

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE QUÍMICA

Estó exemplar corresponde a redação
final da Tese defendida por
o sr. Jaime Patrício Rodrigues
Gutierrez e operado pela
Comissão Julgadora "
Nelson Durán
29/7/87

PRODUÇÃO DE ENZIMAS LIGNOCELULOLÍTICAS E
PROTEÍNAS UNICELULARES POR CHRYSONILIA
SITOPHILA TFB 27441

JAIME PATRICIO RODRÍGUEZ GUTIERREZ

TESE DE MESTRADO

Orientador: Prof. Dr. Nelson Durán

CAMPINAS

-1987-

A Ximena, à Paula e

ao Tom Ingerson.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Nelson Durán, pela orientação e dedicação dispensadas durante o decorrer deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Vitoriano Campos pela valiosa ajuda e ensino na área microbiológica.

Ao Dr. Hector Mansilla pelos ensinamentos e contribuições na realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Jaime Baeza pelas análises de aminoácidos.

A Dra. Maricilda P. de Mello e André Ferraz pela leitura crítica desta tese.

Ao Dr. Juan L. Carrau pela cepa de *P. chrysosporium*.

Aos meus colegas de laboratório Raul, Luis e Giselle pela sua amizade e ajuda.

A Prof. Dra. Marcela Haun pela ajuda em experiências de laboratório.

Ao Prof. Dr. D.N.S Hon pela ajuda ao nosso grupo na área de fotoquímica

Ao instituto de Química pelo apoio material.

A FAPESP, CNPq, PADCT, FINEP, OEA, E UNESCO pelo apoio financeiro.

INDICE

Página

RESUMO

ABSTRACT

ABREVIACÖES

CAPITULO I

I	INTRODUÇÃO	1
1.1	Celulose: Estrutura e Biodegradação	4
1.2	Lignina: Biossíntese, Estrutura e Biodegradação	9
1.3	Proteínas Unicelulares	16
1.4	Pré-tratamento da Biomassa	17
1.5	Objetivos	19

CAPITULO II

II	PARTE EXPERIMENTAL	20
II.1	Materials	21
II.1.1	Reagentes e Procedência	22
II.1.2	Instrumentação	23
II.2	Microorganismos e Meios de Cultura	24
II.2.1	Microorganismos	24
II.2.2	Padronização dos Inóculos	24
II.2.3	Meios de cultivo	25

11.3	Análise das Atividades Celulolíticas	28
11.3.1	Métodos usando "celulose azure"	28
11.3.2	Atividade em Papel de Filtro	29
11.3.3	Atividade Endo-1,4- β -D-glicanase	30
11.3.4	Atividade de β -glicosidase	31
11.4	Análise da Atividade Lignolítica	32
11.4.1	Por descoloração de "Remazol Brilliant Blue R"	32
11.4.2	Por Oxidação de Álcool Veratrílico	33
11.4.3	Por Modificação da Absorbância da Lignina Dioxano	34
11.4.4	Atividade Lignolítica induzida por Lignina	35
11.5	Análise de Proteínas	37
11.5.1	Método do Biureto	37
11.5.2	Análise de Aminoácidos	37
11.6	Análise de açúcares	39
11.6.1	Análise de açúcares redutores (método do DNS)	39
11.6.2	Análise de glicose (método do TGO)	39
11.7	Outros Métodos	41
11.7.1	Extração de Lignina de Casca de Arroz com Dioxano	41
11.7.2	Análise de Ácido Cítrico	42
11.7.3	Irradiações de Celulose	43
11.7.4	Determinação do peso seco	44

CAPITULO III

III	RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
III.1	Produção de Enzimas Celulolíticas	45
III.1.1	Conclusões	50

III.2	Pré-tratamento Fotoquímico da Celulose para a Produção de Celulases	51
III.2.1	Conclusões	58
III.3	Produção de Enzimas Lignolíticas	59
III.3.1	Conclusões	65
III.4	Produção de Proteínas Unicelulares	66
III.4.1	Conclusões	70
 CAPITULO IV		
IV CONCLUSÕES GERAIS		71
 APÊNDICE		73
BIBLIOGRAFIA		75

RESUMO

Estudou-se as enzimas celulolíticas e lignolíticas produzidas pelo microorganismo *Chrysomya sitophila* TFB-27441 que foi isolado do trato intestinal de um inseto xilófago.

A produção de celulasas foi estudada utilizando como fonte de carbono no meio de cultivo glicose, α -celulose e α -celulose pré-tratada fotoquimicamente. As enzimas estudadas foram β -D-glicosidase, endo-1,4- β -D-glicanase e a atividade celulolítica total foi estimada utilizando papel de filtro como substrato.

A atividade lignolítica foi determinada medindo-se a capacidade do meio extracelular de oxidar álcool veratrílico a aldeído veratrílico na presença de H_2O_2 , e pela capacidade do complexo enzimático de descorar uma solução de "remazol brilliant blue R".

A proteína unicelular foi analisada pela composição de seus aminoácidos.

ABSTRACT

Cellulolytic and ligninolytic enzymes produced by the fungus *Chrysomya sitophila* TFB 27441 isolated from a xilophagous insect were studied.

Glucose, α -cellulose and α -cellulose photochemically pre-treated were used as carbon source for cellulase production. β -D-glucosidase and endo-1,4- β -D-glucanase enzymes were studied and the total activity of cellulase was measured as filter paper activity.

Oxidation of veratryl alcohol to veratraldehyde on the presence of H_2O_2 and degradation of remazol brilliant blue were used as a measure for ligninolytic activity of the culture media.

Single cell proteins were analyzed and their amino-acid composition determined.

ABREVIACÖES

ABS	Absorbância
CMC	Carboximetilcelulose.
DNS	Ácido 3,5-dinitrosalisílico.
FPA	Atividade em Papel de Filtro.
pNPG	p-Nitrofenil- β -D-glucopiranosideo.
RBB	"Remazol Brilliant Blue R".
SCP	Proteína Unicelular.
TGO	Tris-glicose oxidase.

CAPITULO I

INTRODUÇÃO

I INTRODUÇÃO

Em virtude do esgotamento da biomassa fóssil (petróleo, carvão e gás natural) é evidente que a biomassa primária e residual será, num futuro imediato, a principal fonte de recursos com que a humanidade contará para a obtenção de alimentos, produtos químicos orgânicos e inclusive combustíveis líquidos e gasosos (1).

De um modo geral, entende-se por biomassa todo material produzido por seres vivos, seja animal ou vegetal. Porém, 95 % deste total (164 bilhões de toneladas por ano) é composto por material lignocelulósico produzido através de fotossíntese, sendo este a principal fonte renovável para a obtenção de produtos químicos de interesse industrial. A biomassa produzida por fotossíntese é composta por celulose (45 %), hemicelulose (20 %) e lignina (20 %) (2).

Algumas possibilidades de produção de combustíveis, produtos químicos básicos e produtos para a indústria de alimentos ou rações animais obtidos a partir de materiais lignocelulósicos, são esquematizadas na Figura 1 (3).

A celulose pode ser usada como polpa ou convertida em outros derivados tais como "rayon", celofane, acetato de celulose, etc. A hemicelulose pode ser usada como um componente da polpa ou degradada como a celulose em suas unidades de carboidratos a partir dos quais podem ser obtidos compostos químicos ou servir como fonte de carbono para a obtenção de proteínas unicelulares. A lignina pode ter diversas aplicações (Figura 1) com pronunciadas

diferenças nos valores de mercado. Por exemplo, uma libra de lignina usada como combustível vale U\$ 0,04, enquanto que a usada como dispersante em produtos como corantes e tintas, vale ao redor de U\$ 1,00 a libra (4).

Vários produtos apresentados na figura 1 são, ou podem ser obtidos por processos que envolvem microorganismos ou enzimas.

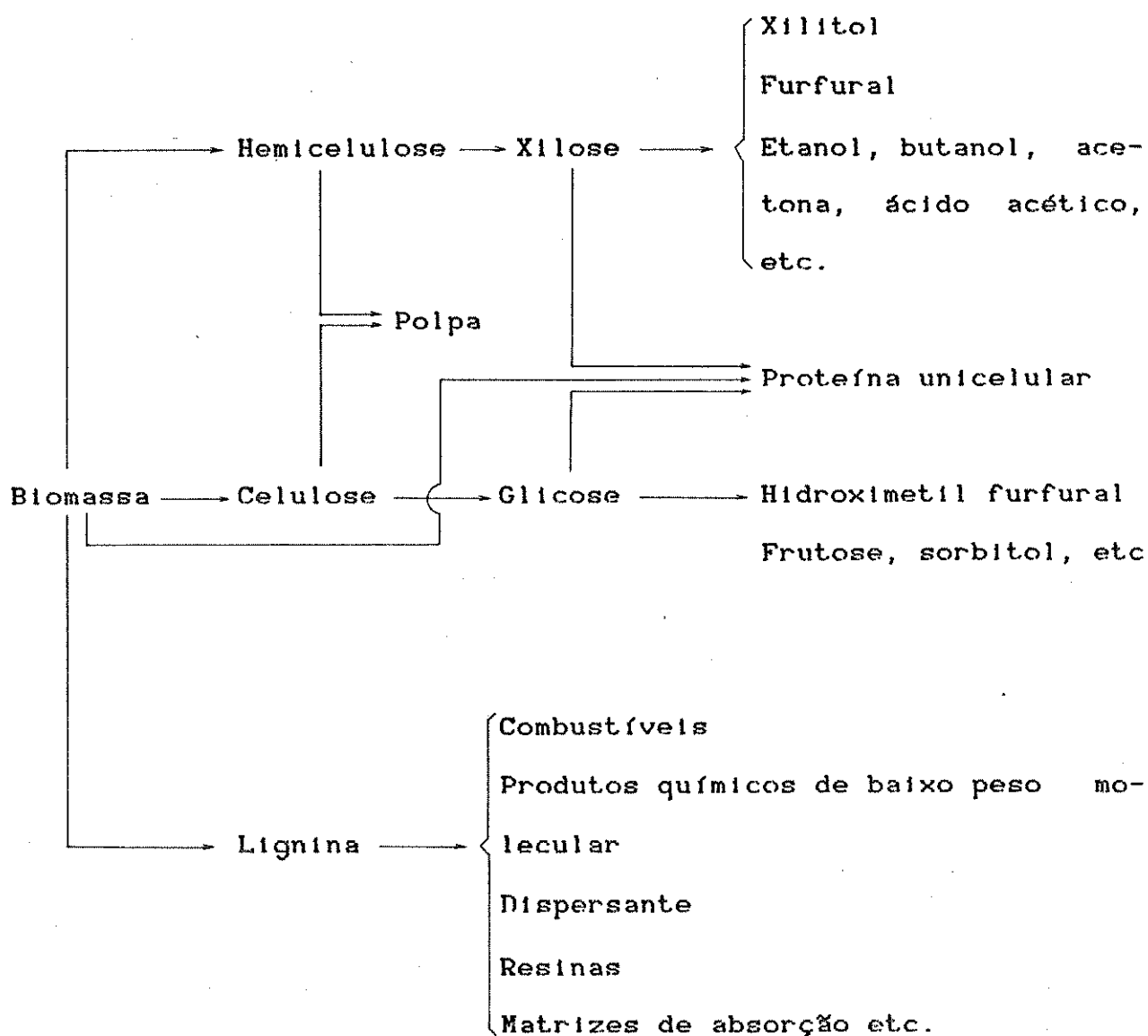


FIGURA 1. Usos dos lignocelulósicos.

1.1 CELULOSE: ESTRUTURA E BIODEGRADAÇÃO.

A celulose é a base estrutural das células vegetais e a substância natural mais abundante produzida por organismos vivos. Caracteriza-se por ser um homopolímero linear composto por unidades de anidroglicose ligadas através de ligações 1,4- β -glicosídicas (5) (Figura 2).

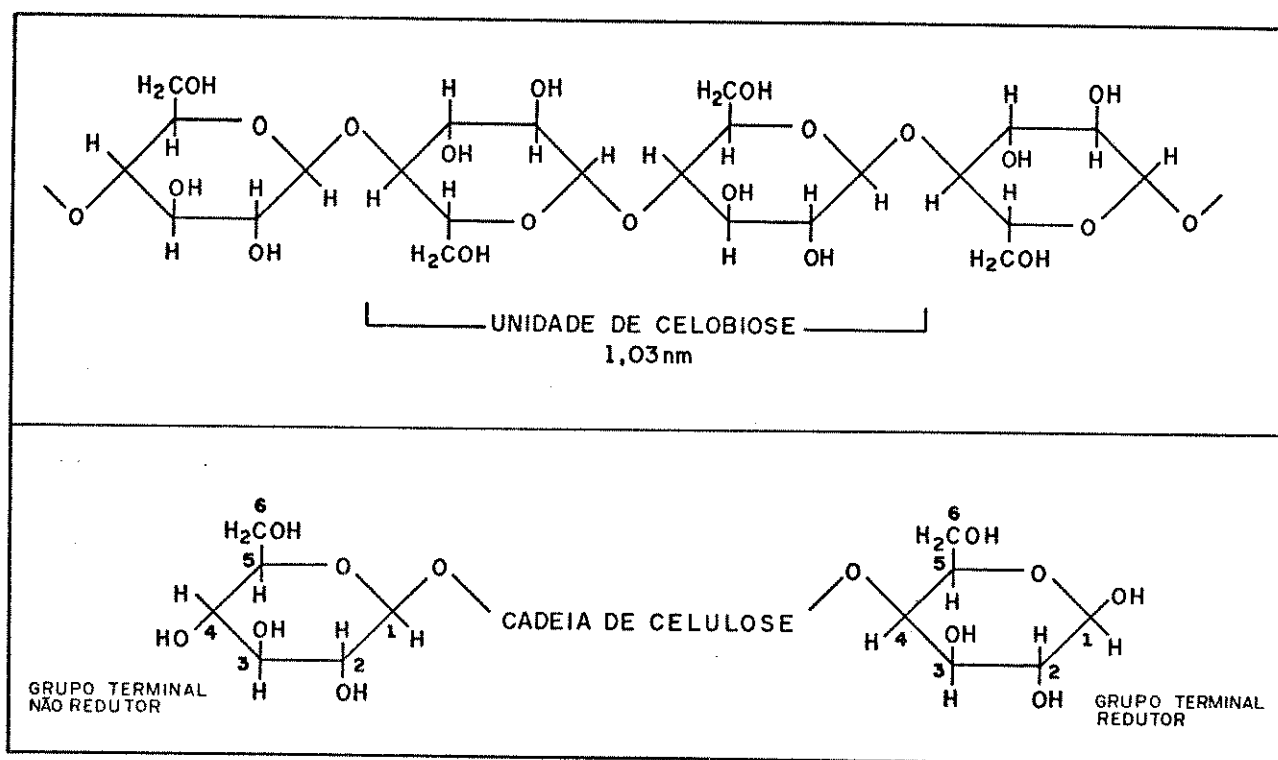


FIGURA 2. Estrutura da celulose.

