archives of Microbiology 103:63-70.

- Shear, C.L. e Dodge, B.O. (1927). Life Histories and Heterothallism of the Red Bread-Mold Fungi of the Monilia sitophila Group. Journal of Agricultural Research 34:1019-1042.
- Slawinska, D., Slawinski, J., Polewski, K. e Pukacki, W. (1979). Chemiluminescence in the Peroxidation of Tannic Acid. Photochemistry and Photobiology 30:71-80.
- Tamura, F. e Takai, Y. (1950). Cellulase of Neurospora sitophila - I. Japan Journal of Nutrition 8:129-134.
- Tanaka, M. e Matsuno R. (1985). Conversion of Lignocellulosic Materials to Single-cell Protein (SPC): Recent Developments and Problems. Enzyme and Microbial Technology, 7:197-206.
- Tien, M. e Kirk, T.K. (1983). Lignin-Degrading Enzyme from the Hymenomycete Phanerochaete chrysosporium Burds. Science 221:661-663.
- Tien, M. e Kirk, T.K. (1984). Lignin-degrading Enzyme from Phanerochaete chrysosporium: Purification, Characterization, and Catalytic Properties of a Unique H₂O₂-requiring Oxygenase. Proceeding of the National Academy of Science U.S.A. 81:2280-2284.
- Tien, M. (1987). Properties of Ligninases from Phanerochaete chrysosporium and their Possible Applications. CRC Critical Reviews in Microbiology 15:141-168.
- Tran, A.V. e Chambers, R.P. (1987). Delignification of an Unbleached Hardwood Kraft Pulp by Phanerochaete chrysosporium. Applied Microbiology and Biotechnology 25:484-490.
- Ulmer, D.C., Leisola, M.S.A. e Fiechter, A. (1984). Possible Induction of the Ligninolytic System of Phanerochaete chrysosporium. Journal of Biotechnology 1:13-24.
- Vicuña, R. (1988). Bacterial Degradation of Lignin. Enzyme and Microbial Technology 10:646-655.
- Von Arx, J.A. (1981). The genera of Fungi Sporulating in Pure Culture. Ed: Cramer, J., Vaduz, pp. 1-424.
- Von Hunolstein, C., Valenti, P., Visca, P., Antonioni, G., Nicolini, L. and Orsi, N. (1986). Production of Laccases A and B by a Mutant Strain of Trametes versicolor. Journal of General and Applied Microbiology 32:185-191.
- Waldner, R., Leisola, M.S.A. e Fiechter A. (1988). Comparison of Ligninolytic Activities of Selected White-rot Fungi. Applied Microbiology Biotechnology 29:400-407.
- Ward, O.P. e Moo-Young, M. (1989). Enzymatic Degradation of Cell Wall and Related Plant Polysaccharides. CRC Critical Reviews in Biotechnology 8:237-274.
- Weber, K. e Osborn, M. (1969). The Reliability of Molecular Weight Determinations by Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis. The Journal of Biological Chemistry 244:4406-4412.
- Wexler A.S. (1964). Characterization of Lignosulfonates by Ultraviolet Spectrometry. Analytical Chemistry 36:213-221.
- Willershausen, H., Jager, A. e Graf, H. (1987). Ligninase Production of Phanerochaete chrysosporium by Immobilization in Bioreactors. Journal of Biotechnology 6:239-243.
- Wong, G.B., Kappel, M.J., Raymond, K.N., Matzanke, B., Winkelmann, G. (1983). Coordination Chemistry of Microbial Iron Transport Compounds. 24. Characterization of Coprogen and Ferricrocin, Two Ferric Hydroxamate Siderophores. Journal of American Chemical Society 105:810-815.
- Wood, D.A. (1980). Production, Purification and Properties of Extracellular Laccase of Agaricus bisporus. Journal of General

Microbiology. 117:327-338.

Young, J. (1987). Biopulping Consortium Discussed at Madison Meeting.
Tappi Journal. 70:15-16.