A ligação de duas moléculas de glicose através dos carbonos 1 e 4 ocorre com a eliminação de uma molécula de água. Na realidade a unidade que se repete na cadeia de celulose é a celobiose que tem um comprimento de 1,03 nm (5). Os grupos OH terminais da cadeia apresentam diferentes comportamentos. O C1-OH é um

grupo hidrato de aldeído, derivado da formação do anel por uma ligação hemiacetal intramolecular e apresenta propriedades redutoras. O grupo C4-OH do outro extremo da cadeia de celulose é uma hidroxila alcoólica e, portanto, não redutor.

O peso molecular da celulose nativa varia bastante dependendo da origem da amostra (50.000 - 2,5 milhões). Como a celulose é um polímero linear com unidades e ligações uniformes, o tamanho da cadeia é usualmente especificado como grau de polimerização.

As menores unidades estruturais da celulose são as fibrilas elementares nas quais um pequeno número de cadeias poliméricas estão orientadas em paralelo e fortemente ligadas entre si por meio de pontes de hidrogênio. Nas fibrilas elementares alternam-se regiões cristalinas e regiões amorfas, sem existir uma fronteira definida entre elas. As microfibrilas são finos empacotamentos de fibrilas elementares e podem ser consideradas como unidades constituintes das fibras de celulose (6).

A natureza insolúvel e polimérica da celulose determina a forma do ataque inicial por um sistema celular. Na degradação de celulose por um microorganismo, este deve produzir enzimas extracelulares que difundam e quebrem a cadeia de celulose ou, deve ocorrer um contato direto das células e, portanto das enzimas presentes na sua superfície externa, com as fibras de celulose. A maioria das enzimas celulolíticas (celulases) produzidas por microorganismos são enzimas extracelulares (6).

Estas enzimas atuam sinergisticamente formando um complexo enzimático e podem ser classificadas em três grupos (6):

a) Endo-1,4- β -D-glicanase (EC-3.2.1.4). Este grupo de enzimas causa rupturas hidrolíticas internas na cadeia de celulose. Várias endoglicanases têm sido isoladas, cada uma delas parece ter uma especificidade diferente (dependendo do substrato) e um modo de ação característico.

b) Exo-1,4- β -D-glicanases. São dois tipos de enzimas, ambas atuando no grupo terminal não redutor das cadeias maiores de celulose ou das cadeias mais curtas, estas últimas produzidas pela ação de endoglicanases. As exo-celulases podem ser exo-celobíoldrolase (1,4- β -D-glicano celobíoldrolase, EC-3.2.1.91) ou exo-1,4- β -D-glicosidase (exo-1,4- β -D-glicano glicíoldrolase, EC-3.2.1.74), que liberam celobiose e glicose, respectivamente.

c) β -D-glicosídates ou celobíases. São enzimas (β -D-glicosídeo glicíoldrolase, EC-3.2.1.21) que transformam celobiose e outras celodextrinas em glicose. Formalmente, estas enzimas não podem ser classificadas como celulases uma vez que não atacam celulose.

Existe um grande número de métodos para analisar a atividade total ou parcial do complexo celulolítico. Na tabela Nº 1 são apresentados a classificação de diferentes tipos de enzimas, e o substrato utilizado para medir sua atividade.

O mais comum dos ensaios qualitativos para determinar atividade celulolítica total utiliza como substrato "celulose azul-re", que consiste em celulose ligada ao corante "Remazol Brilliant Blue R" (RBB). A medida que a celulose é solubilizada pelo microorganismo ou solução de enzima, o corante é liberado e a in-

tensidade da cor corresponde à capacidade celulolítica do sistema (7,8).

Dentre as técnicas quantitativas mostradas na tabela Nº 1, a mais comum é a que usa papel de filtro como substrato e que quantifica a atividade celulolítica total, conhecida como FPA ("filter paper activity"). Este ensaio foi padronizado nos trabalhos de Mandels e col. (9).

Apesar de muitos microorganismos degradarem celulose, somente alguns fungos, tais como *Trichoderma reesei*, *T. lignorum*, *T. Konigii*, *Phanerochaete chrysosporium* e algumas bactérias, tais como *Clostridium Thermocellum*, *Thermonospora* sp., são conhecidos pela sua capacidade de produzir quantidades mais elevadas de celulase. A descoberta de novas espécies celulolíticas é ainda um campo aberto. Considerando que as enzimas celulolíticas apresentam baixa atividade, seu custo ainda é um dos principais problemas mesmo nos trabalhos com fungos hipercelulolíticos (produtos da engenharia genética). Este é um dos fatores que impedem a industrialização dos processos de hidrólise enzimática para a degradação de lignocelulósicos (10).

TABELA Nº 1
ENSAIOS PARA CELULASES

ENZIMA	SUBSTRATO	PRODUTO
Celobiase, β -glicosidase (EC 3.2.1.21)	Celobiose pNPG	D-glicose p-Nitrofenol
Aril- β -D-glicosidase (EC 3.2.1.21)	2-Nitrofenil- β -D- glicosideo	2-Nitrofenol
Exo-1,4- β -D-glicanase (EC 3.2.1.91)	celulose cristalina	celobiose
Celobioldrolase (EC 3.2.1.91)	avicel	Açúcares redutores
D-glicoidrolase (EC 3.2.1.74)	celulose cristalina (algodão), avicel.	D-glicose
Endo-1,4- β -D glicanase (EC 3.2.1.4)	carboximetilcelulose (CMC)	Açúcares redutores
"Celulase"	papel de filtro celulose-azure	açúcares redutores Remazol Brilliant
		Blue

Ref. (6).

1.2 LIGNINA: BLOSSÍNTESE, ESTRUTURA E BIODEGRADAÇÃO.

A lignina é um polímero aromático, tridimensional, composto basicamente de três diferentes tipos de álcoois p-hidroxicinamílicos (Figura 3).

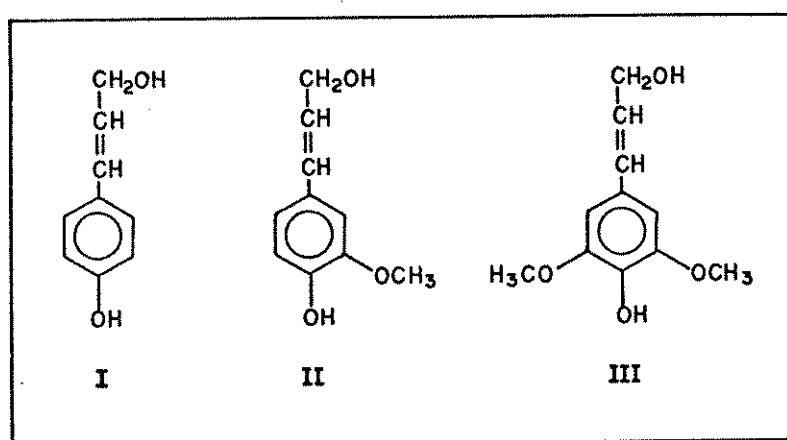


FIGURA 3. Estrutura de álcoois cinamílicos. (I) Álcool p-cumarílico, (II) Álcool coniferílico e (III) Álcool sinapílico.

A quantidade relativa destes álcoois 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 (11).

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 4). Os aminoácidos são desaminados a seus correspondentes ácidos cinâmicos, os quais, por sucessivas hidroxilações e metilações, produzem os ácidos p-cumárico, cafeico, ferúlico, 5-hidroxi-ferúlico e ácido sinápico. Os correspondentes álcoois cinamílicos são finalmente formados por ativação enzimática e redução dos correspondentes ácidos e aldeídos (5). Todas transformações acima são por via enzimática.

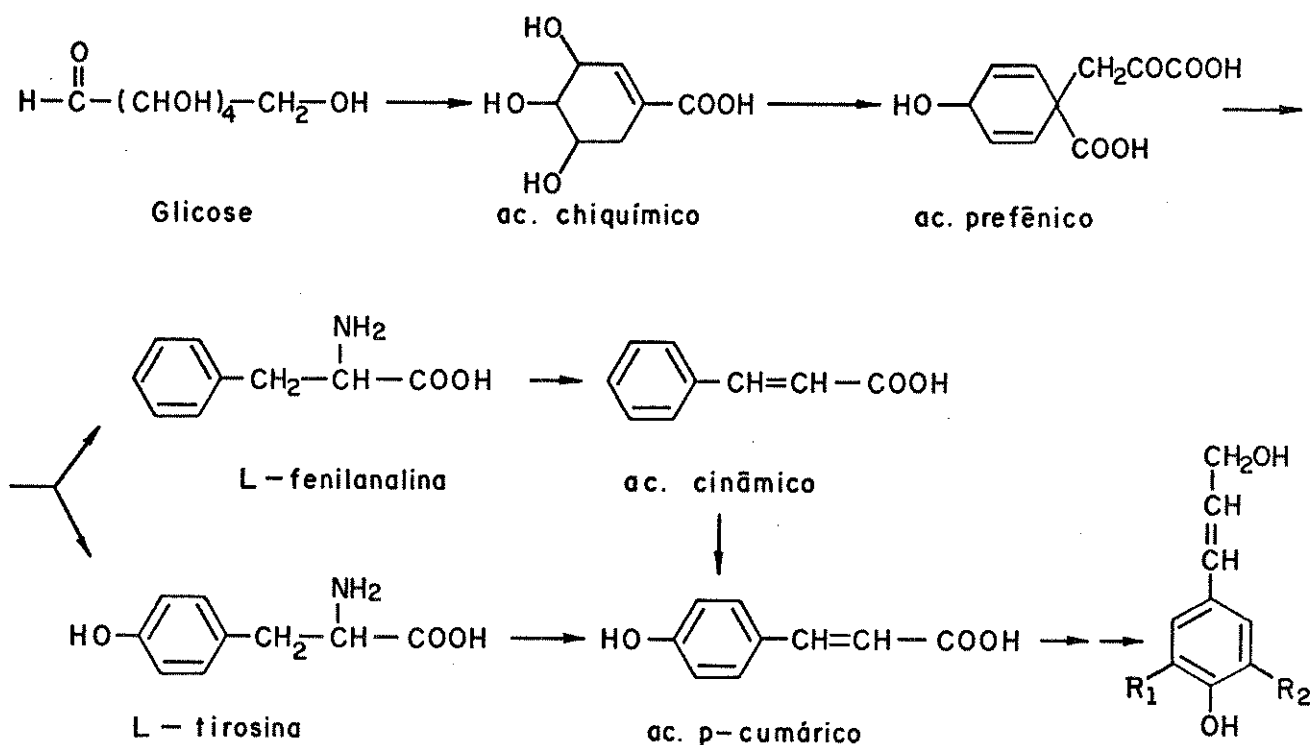


FIGURA 4. Biossíntese da lignina ($\text{R}_1=\text{R}_2=\text{H}$: I ; $\text{R}_1=\text{H}$, $\text{R}_2=\text{OCH}_3$: II ; $\text{R}_1=\text{R}_2=\text{OCH}_3$: III).

A biossíntese da macromolécula lignina a partir das unidades monoméricas de fenilpropano pode ser descrita como uma polimerização desidrogenativa radicalar, tendo início com a desidrogenação enzimática dos álcoois p-hidroxicinamílicos que produzem uma variedade de dímeros e oligômeros chamados lignóis. Posteriormente os precursores monoméricos acoplam-se aos oligômeros em lugar de agruparem entre si (5).

O principal problema no estudo da estrutura da lignina é a dificuldade de isolá-la do material lignocelulósico sem produzir reações secundárias. Esta separação ocasiona quebra de ligações, mudanças na extensão do polímero, no conteúdo de grupos funcionais e alteração das propriedades físicas e químicas.

Diversos métodos têm sido utilizados para propor estruturas de ligninas. Estes incluem determinação estrutural dos produtos de degradação química, análise espectral e funcional, ou a simulação da estrutura da lignina por computador (2).

Existem três tipos principais de ligações na lignina (12):

- a) arilglicerol- β -aril-éter (entre as unidades 1 e 2, 3 e 4, 7 e 8, 9 e 10, 10 e 11 na figura 5). Estas envolvem aproximadamente 40 % das unidades de fenil propano na lignina de abeto e aproximadamente 60 % na lignina de madeira de vidoeiro.
- b) Estruturas fenilcumaram (entre as unidades 6 e 7 na figura 5). Estas envolvem aproximadamente 20 % das unidades de lignina de abeto e 10 % de vidoeiro.
- c) Estruturas bifenila (entre unidades 8 e 9, 14 e 16 na Figura 5). Podem envolver 25 % das unidades fenilpropano de lignina de abeto e 10 % de vidoeiro.

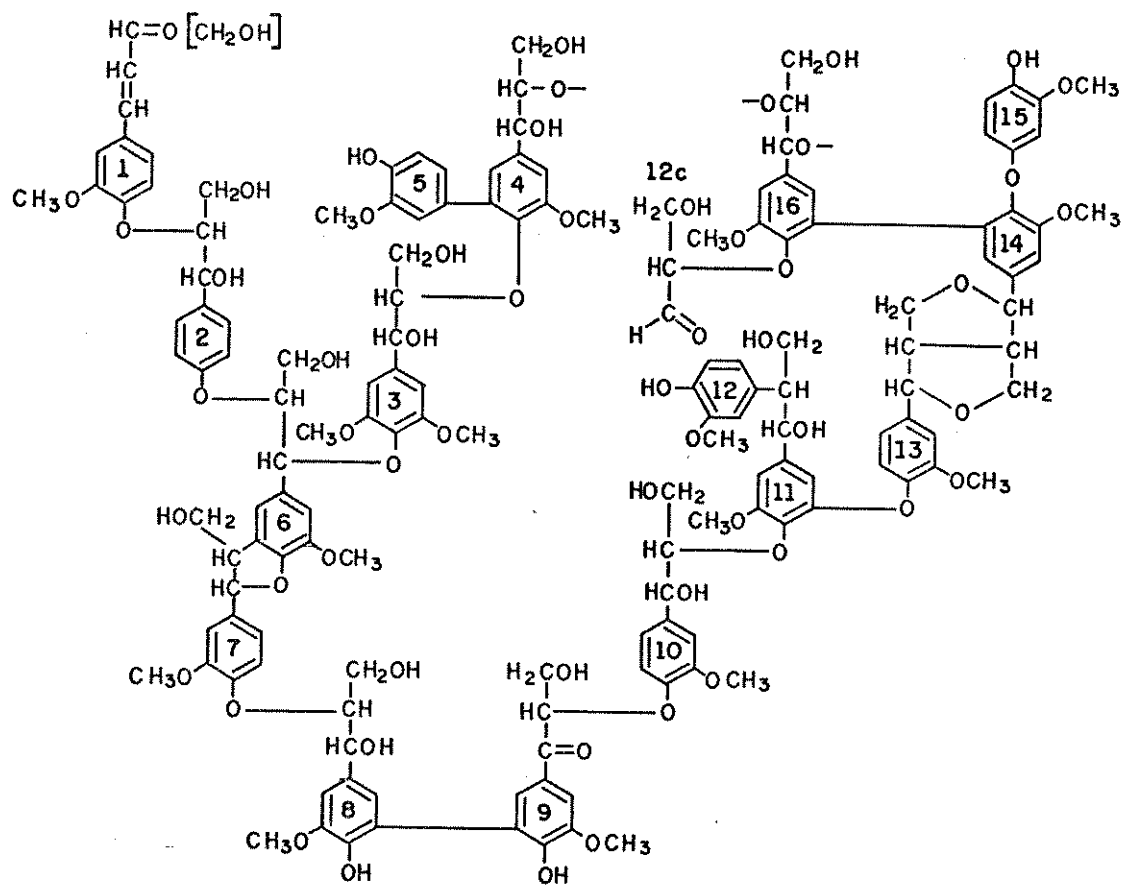


FIGURA 5. Estrutura aproximada da lignina.

Existem outros tipos de ligações, além dos já mencionados, que contribuem em menor proporção para a estrutura da lignina.

A natureza tem desenvolvido mecanismos eficientes para biodegradar lignina, o que é evidente pela ausência de acúmulo da mesma. Esta biodegradação é uma das mais importantes contribuições para o ciclo carbono-oxigênio da biosfera.

Os estudos sobre a biodegradação de ligninas são dificultados pela pouca compreensão da estrutura nativa do polímero e pelas modificações causadas no processo de isolamento. Isto tem levado os pesquisadores a utilizar ligninas modificadas, ligninas sintéticas, material lignocelulósico intacto ou modelos de ligninas de baixo peso molecular. Por consequência, surge uma terceira dificuldade quando se deseja quantificar a biodegradação na lignina nativa.

As mudanças estruturais na lignina após o ataque microbial, incluem quebra oxidativa das cadeias laterais, quebra de ligações β -aril-éter, degradação dos núcleos aromáticos, desmetoxilações e outras modificações. A detecção destes eventos é uma tarefa difícil. Com o propósito de superar as dificuldades numerosas técnicas vêm sendo desenvolvidas, destacando-se o uso de lignina marcada com ^{14}C , porém este substrato não é disponível comercialmente sendo sua síntese bastante laboriosa. Compostos diméricos, do tipo arilglicerol β -aril éter e 1,2-diarilpropano-1,3-diol também têm sido usados para elucidar as reações individuais envolvidas na degradação de lignina (11).

Dois métodos para medir a atividade lignolítica de um sistema, destacam-se pela sua simplicidade. Um deles foi sugerido por Glenn e Gold (13) e aperfeiçoado por Ulmer e col. (14), e consiste no uso de corantes poliméricos como substrato. O outro método

mede a capacidade do sistema de catalisar a conversão de álcool veratrílico para aldeído veratrílico na presença de peróxido de hidrogênio (15).

Os fungos lignocelulolíticos podem ser classificados quanto ao tipo de degradação que causam na madeira, da seguinte forma a) fungos de decomposição branca ("white rot fungi"); b) fungos de decomposição parda ("brown rot fungi"); e c) fungos de decomposição branda ("soft rot fungi").

Os microorganismos degradadores de lignina mais eficientes até agora conhecidos são alguns fungos de decomposição branca, destacando-se entre eles *Phanerochaete chrysosporium* (11).

Considerando que o sistema lignolítico degrada uma variedade de substratos complexos, postulou-se que um catalizador não específico estava envolvido na degradação de lignina. Baseando-se neste fato sugeriu-se que espécies ativadas de oxigênio tais como ânion superóxido, peróxido de hidrogênio e oxigênio singlete estavam envolvidos na biodegradação de lignina (16).

O isolamento e purificação de uma hemoproteína, que na presença de H_2O_2 e O_2 degrada lignina e compostos modelos, foram realizados pela primeira vez por Tien e Kirk (15) e por Gold e col. (17) no ano 1983 a partir do fungo *P. chrysosporium*.

Estudos com compostos modelos do tipo β -O-4, têm demonstrado que existem dois modos de degradação por *P. chrysosporium*. O primeiro é iniciado por ruptura oxidativa entre C_α e C_β na parte glicerol da cadeia. O segundo mecanismo, também oxidativo, envolve uma ruptura inicial de O-C na ligação β -O-4 (18).

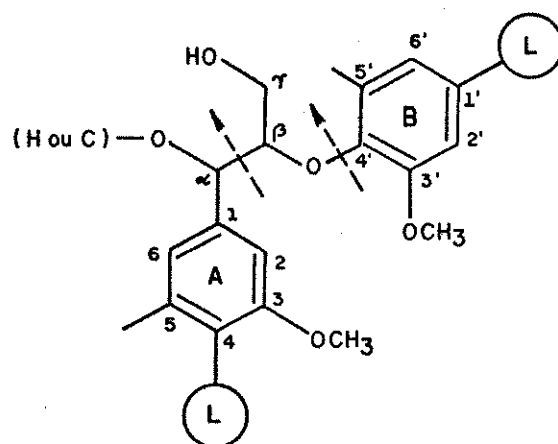


FIGURA 6. Sub-estrutura de lignina arilglicerol β -aril éter e sítios do ataque inicial na degradação fungal.

1.3 PROTEÍNAS UNICELULARES.

O termo "proteínas unicelulares" ("single-cell proteins": SCP) foi usado pela primeira vez por C.L. Wilson em 1966 (19), para designar as proteínas de microorganismos unicelulares, tais como algas, bactérias, leveduras e fungos, os quais podem ser cultivados em grande escala com a finalidade de serem usados como fonte de proteína na alimentação humana ou animal (20).

A composição dos aminoácidos de uma proteína determina, em princípio, o potencial nutritivo da mesma (21). Existem aminoácidos que não podem ser sintetizados em quantidades adequadas pelos animais superiores e devem ser obtidos através da dieta e são chamados de aminoácidos nutricionalmente essenciais (arginina, leucina, valina, isoleucina, lisina, histidina, metionina, treonina, fenilalanina, triptofano e tirosina) (22).

Existem dois processos para a produção de SCP a partir de materiais lignocelulósicos. Um deles obtém SCP através do crescimento direto de microorganismos em materiais lignocelulósicos pré-tratados. As dificuldades deste processo são que, geralmente, o conteúdo proteico dos microorganismos celulolíticos é baixo e a separação do microorganismo do resíduo não hidrolizado é difícil. No entanto, a simplicidade do processo o faz economicamente atrativo. O segundo processo consta de quatro etapas: a) pré-tratamento, b) produção de celulasas, c) hidrólise enzimática e d) assimilação ou fermentação. As dificuldades deste processo estão associadas ao maior número de etapas existentes em relação ao anterior (23).

1.4 PRÉ-TRATAMENTOS DA BIONASSA.

A conversão de material lignocelulósico em produtos tais como proteína unicelular, álcool, etc., somente é técnica e economicamente viável se o material for modificado mediante algum pré-tratamento (24).

O principal problema na bioconversão de materiais lignocelulósicos é a inacessibilidade das enzimas à celulose. Isto se deve a que a lignina está associada à celulose envolvendo-a, o que dificulta sua quebra completa. Além disso, existem fatores estruturais na celulose que dificultam sua hidrólise, tais como cristalinidade, grau de polimerização e estrutura microfibrilar (23).

Pensava-se que a cristalinidade era o fator determinante na hidrólise da celulose por enzimas ou ácidos (25), porém, trabalhos recentes demonstraram que este é um fator secundário (26), sendo o fator determinante a área superficial, isto é, a área de contato entre a enzima e o material.

Diversos pré-tratamentos têm sido sugeridos para melhorar a hidrólise enzimática dos lignocelulósicos. Alguns deles são classificados e apresentados na tabela Nº 2.

TABELA Nº 2

Métodos de pré-tratamentos de materiais lignocelulósicos.

A.- Físicos:	Moagem
	Pirólise
	Irradiação de alta energia, etc.
B.- Físico-Químicos:	Vapor
	Explosão com vapor, etc.
C.- Químicos:	Ácido, base
	Gás (ClO_2 , NO_2 , SO_2)
	Oxidação (H_2O_2 , ozônio)
	Solventes que solubilizam celulose
	Extração com solventes orgânicos, etc.
D.- Biológicos:	Maceração enzimática (pectinases)
	Bactérias
	Fungos

Os efeitos da luz no pré-tratamento de lignocelulósicos para uma posterior hidrólise enzimática vêm sendo estudados desde 1947 (27). A degradação fotoquímica de materias lignocelulósicos tais como madeira, celulose, hemicelulose e lignina foi extensivamente revisada por Hon (28). O pré-tratamento fotoquímico de palha, resíduos lignocelulósicos e hidroxipropano metil celulose mostrou modificações estruturais do material e um correspondente incremento na resposta microbiológica (29,30,31).

Recentemente, Durán e col. (32) encontraram que o pré-tratamento fotoquímico de celulose a $\lambda > 300$ nm é um bom método para aumentar a hidrólise da celulose pela celulase.

1.5 OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo o estudo das enzimas celulolíticas e lignolíticas produzidas pelo ascomiceto *Chrysomya sitophila* TFB 27441 utilizando diversas fontes de carbono tais como glicose, celulose microcristalina, α -celulose, α -celulose pré-tratada fotoquimicamente e casca de arroz.

Outro objetivo foi estudar a composição de aminoácidos da proteína unicelular obtida do fungo, visando uma aplicabilidade do mesmo na produção de rações animais deslignificadas e enriquecidas quanto ao teor proteico.

CAPITULO II**PARTE EXPERIMENTAL**

II PARTE EXPERIMENTAL.

II.1 MATERIAIS.

II.1.1 Reagentes e Procedência.

Ácido bórico	Merck
Ácido cítrico p.a.	QEEL Ind. Quim. S.A.
Ácido 3,5-dinitrosalicílico p.a.	Merck
Ácido ftálico	Merck
Agar U.S.P.	Biobras
Albumina (bovina)	Sigma
Alcool etílico	Merck
Anidrido acético p.a.	Carlo Erba
Bicarbonato de sódio	Merck
Biftalato de potássio	Ecibra
Borohidreto de sódio	Sigma
Carboximetil celulose	Sigma
Celulose alfa	Sigma
Celulose azure	Sigma
Celulose microcristalina 0,019 mm	Serva
Cloreto de cálcio	Ecibra
Cloreto de potássio p.a.	QEEL
Clorofórmio	Merck
Dicloreto de tiamina	Merck
Dioxano	Carlo Erba
Fenol U.S.P.	Fisher Sc. Co.

Fosfato de magnésio	Carlo Erba
Fosfato dipotássico	Carlo Erba
Fosfato mono potássico	Carlo Erba
Glicose	Quimis
Hidróxido de potássio	Merck
Hidróxido de sódio	Carlo Erba
Metabissulfito de sódio	Carlo Erba
Molibdato de sódio	Merck
Nitrato de sódio	Carlo Erba
4-Nitrofenol	Riedel-de Haen
o-Dianisidina	Sigma
Papel de filtro Nº 1	Whatman
Pentóxido de fósforo	Merck
Peróxido de hidrogênio	Merck
Peroxidase de raiz forte tipo I	Merck
Piridina	Merck
pNPG	Sigma
"Remazol Brilliant Blue R"	Sigma
Sacarose	Carlo Erba
Sephadex G-25-300	Sigma
Sulfato de ferro (II)	Ecibra
Sulfato de magnésio	Fisher Sc. Co.
Sulfato de manganês	Carlo Erba
Sulfato de cobre	Carlo Erba
Sulfato de metila	Aldrich
Sulfato de zinco	Carlo Erba
Tartarato de sódio	Quimis

Tartarato de sódio e potássio p.a.	Carlo Erba
Tris(hidroximetil)aminometano	Sigma
Triton X-100	Sigma
Vanilina	Prods. Quím. Labor

II.1.2 Instrumentação

Balança Mettler H54 AR.

Banho termostatzado com agitação Forma Scientific modelo 2564.

Espectrofotômetro Micronal modelo B-382.

Espectrofotômetro Baush & Lomb, Spectronic 2000.

Evaporador rotatório Rotadest LD-60.

Analizador de aminoácidos Beckman modelo 119 CL.

Estufa de cultivo modelo 116 Fabbe.

Autoclave vertical modelo 103 Fabbe.

Fluxo laminar Veco modelo VLFS 12.

Centrífuga Danon/IEC Division modelo IEC B-20A.

Lâmpada de vapor de mercúrio HQL-Osram, 125 Watt.

Potenciômetro E-512 Metrom Herisau.

Radiômetro YSY-Kettering model 65 A.

Sistema de cromatografia LKB 2137.

Sonicador Kinemática GmbH PCU 1.

II.2 MICROORGANISMOS E MEIOS DE CULTIVO.

II.2.1 Microorganismos.

Neste trabalho foram estudadas duas espécies de fungos, uma pertencente à classe dos ascomycetes (*C. sitophila*) e outra à dos basidiomycetes (*P. chrysosporium*).

Chrysonilia sitophila TFB 27441 foi isolado do trato intestinal do inseto *Tribolium ferrugineum* encontrado em amostras de casca de arroz procedentes do estado de Goiás (Brasil). Este fungo foi inicialmente denominado *Neurospora sitophila*, porém, posteriormente foi reclassificado como *C. sitophila*, uma vez que *N. sitophila* corresponde somente a um estado teleomórfico deste fungo (33).

Phanerochaete chrysosporium BKM-F-1767 (cepa ATCC 24725) foi cedido pelo Professor Juan L. Carrau (Universidade de Caxias do Sul, Brasil), e foi usado como padrão nos estudos de atividade lignolítica por ser o fungo melhor estudado neste campo.

II.2.2 Padronização dos Inóculos.

Fundamento do método:

Um dos fatores que influencia de maneira importante no crescimento, produção de enzimas e outros metabólitos de um fungo é o tamanho do inóculo, que é geralmente quantificado contando ao microscópio o número de esporos em suspensão. Em nosso caso, o

tamanho do inóculo foi padronizado de uma maneira mais simples que foi bastante reprodutível para os fins desejados.

Metodo:

Foram realizados cultivos de fungo em tubos de ensaio de 120 x 10 mm (Schott GL 14) contendo 3 ml de meio de Czapeck modificado (1,5 % de glicose, 3 % de agar) (ver 11.2.3). Estes tubos foram inoculados e incubados à 28 °C durante 24 h. O conteúdo micelar de cada tubo foi raspado e transferido para 10 ml de solução inoculante (Czapeck modificado) e agitado intensamente até dispersão total; 0,5 ml desta solução foi pipetado para cada 20 ml de meio.

11.2.3 Meios de cultivo.

Fundamento:

Os microorganismos precisam para seu crescimento, de um meio que deve conter uma fonte de carbono tal como glicose, amido, celulose, etc., além de sais minerais e de elementos traços. Outros fatores tais como o pH e a temperatura devem ser otimizados.

Meios:

Meio de Czapeck (34,35) modificado para o crescimento de *C. sitophila*:

Nitrato de sódio	3,0	g
Fosfato dipotássico	1,0	g
Sulfato de magnésio	0,5	g
Cloreto de potássio	0,5	g
Cloreto de cálcio	0,3	g
Sulfato de cobre ($\times 5 \text{ H}_2\text{O}$)	0,10	mg
Sulfato de ferro ($\times 7 \text{ H}_2\text{O}$)	0,20	mg
Sulfato de manganês	0,02	mg
Cloreto de zinco	0,15	mg
Água	1,0	l
Tampão biftalato 0,05 M (pH = 6).		
Temperatura de crescimento 28 °C.		

Para *Phanerochaete chrysosporium* foi usado o seguinte meio (36):

Nitrato de amônio	0,22	g
Fosfato monopotássico	2,00	g
Sulfato de magnésio	0,24	g
Cloreto de cálcio ($\times 2 \text{ H}_2\text{O}$)	0,10	g
Ácido ftálico	1,66	g
Tiamina	0,1	mg
Ácido cítrico monohidratado	0,5	mg
Sulfato de zinco (hepta hidratado)	0,5	mg
Sulfato de ferro (hepta hidratado)	0,071	mg
Sulfato de cobre (penta hidratado)	0,025	mg

Sulfato de manganês (monohidratado)	0,005	mg
Ácido bórico	0,005	mg
Molibdato de sódio (dihidratado)	0,005	mg
Água	1,0	l

O pH foi ajustado para 4,6 com hidróxido de potássio 6 N.

Temperatura de crescimento 28 °C.

II.3 ANÁLISE DAS ATIVIDADES CELULOLÍTICAS.

II.3.1. Métodos usando "celulose azure"

Fundamento dos métodos:

"Celulose azure" é uma celulose à qual foi ligada o corante "remazol brilliant blue R". É possível usá-la como fonte de carbono para o crescimento de um microorganismo e observar de forma qualitativa (visual) ou de forma quantitativa (medindo a absorbância) a liberação do corante à medida que a celulose vai sendo hidrolizada.

Método de Smith (37):

O meio de Czapeck modificado foi preparado sem fonte de carbono e usando 0,75 % de agar. Este meio foi distribuído em tubos de 120 x 10 mm em uma quantidade de 2 ml por tubo. Os tubos foram esterelizados à 121 °C por 15 min e, posteriormente solidificados em posição vertical.

Foi preparado meio de Czapeck modificado dissolvendo os componentes do meio em 2/3 do volume de água requerido (solução A). O terço de água restante foi misturado com "celulose azure" (solução B) para dar uma suspensão 2 %, uma vez que A e B fossem misturados.

As soluções A e B, foram esterilizadas separadamente e misturadas rapidamente. Uma alíquota de 0,5 ml desta mistura foi

pipetada assepticamente sobre o meio já preparado. Após o resfriamento dos tubos, foi inoculada uma suspensão do fungo (inóculo padrão 11.2.2).

Método quantitativo:

Foram realizadas culturas em meio líquido, de *C. sitophila* usado 20 ml de meio Czapeck contendo 2 % de "celulose azure", após centrifugar o caldo foi medida a absorbância a 595 nm, em diferentes intervalos de tempo.

11.3.2. Atividade em papel de filtro.

Fundamento do método:

Este ensaio é uma medida da atividade celulolítica total de um caldo de cultivo ou de uma solução de enzima. Foi sugerido e padronizado por Mandel e col. (9) e está baseado na reprodutibilidade da hidrólise produzida por enzimas celulolíticas, sobre um material celulósico padrão, como é o caso do papel de filtro Whatman Nº 1.

Método:

Um volume de 0,5 ml de sobrenadante da cultura e 1 ml de tampão citrato 0,05 M pH 4,8 foram adicionados num tubo com tampa de rosca de 18 mm contendo uma tira de papel de filtro Whatman

Nº1 de 1x6 cm. Após 1 hora de incubação à 50 °C, os açúcares liberados foram determinados pelo método do DNS (ver 11.6.1). Mediu-se também a glicose liberada, pelo método do Tris-glicose oxidase (TGO) (ver 11.6.2). Uma unidade de FPA é definida como a quantidade de enzima (ml de caldo) necessária para liberar um micromol de glicose por minuto.

11.3.3 Atividade Endo-1,4- β -D-glicanase.

Fundamento do método:

Este ensaio mede os açúcares liberados de uma celulose solúvel (carboximetilcelulose) que permite uma melhor ação das endo-glicanases e foi desenvolvido por Mandels e col. (9).

Método:

Foram adicionados 0,5 ml de sobrenadante do caldo de cultivo a 0,5 ml de uma solução 1 % de carboximetilcelulose (CMC) em tampão citrato 0,5 M (pH = 4,8) e incubados por 30 minutos à 50 °C; os açúcares liberados foram determinados pelo método do DNS (ver 11.6.1). Uma unidade de atividade Endo-1,4- β -D-glicanase é definida como a quantidade de enzima (ml de caldo) que libera 1 μ mol de glicose por minuto.

11.3.4 Atividade de β -glicosidase.

Fundamento do método:

A atividade β -glicosidase foi determinada usando p-nitro-fenil- β -D-glicopiranoside (pNPG) (38) que é um substrato que simula a estrutura da celobiose (figura 7). O fenolato do produto liberado (p-nitrofenol) é medido espectrofotometricamente a 400 nm.

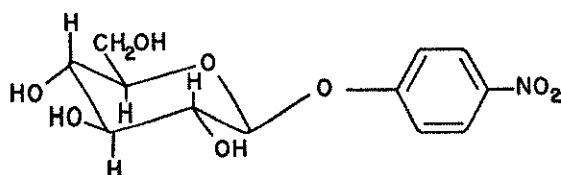


FIGURA 7. Estrutura do pNPG.

Método:

Foram adicionados 100 μ l de sobrenadante do caldo a 1,0 ml de pNPG 2 mM dissolvidos em tampão acetato 0,05 M (pH=5,0). Após 5 minutos de incubação à 40 ° C, a reação foi interrompida pela adição de 2,0 ml de uma solução de bicarbonato de sódio 1 M e a absorbância foi lida a 400 nm. Uma unidade de atividade glicosidase é definida como a quantidade de enzima que libera 1 μ mol de p-nitrofenol por minuto.

II.4 ANALISE DA ATIVIDADE LIGNOLÍTICA.

II.4.1 Por descoloração de "remazol brilliant blue R" (RBB).

Fundamento do método:

Este ensaio está baseado na degradação de RBB com concomitante perda da cor, como proposto por Ulmer e col. (14).

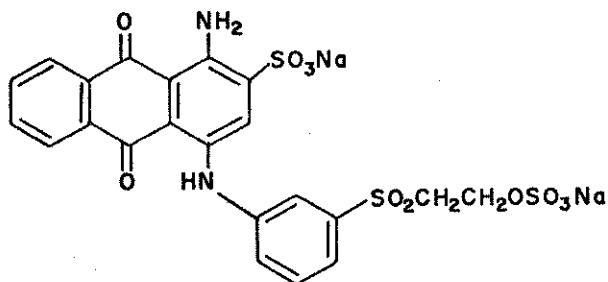


FIGURA 8. Estrutura do "remazol brilliant blue R" (RBB).

Método:

Foram adicionados 100 µl de uma solução de RBB 2 % a 10 ml de cultura. Após 1 hora, à 28 °C, 0,1 ml desta mistura foi diluída para 1,0 ml com água destilada e as absorbâncias à 585 nm e à 500 nm foram medidas. O resultado foi expresso segundo a fórmula seguinte:

$$\text{Razão absorbância} = \text{ABS}_{\frac{585}{500}} (\text{branco}) - \text{ABS}_{\frac{585}{500}} (\text{amostra})$$

ABS₅₈₅₅₀₀ (branco) foi obtida usando meio de cultivo não inoculado.

Para este ensaio, o corante foi purificado usando um equipamento cromatografico LKB e coluna de 2 x 60 cm empacotada com sephadex G-25-300 para remover impurezas.

II.4.2 Por oxidação de álcool veratrílico.

Fundamento do método:

Foi proposto por Tien e Kirk (15) que a capacidade de uma solução enzimática de oxidar álcool veratrílico para aldeído veratrílico esta diretamente relacionada com a sua atividade lignolítica.

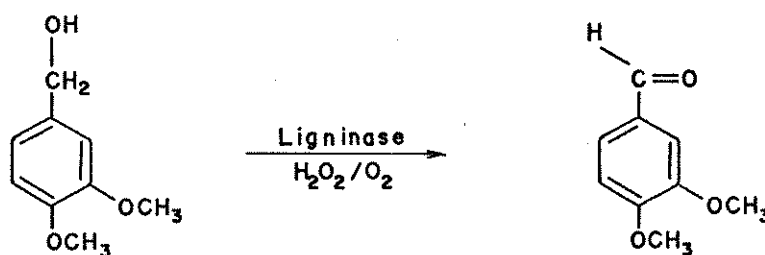


FIGURA 9. Oxidação de álcool veratrílico por ligninase.

Método:

Foram adicionados 550 μ l de sobrenadante da cultura e 200 μ l de peróxido de hidrogênio 2,0 mM a 250 μ l de uma solução de álcool veratrílico 8 mM, em tampão tartarato de sódio 0,4 M (pH = 2,5). O aparecimento do aldeído veratrílico, foi determinado lendo-se a absorbância a 310 nm. Uma unidade internacional (UI) foi definida como a quantidade de enzima que oxida 1,0 μ mol de álcool veratrílico para aldeído veratrílico por minuto. O aldeído veratrílico foi sintetizado a partir de vanilina (ver apêndice).

II.4.3 Por modificação da Absorbância da lignina.

Fundamento do método:

A lignina de casca de arroz extraída com dioxano (ver II.7.1), tem uma absorbância característica ao redor de 285 nm (39), esta absorbância é modificada pelo ataque enzimático (40).

Método:

C. sitophila foi incubada em frasco Erlenmeyer de 125 ml contendo 10 ml de meio Czapeck modificado usando-se glicose e lignina nas seguintes proporções:

Glicose	Lignina
1,0 %	0,1 %
0,5 %	0,1 %
0,0 %	0,1 %
1,0 %	0,0 %

A lignina-dioxano foi adicionada segundo descrita em 11.4.4. Após diversos intervalos de crescimento, o meio foi sonificado e centrifugado. A cada 0,5 ml foram adicionados 4,5 ml de KOH 0,55 % (P/V) e absorbância foi lida a 284 nm.

11.4.4 Atividade lignolítica induzida por lignina.

Fundamento do método:

Em estudos com *P. chrysosporium*, foi descrito que a lignina presente no meio de cultura atua como indutor, aumentando a produção de ligninase (14).

Método:

A lignina dioxano (ver 11.7.1) foi dissolvida em KOH 0,2 M para dar uma concentração de 25 g/l. Foram adicionados assepticamente 0,4 ml desta solução a 10 ml de meio de cultivo esterilizado (Zcapeck modificado 1 % de glicose) e o pH ajustado para 6,0 com H_3PO_4 . Este meio foi inoculado com *C. sitophila* e mantido sem agitação.

A atividade lignolítica foi ensaiada em vários intervalos de tempo pelo método do "Remazol Brilliant Blue R" (ver 11.4.1).

11.5 ANÁLISE DE PROTEÍNAS.

11.5.1 Método do Biureto.

Fundamento do método:

A reação do biureto ocorre com todos os compostos que contém duas ou mais ligações peptídicas. A cor azul produzida é atribuída a um complexo de coordenação entre o cobre e quatro átomos de nitrogênio, dois de cada cadeia peptídica adjacentes (41).

Método:

Para preparar o reagente do biureto (42) adicionaram-se 2,6 g de sulfato de cobre penta hidratado e 9,0 g de tartarato de sódio e potássio a 500 ml de uma solução 0,2 N de hidróxido de sódio contendo 5,0 g de iodeto de potássio; elevou-se o volume para 1,0 litro com uma solução 0,2 N de hidróxido de sódio.

Para a análise de proteína, adicionou-se 1,5 ml de reagente de biureto a 1,0 ml de solução investigada, misturou-se e aqueceu-se durante 10 min à 37 °C. Enfriou-se à temperatura ambiente e a absorbância foi lida em 540 nm. A concentração de proteína foi determinada através de uma curva de calibração usando uma solução de albumina como padrão.

11.5.2 Análise de Aminoácidos.

Fundamento do método:

Está baseado na diferença do tempo de retenção dos diversos aminoácidos quando passados por uma coluna cromatográfica. É possível quantificar e identificar os diversos aminoácidos comparando-os com um padrão.

Método:

O micélio do fungo foi hidrolizado com HCl 6 N na presença de β -mercaptoetanol (5 μ l/ 10 ml de HCl 6 N) em atmosfera de nitrogênio por 24 h em tubo fechado. O material obtido foi posteriormente analisado em analisador de aminoácidos

11.6 ANÁLISE DE AÇÚCARES

11.6.1 Análise de açúcares redutores (método do DNS) (43).

Fundamentos do método:

Baseia-se na leitura espectrofotométrica da cor provocada pela redução do ácido 3,5-dinitrossalicílico a 3-amino-5-nitrossalicílico pelos grupos aldeído dos açúcares redutores

Método.

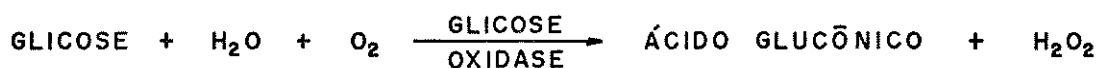
O reagente DNS foi preparado dissolvendo-se 10,6 g de ácido 3,5-dinitrossalicílico e 19,8 g de hidróxido de sódio em 1,4 l de água destilada. A esta solução foram adicionados 306 g de tartarato de sódio e potássio, 7,6 ml de fenol (p.f. 50 °C) e 8,3 g de meta bissulfito de sódio.

Adicionou-se 3,0 ml de reagente DNS a 1,5 ml de amostra e incubou-se em um banho de água à 100 °C por 5 minutos. Esfriou-se à temperatura ambiente. A absorbância foi lida a 550 nm e comparada com uma curva padrão.

11.6.2 Análise de glicose (método do TGO) (44).

Fundamento do método

Este método está baseado na oxidação da glicose para ácido glucônico pela glicose oxidase com a geração de peróxido de hidrogênio. Este reage quantitativamente com o sistema peroxidase/o-dianizidina formando um produto colorido que absorve a 420 nm. A absorção é diretamente proporcional à concentração de glicose.



Método

O reagente TGO foi preparado adicionando-se 1,0 ml de solução de o-dianisidina (0,03 M) e 1,0 ml de solução de triton X-100 20 % a 100 ml de tampão Tris 0,5 M pH 7,0. Filtrou-se a vácuo para eliminar partículas em suspensão. Ao filtrado adicionou-se 4 mg de glicose oxidase e 0,5 ml de solução de peroxidase (8 mg/ml. Esta solução foi agitada e mantida no escuro a 4 °C, condições nas quais foi estável por vários dias.

Para o teste de glicose foram adicionados 3,0 ml de reagente TGO a 0,2 ml de amostra contendo 0,3 a 1,0 mg/ml de glicose. Esta mistura foi incubada durante 90 minutos à 40 °C. A absorbância lida a 420 nm foi comparada com uma curva padrão.

11.7 OUTROS MÉTODOS

11.7.1 Extração de lignina de casca de arroz com dioxano.

Fundamento do método:

Este método de extração foi desenvolvido por Pepper e col. (45) baseando-se no fato que a mistura dioxano-água-HCl solubiliza a lignina causando poucas modificações na sua estrutura.

Método:

A casca de arroz 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 0,2 N em ácido clorídrico, 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% (P/V) 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.

II.7.2 Análise de ácido cítrico (46).

Fundamento do método:

Baseia-se na leitura espectrofotométrica da cor do derivado do ácido cítrico quando reage com anidrido acético na presença de piridina.

Método:

A 1,0 ml de caldo foram adicionados 1,3 ml de piridina sob agitação. Adicionaram-se a esta solução 5,7 ml de anidrido acético e a mistura foi deixada em repouso por 30 minutos à 30 °C. A absorbância foi lida a 420 nm.

II.7.3 Irradiações da celulose.

As irradiações foram realizadas com uma lâmpada de vapor de mercúrio HQL-Osram, a velocidade de fluência, determinada com um radiômetro YSI-Kettering (modelo 65 A), foi de $68,4 \text{ W/m}^2$ para $\lambda > 300 \text{ nm}$ e $108,0 \text{ W/m}^2$ para $\lambda > 254 \text{ nm}$. A distância da amostra em relação à lâmpada foi de 17 cm. As irradiações foram realizadas colocando-se 300 mg de celulose numa placa de vidro de $20 \times 20 \text{ cm}$ formando uma monocamada e coletadas a diferentes tempos de irradiação. Para as irradiações a $\lambda > 300 \text{ nm}$ foi utilizado um filtro de vidro Pyrex transparente.

11.7.4 Determinação do peso seco.

O meio de cultivo contendo celulose e fungo foi filtrado e secado durante 12 h a 80°C . O peso deste resíduo foi denominado peso seco.

CAPÍTULO III

RESULTADOS E DISCUSSÃO

III RESULTADOS E DISCUSSÃO.

III.1 PRODUÇÃO DE ENZIMAS CELULOLÍTICAS.

Numa primeira etapa, observou-se de forma qualitativa a capacidade de *C. sitophila* em degradar celulose. Para este fim foi usado o ensaio com "celulose azure". Na figura 10, pode-se observar a difusão da cor azul, causada pelo corante "remazol brilliant blue R" que é liberado à medida que a celulose vai sendo hidrolizada pelo fungo.

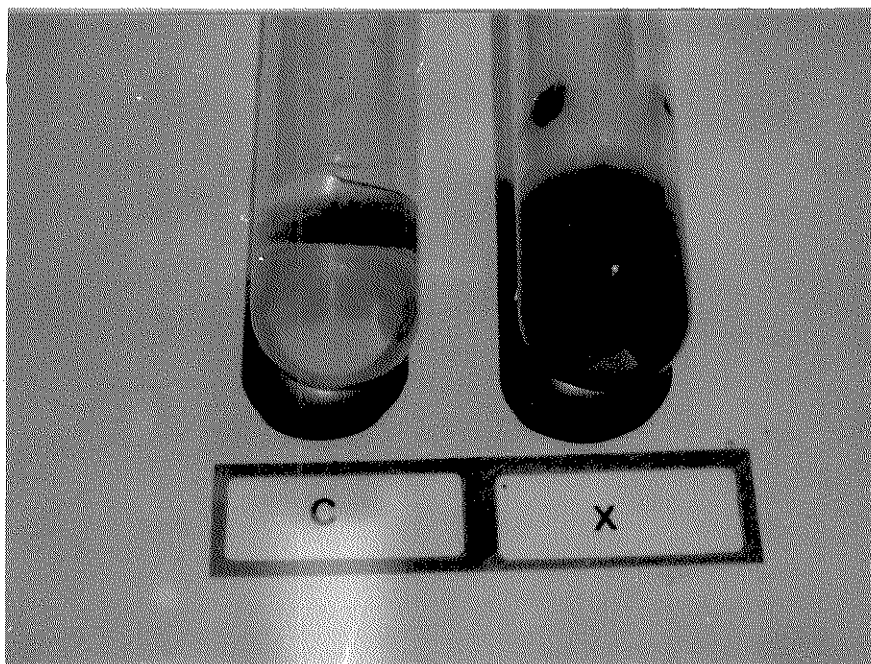


FIGURA 10 . Ensaio qualitativo da capacidade celulolítica de *C. sitophila* TFB 27441. C: Controle e X: Tubo inoculado (ver II.3.1).

Usando o mesmo princípio, porém em meio líquido, é possível quantificar a liberação da cor lendo a absorbância a 595 nm.

A figura 11 mostra a absorbância do meio de crescimento a diferentes tempos quando "celulose azure" é usada como única fonte de carbono. Estes valores indicam que *C. sitophila* alcança uma atividade máxima após 84 horas de crescimento. Existe uma correlação linear entre a absorbância a 595 nm de "remazol brilliant blue R" e a concentração de glicose - uma unidade de absorbância equivale aproximadamente a 12 mg/ml de glicose produzidos (7). Na figura 11 pode-se observar que em 48 h de crescimento a absorbância é de 0,170 unidades o que equivale aproximadamente a 2,0 mg de glicose por ml. Este valor significa que em 48 h, 20 % da celulose presente foi hidrolizada. Acima deste valor o método não é linear (7).

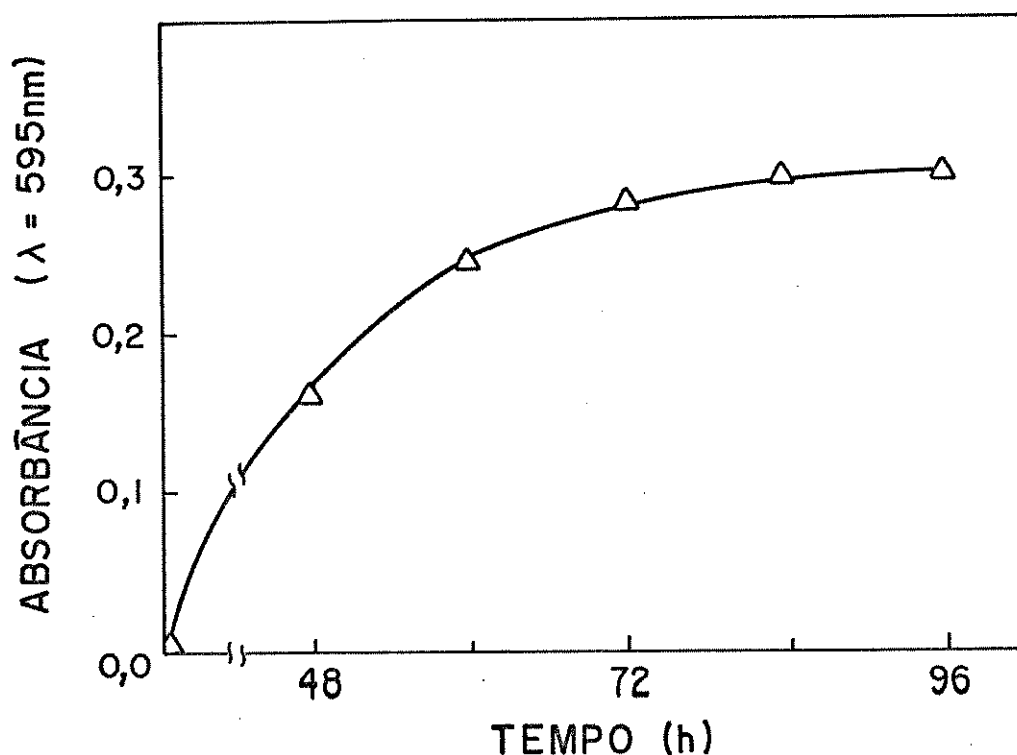


FIGURA 11 . Absorbância a 595 nm a diferentes tempos de crescimento de *C. sitophila* TFB 27441, usando "celulose azure" como fonte de carbono (ver 11.3.1).

A quantificação das enzimas celulolíticas produzidas por *C. sitophila* foi realizada usando como fonte de carbono α -celulose em meio de Czapeck modificado sob agitação (figura 12).

β -glicosidase e endo-1,4- β -D-glicanase alcançam a atividade máxima no quarto dia após o qual a primeira delas começa a decair e a segunda permanece quase constante. A atividade em papel de filtro alcança o máximo no quinto dia e em seguida permanece constante.

Na tabela Nº 3 são mostradas as atividades celulolíticas de *C. sitophila* comparadas com as de *T. reesei* QM 6a, a cepa selvagem do fungo produtor de celulases mais eficiente e melhor estudado. Esta comparação é feita com a finalidade de avaliar melhor estes resultados. Observa-se que quando o substrato de crescimento é α -celulose ou celulose microcristalina, as atividades celulolíticas relativas à FPA são mais baixas para *C. sitophila* que para *T. reesei*. Esta situação muda bastante quando o substrato de crescimento é glicose. Isto nos leva a pensar que as enzimas celulolíticas (FPA) de *C. sitophila* são constitutivas, ou seja que quanto maior o crescimento fungal, maior a produção delas. No caso de *T. reesei* as enzimas celulolíticas são principalmente induzidas pelo substrato.

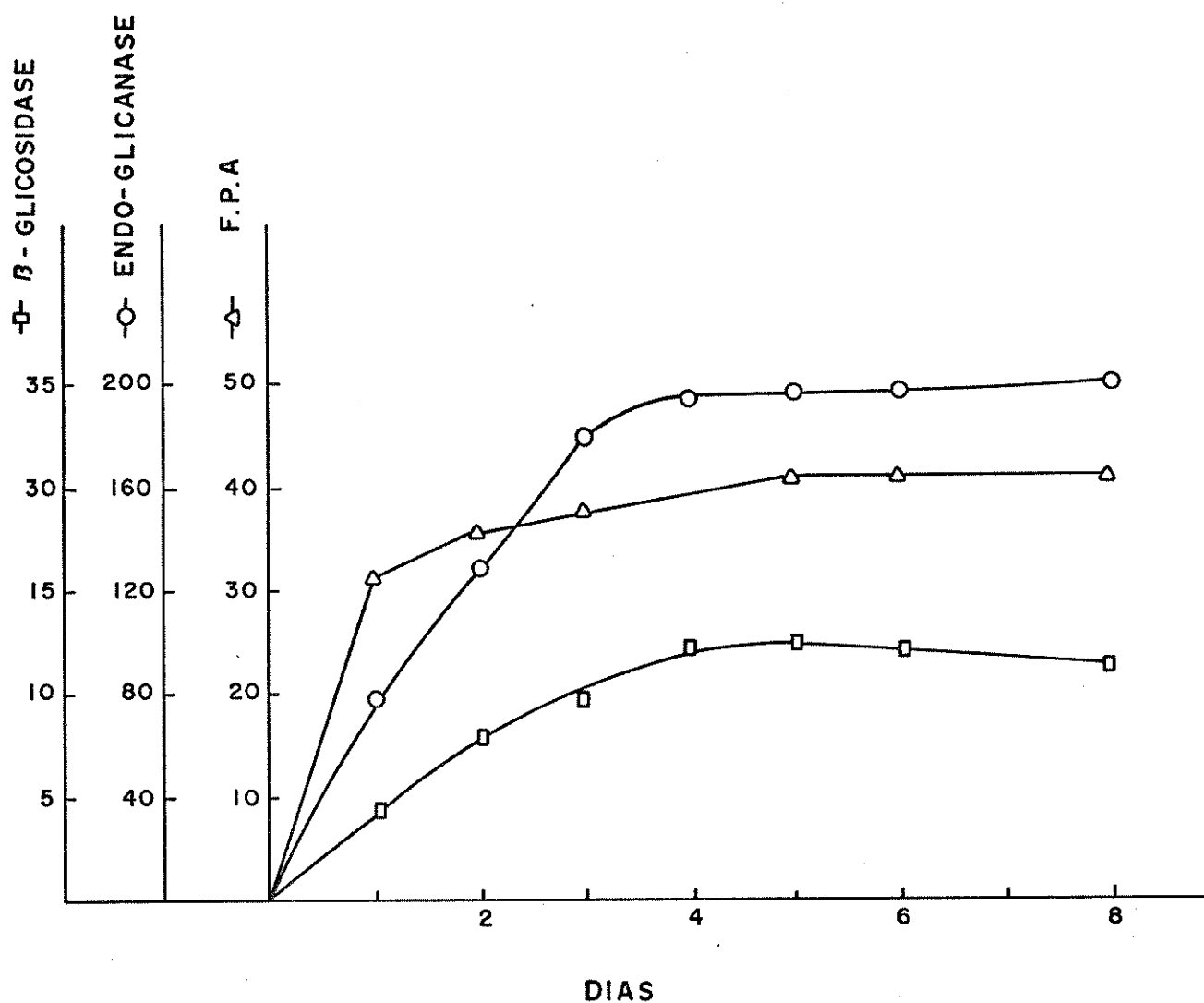


FIGURA 12. Produção de celulases por *C. sitophila* TFB 27441 usando α -celulose como fonte de carbono em cultura com agitação. As atividades estão expressas em U.I/l.

Tabela Nº 3. Atividade celulolítica (U.I./ml) de *C. sitophila* TFB 27441 (no quarto día) e *T. reesei* QM-6a (no décimo terceiro día de crescimento), em diferentes substratos ([substrato] = 1 %)

	<i>C. sitophila</i>	<i>T. reesei</i> (*)
Substrato: α -celulose		
FPA	0,05	0,17
β -glicosidase	0,01	0,20
Endo-glicanase	0,20	14,0
Substrato: celulose microcristalina		
FPA	0,01	0,04
β -glicosidase	0,04	0,04
Endo-glicanase	0,08	0,30
Substrato: glicose		
FPA	0,23	0,05
β -glicosidase	0,02	/
Endo-glicanase	0,05	0,90

(*) ref. (47).

III.1.1. Conclusões.

As enzimas celulolíticas de *C. sitophila* TFB 27441 são produzidas em baixa quantidade quando se usa a celulose como substrato de crescimento, porém estas aumentam quando a fonte de carbono permite um maior crescimento como é o caso da glicose. Contudo, estes valores não alcançam aqueles obtidos com fungos hipercelulolíticos como é o caso de *T. reesei* 9414 (FPA 5,0 U/ml) e *T. reesei* C-30 (FPA 13,6 U/ml) (48). Portanto este fungo deveria ser mutado como aconteceu com a cepa selvagem de *T. reesei*, se se quiser usá-lo para produzir celulasas.

Esta baixa atividade celulolítica pode ser uma vantagem quando se pensa no uso de *C. sitophila* em processos tais como polpamento biológico, onde é de relevante importância a conservação da celulose.

III.2 PRÉ-TRATAMENTO FOTOQUÍMICO PARA A PRODUÇÃO DE CELULASES.

A produção de enzimas celulolíticas usando celulose pré-tratada com luz ultravioleta foi estudada realizando as experiências em triplicata usando os seguintes substratos:

- α -celulose.
- α -celulose irradiada com $\lambda > 254$ nm durante 6 horas.
- α -celulose irradiada com $\lambda > 254$ nm durante 12 horas.
- α -celulose irradiada com $\lambda > 300$ nm durante 6 horas.
- α -celulose irradiada com $\lambda > 300$ nm durante 12 horas.

Destas culturas os seguintes parâmetros foram estudados : peso seco, atividade em papel de filtro (FPA), proteína solúvel, açúcares redutores, ácido cítrico e pH (nesta experiência o pH do meio não foi tamponado).

Observando o gráfico da variação do peso seco (figura 13) podemos ver que a irradiação a $\lambda > 254$ nm durante 6 horas é efetiva para aumentar o crescimento fungal (aumenta duas vezes comparado com o crescimento na amostra sem irradiar). Isto não deve ser considerado como uma medida absoluta, devido ao fato de que o peso seco representa o peso do micélio mais o peso da celulose não consumida. Porém como a celulose é a única fonte de carbono, esta medida pode ser considerada como um parâmetro aceitável de crescimento.

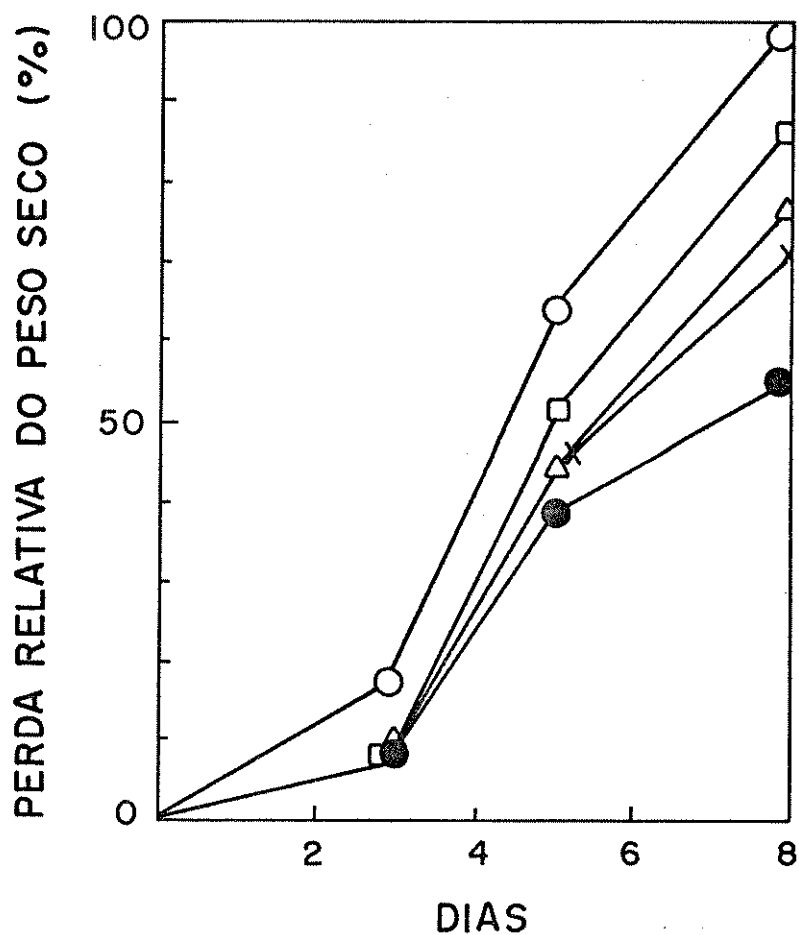


FIGURA 13. Perda relativa do peso seco de culturas de *C. sitophila* crescendo em α -celulose pré-tratada (cultura estacionaria, meio não tamponado). (-●-) celulose não irradiada, (-○-) e (-□-) irradiadas a $\lambda > 254\text{ nm}$ por 6 e 12 hrs respetivamente, (-△-) e (-X-) irradiadas a $\lambda > 300\text{ nm}$ por 6 e 12 hrs respetivamente (ver II.6.3)

Podemos ver também, que o aumento do crescimento não é proporcional ao número de fótons usados no pré-tratamento, uma vez que a amostra irradiada a $\lambda > 300$ nm durante 12 horas teve um crescimento comparável àquela irradiada 6 horas a $\lambda > 300$ nm. Isto pode ser explicado considerando que o índice de cristalinidade e a área superficial específica não variam linearmente com o tempo de irradiação (49).

No estudo da produção de celulasas (figura 14), vemos que para um maior decréscimo no peso seco (figura 13), não é maior a produção de enzimas. Por exemplo, na amostra irradiada a $\lambda > 254$ nm durante 6 horas se tem o maior decréscimo no peso seco, entretanto este tempo e comprimento de onda de irradiação não corresponde na figura 14 a uma maior produção de celulasas. Foi observado por Mandels (47) que a produção de celulasas é função do substrato, e é maior quando a celulose não é facilmente degradada pelo fungo. Em nosso caso, aparentemente o aumento na produção de celulase seja devido a mudanças locais na rede cristalina da celulose.

A produção de celulasas mostrou-se mais efetiva no pré-tratamento a $\lambda > 254$ nm durante 12 horas (figura 14).

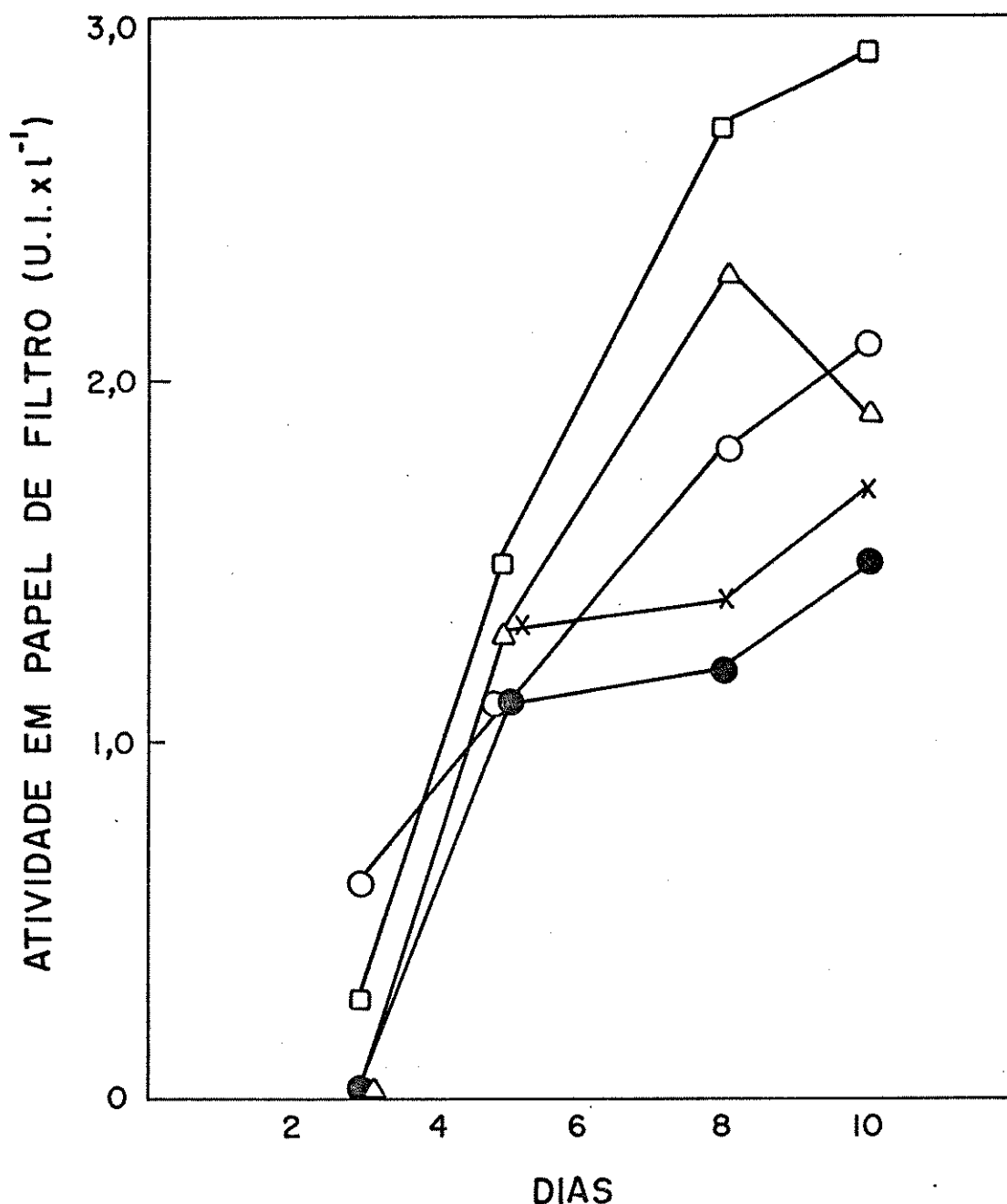


FIGURA 14. Produção de celulase (atividade em papel de filtro) de *C. sitophila* crescendo em α -celulose pré-tratada (culturas sem agitação, meio não tamponado). (●) celulose não irradiada, (○) e (□) irradiadas a $\lambda > 254$ nm por 6 e 12 hrs respectivamente, (△) e (×) irradiadas a $\lambda > 300$ nm por 6 e 12 hrs respectivamente.

A produção de proteína extracelular (figura 15), aumenta em todos os casos em que as amostras foram irradiadas. Observa-se um comportamento diferente em celulose irradiada com $\lambda > 254$ nm durante 6 horas, onde se tem um máximo de 0,9 mg/ml de proteína no quinto dia de crescimento fungal, para depois diminuir. Considerando que na atividade em papel filtro, nas mesmas condições (6 horas, $\lambda > 254$ nm) não se observa o mesmo comportamento (figura 14), pode-se sugerir que, provavelmente há produção de enzimas com atividade diferente a FPA. O decréscimo de proteína no meio, após o quinto dia de crescimento, talvez seja devido a um processo de adsorção das enzimas na celulose.

Foram medidos os açúcares liberados na hidrólise do papel de filtro, pelo método do DNS (açúcares redutores totais) e pelo método do Tris-glicose oxidase (glicose). Não foi encontrada diferença entre estas duas análises, isto é indicativo de que a celulose e os oligossacarídeos produzidos na hidrólise são efetivamente levados até glicose o que é de utilidade num processo industrial. O mesmo foi encontrado na dosagem dos açúcares presentes no meio de cultivo, que deu um valor de 0,02 mg/ml, tanto para glicose como para açúcares redutores totais.

O pH do meio de cultura é modificado pelo crescimento fungal como mostra a figura 16. O meio permanece ao redor de pH 7,5 para as amostras não irradiadas até o oitavo dia de crescimento, a partir do qual se observa um aumento brusco. Nas amostras irradiadas o pH começa a aumentar a partir do terceiro dia.

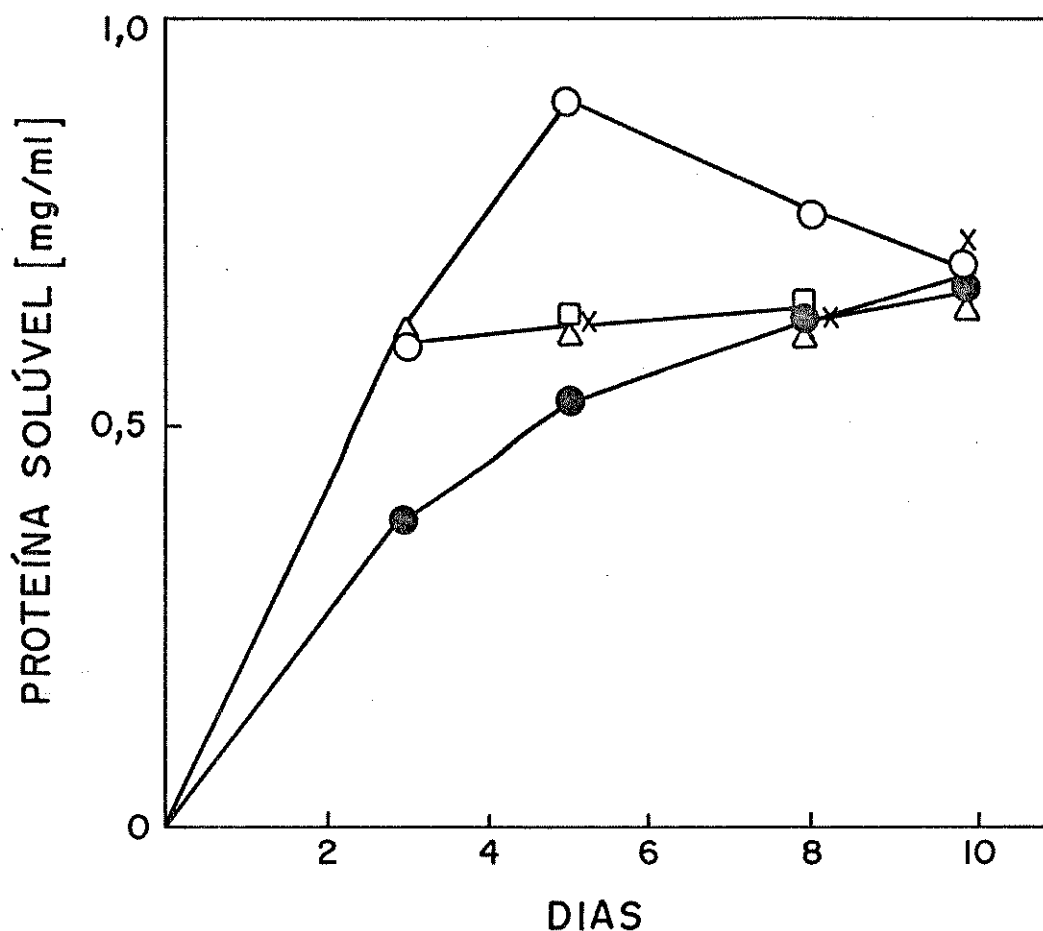


FIGURA 15. Produção de proteína solúvel por *C. sitophila* TFB 27441 usando α -celulose pré-tratada em culturas sem agitação (meio não tamponado). (-●-) celulose não irradiada, (-○-) e (-□-) irradiadas a $\lambda > 254\text{ nm}$ por 6 e 12 hrs respectivamente, (-△-) e (-X-) irradiadas a $\lambda > 300\text{ nm}$ por 6 e 12 hrs respectivamente.

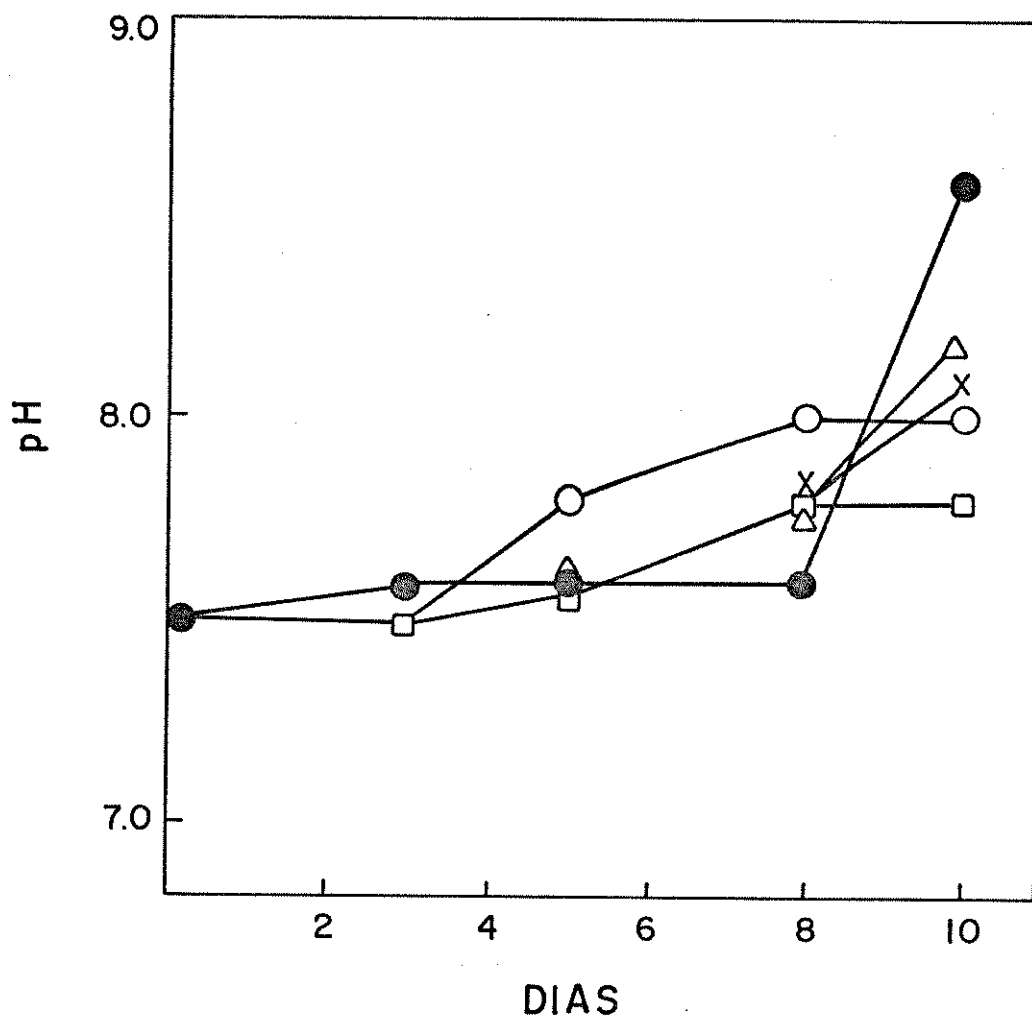


FIGURA 16. Variação do pH do meio de crescimento de *C. sitophila* TFB 27441 usando α -celulose pré-tratada em culturas sem agitação (meio não taponado). (●) celulose não irradiada, (○) e (□) irradiadas a $\lambda > 254\text{ nm}$ por 6 e 12 hrs respectivamente, (△) e (×) irradiadas a $\lambda > 300\text{ nm}$ por 6 e 12 hrs respectivamente.

O fato do *C. sitophila* não mudar bruscamente o pH do meio até o oitavo dia, é uma vantagem quando se tem interesse em processos em grande escala, uma vez que as mudanças do pH no meio de cultura podem influenciar diminuindo o crescimento e a estabilidade das enzimas produzidas.

Nas amostras pré-irradiadas com $\lambda > 300$ nm durante 6 e 12 horas, encontrou-se 5 % de citrato no meio de cultura, e 0 % nas outras amostras. Este é um fato interessante visto que só no material irradiado a $\lambda > 300$ nm se induz a produção de citrato, o que confirmaria a hipótese de mudanças nos metabólitos quando a celulose é modificada em sua estrutura por luz UV.

1.2.1 Conclusões

O pré-tratamento fotoquímico apresenta-se como um método que produz mudanças na estrutura da celulose que permite a indução de celulase e de outros metabólitos como no caso do citrato. Para a indução de celulases, a irradiação num comprimento de onda de 254 nm por 12 h foi o mais adequado.

III.3 PRODUÇÃO DE ENZIMAS LIGNOLÍTICAS.

Foi estudada a produção de enzimas lignolíticas por *C. sitophila* e *P. chrysosporium* e estes valores comparados com os dados da literatura para este último. Na tabela Nº 4, são mostrados os resultados obtidos por descoloração de RBB e a oxidação do álcool veratrílico.

TABELA Nº 4.

Atividade lignolítica de *C. sitophila* e *P. chrysosporium*.

<i>C. sitophila</i>		<i>P. chrysosporium</i>		<i>P. chrysosporium</i> (a)		
DIAS	RBB(b)	U/l(c)	RBB(b)	U/l(c)	RBB(b)	U/l(c)
1	0	0	0	0	0	0
2	33	4	5	0	8	0
3	56	7	9	5	13	23
4	67	67	42	2	17	15
6	58	18	9	0	13	9
8	58	2	9	0	10	4
10	58	2	9	0	8	5

(a): Valores referidos em literatura para *P. chrysosporium* BKM F. 1767 (14, 50).

(b): Δ razão absorbância $\times 100 / \Delta$ razão absorbância máxima.

(c): μ moles de álcool veratrílico transformados a aldeído veratrílico por litro de caldo de cultivo por minuto.

Os valores apresentados na tabela Nº 4 são surpreendentes, se considerarmos que *P. chrysosporium* é o microorganismo com maior atividade lignolítica, conhecido até hoje. *C. sitophila* TFB 27441, apresenta uma atividade significativamente maior que os valores obtidos em nosso laboratório ou os referidos na literatura, para *P. chrysosporium* BKM F. 1767.

Na figura 17 pode-se observar a produção de ligninase medida pela oxidação de álcool veratrílico. Nesta figura estão considerados os valores máximos e mínimos obtidos em cada medida.

A produção e indução de ligninases por lignina pode ser observada na figura 18, a atividade foi medida usando "remazol brilliant blue R". Estes resultados nos indicam que *C. sitophila* pode induzir uma quantidade aproximadamente 25 % a mais de enzima que a constitutiva quando o substrato (lignina) esta presente. Esta indução não alcança a magnitude referida para *P. chrysosporium* (14), porém, a quantidade de enzima produzida neste caso, ainda esta muito abaixo da quantidade de ligninase constitutiva de *C. sitophila*.

A figura 19 apresenta o espectro de absorção da lignina dióxano onde se observa um máximo característico a 284 nm. A figura 20 mostra como varia a absorbância em 284 nm em função dos dias de crescimento fungal. Deste último gráfico podem ser obtidas duas informações importantes. Uma delas é que na ausência de glicose, a lignina não é modificada e que com quantidades crescentes de glicose aumenta a intensidade da modificação.

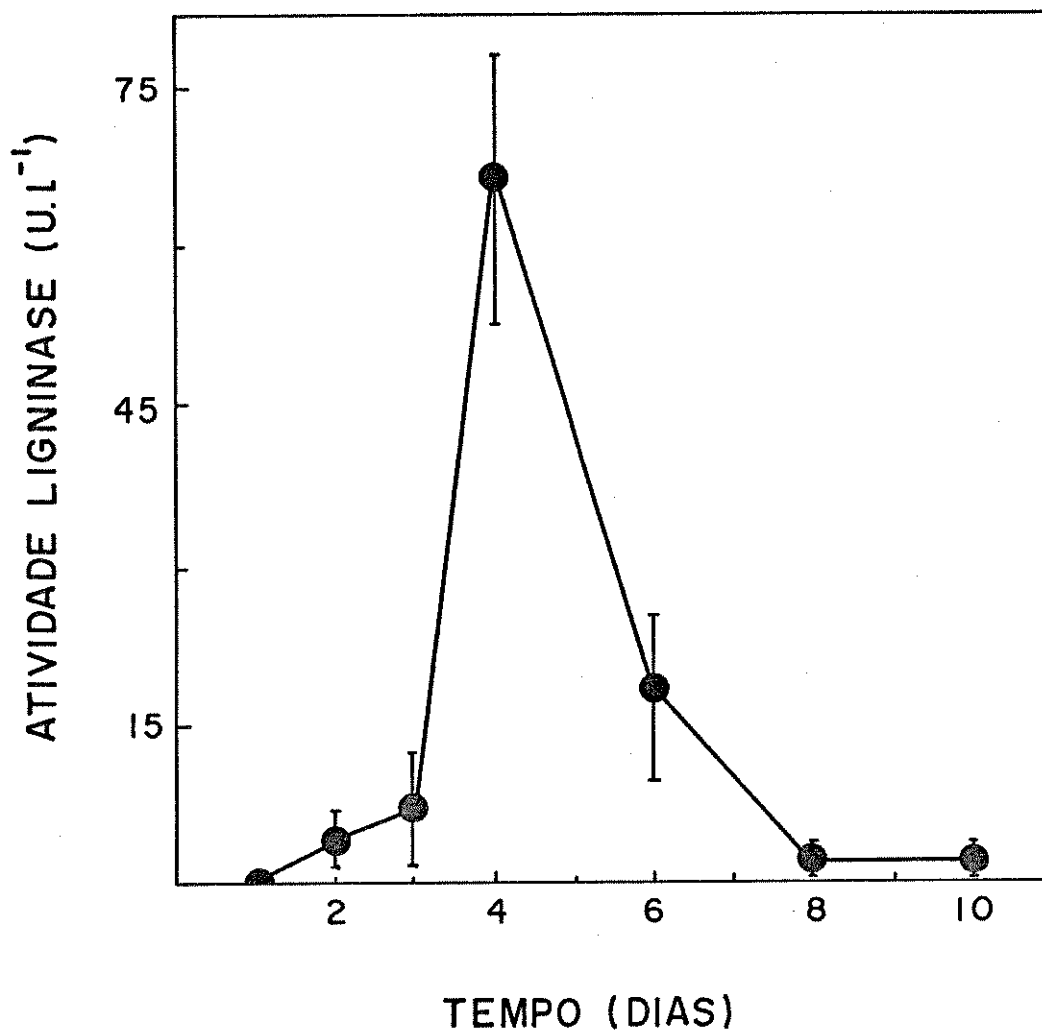


FIGURA 17. Produção de ligninases por *C. sitophila*, medida pela oxidação de álcool veratrílico (meio de Czapeck 1 % de glicose). (ver 11.4.2).

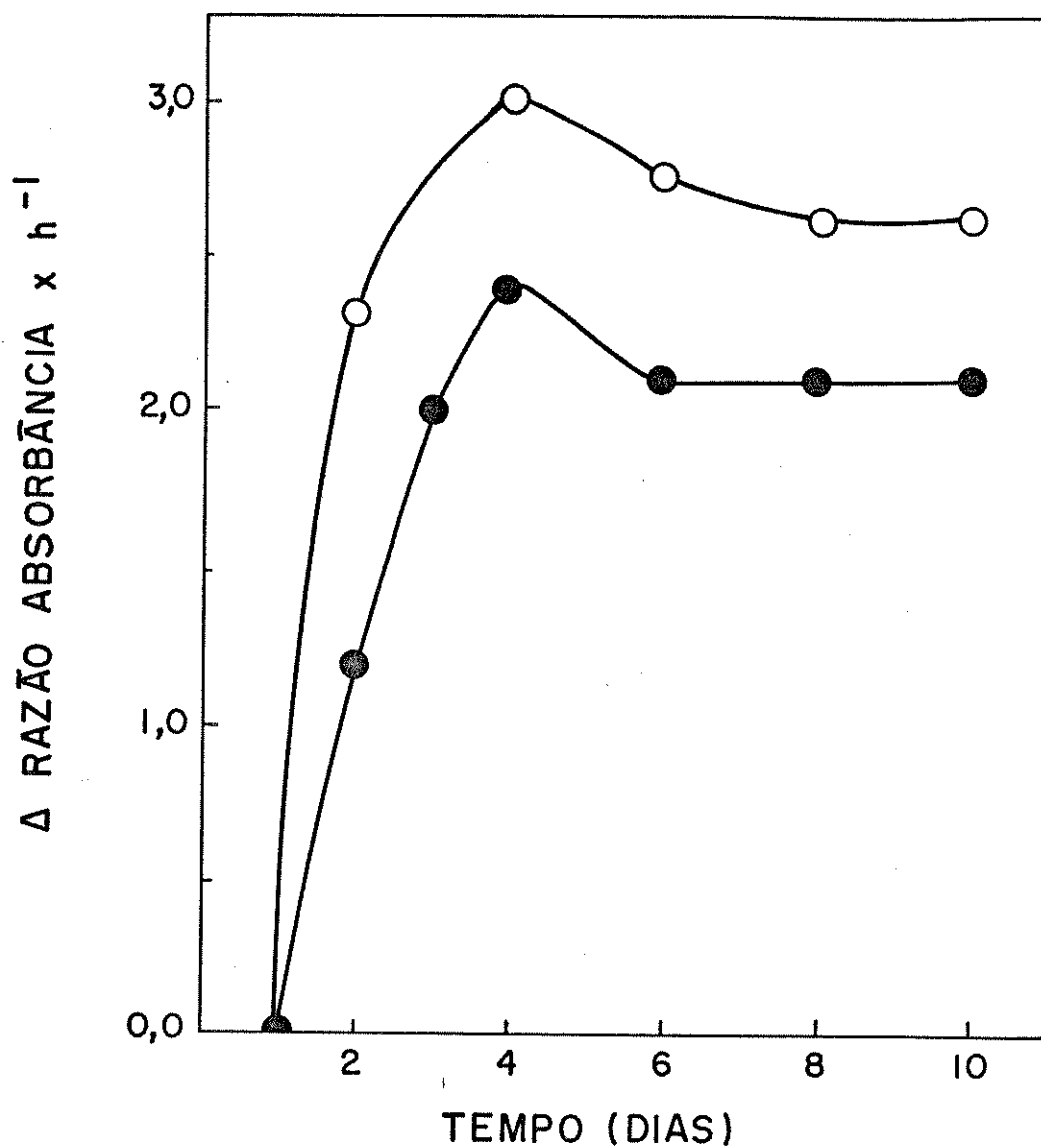


FIGURA 18. Produção e indução de ligninase, em culturas de *C. stipitophila* TFB 27441, medida pela descoloração de "remazol brilliant blue R". (—O—) 0,1 % de lignina e 1 % de glicose; (—●—) 0,0 % de lignina e 1 % de glicose.

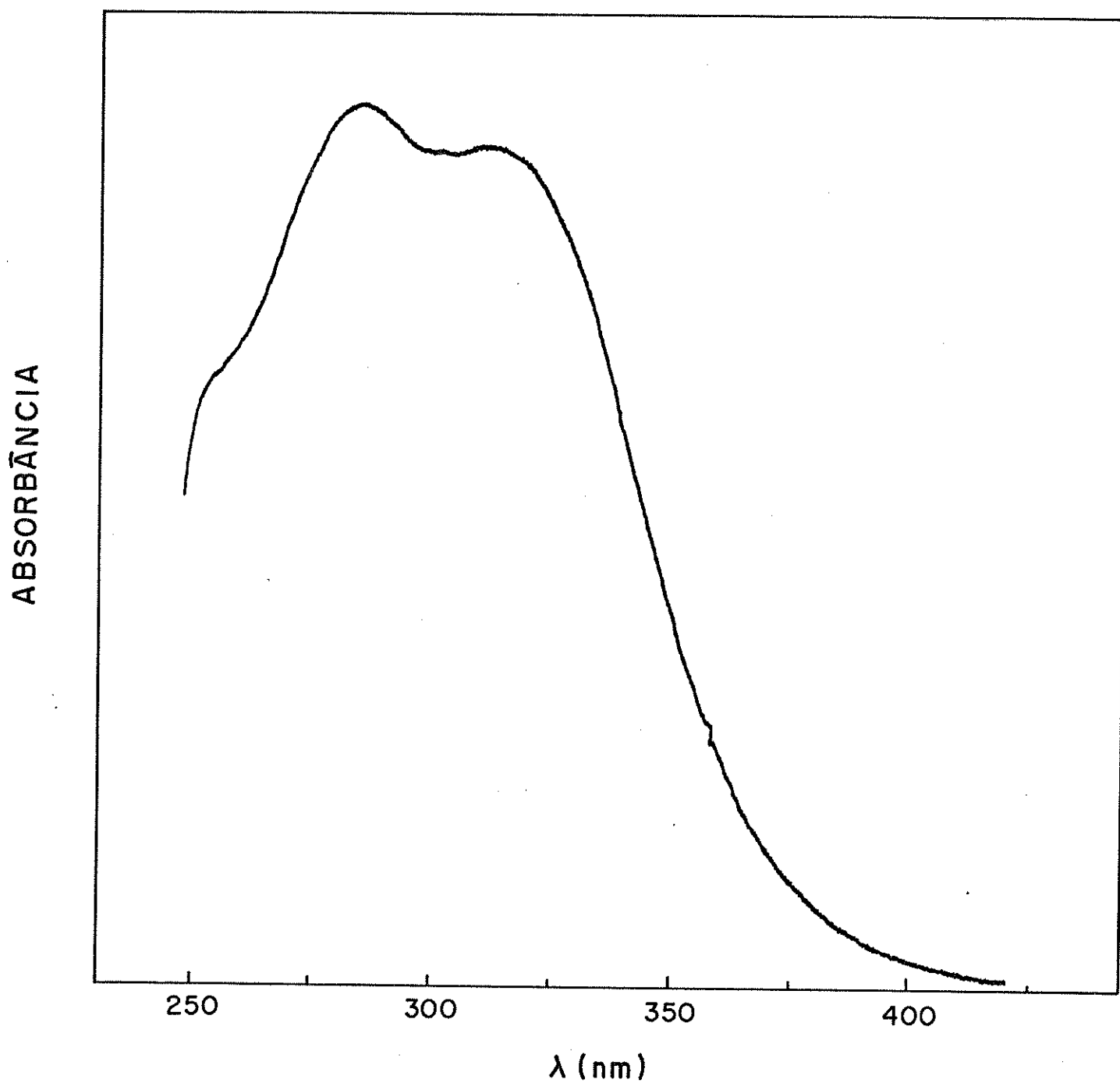


FIGURA 19. Espetro de absorção da lignina dioxano de casca de arroz. Solvente dioxano:agua (9:1).

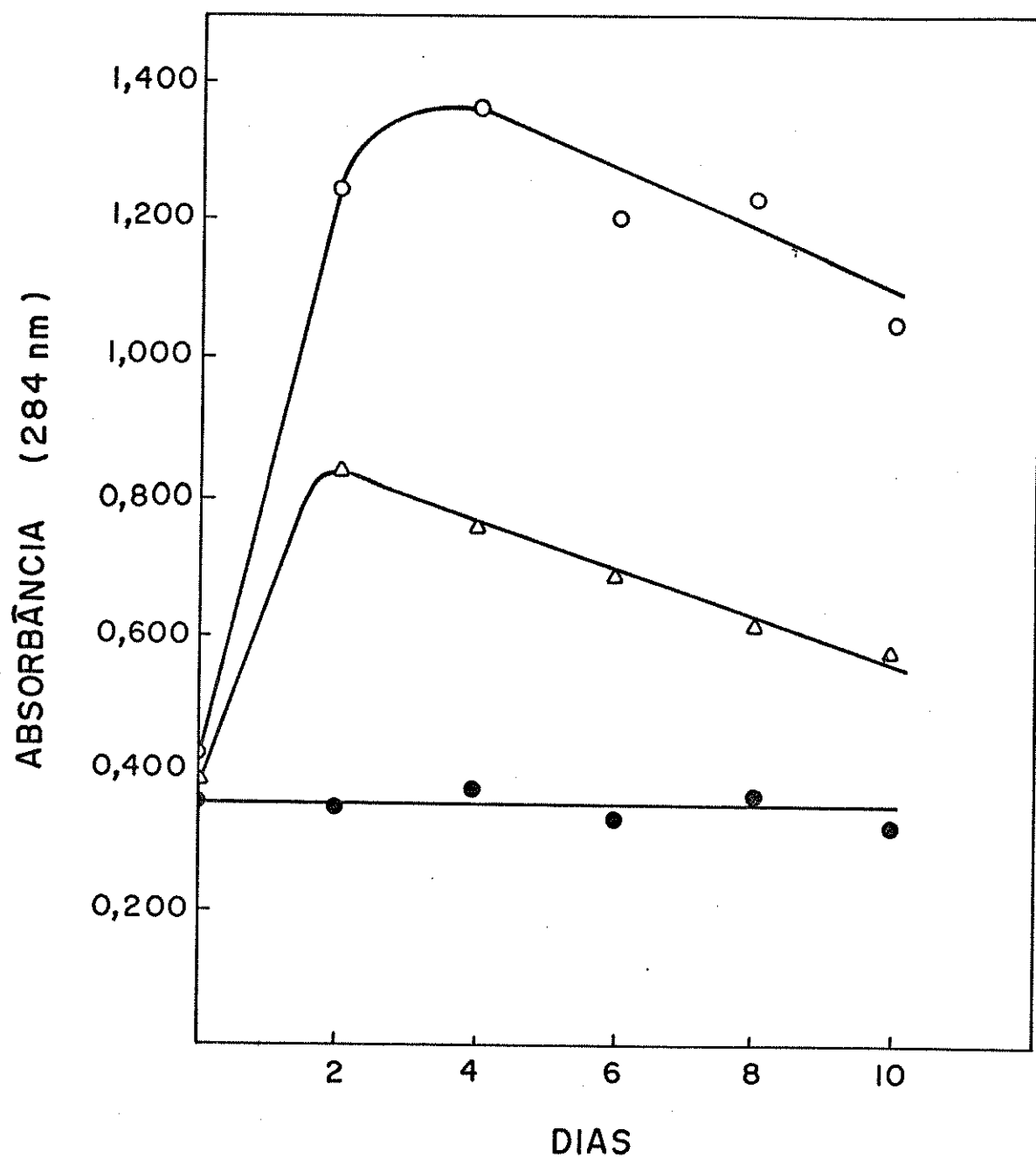


FIGURA 20. Modificação da lignina dioxano de casca de arroz por *C. sitophila* na presença de diferentes concentrações de glicose. (—●—) 0 %, (—Δ—) 0,5 %, (—○—) 1 %.

Dos dados observados na figura 20, pode-se postular que numa primeira etapa existe um aumento da absorção da lignina devido a oxidações pelas quais acontece a biodegradação (40) e que aumentam o número de cromóforos. Posteriormente a absorbância começaria a cair devido a uma diminuição na concentração da lignina.

Sabe-se que a biodegradação de lignina por *P. chrysosporium* só é possível se o fungo tiver uma fonte de energia tal como celulose ou glicose (11). Isto significa que ainda que a energia potencial contida na lignina é realmente mais alta que a da celulose, este fungo é incapaz de usá-la como fonte de energia. Em princípio poder-se-ia dizer o mesmo para *C. sitophila*.

III.3.1. Conclusões

C. sitophila TFB 27441 produz quantidades elevadas de ligninases (67 U/l) se comparado com *P. chrysosporium* BKM F. 1767 (20 U/l) e seu mutante *P. chrysosporium* SC 26 (32 U/l). Este fato é extremamente interessante, pois possibilita a realização de pesquisas mais aprofundadas para compreender melhor seu sistema lignolítico e avaliar as diversas possibilidades de utilização em processos de deslignificação e/ou obtenção de produtos da lignina.

III.4 PRODUÇÃO DE PROTEÍNAS UNICELULARES.

A capacidade do fungo para produzir proteínas usando celulose como única fonte de carbono pode ser melhor avaliada se comparada com outros fungos de conhecida atividade celulolítica. A razão de conversão calculada como gramas de proteína/gramas de celulose, mostra que o valor calculado (0.07; 21 mg de proteína por 300 mg de celulose) para *C. sitophila* é similar aos valores publicados para *Aspergillus fumigatus* (0.07) e maior que para *Trichoderma reesei* (0.04) (30). Considerando que uma cepa de *C. sitophila* é usada para enriquecimento protéico e melhoria do sabor de farelo de amendoim para alimentação humana na Indonésia (51) é evidente a importância destes resultados.

Quando foi usada casca de arroz como substrato de crescimento para *C. sitophila* (meio de Czapeck não tamponado, cultura não agitada) o pH e a atividade em papel filtro mantiveram-se constantes nos valores 7.4-7.5 e 0,006 U.I./ml, respectivamente. O peso do micélio no décimo dia de crescimento é mostrado na tabela 5 e comparado com o obtido no crescimento em outros substratos. A porcentagem de proteína encontrada no micélio de *C. sitophila* variou entre 10 e 12 % .

A tabela 6 mostra a variação da proteína solúvel em cultivos de *C. sitophila* usando como substrato casca de arroz, estes valores são comparados com a proteína solúvel em cultivos com celulose.

Considerando a porcentagem de proteína no micélio e a quantidade de proteína solúvel, parece ser viável a utilização

deste fungo na fermentação de casca de arroz para o enriquecimento proteico de rações animais. Também é importante destacar que a casca de arroz usada não foi submetida a nenhum pré-tratamento, assim pode-se concluir que um processo de enriquecimento proteico com o fungo seria de baixo custo.

Os aminoácidos liberados durante a hidrólise da proteína do micélio foram analisados e mostraram uma considerável proporção de aminoácidos essenciais, tais como histidina, leucina, metionina, valina, etc.. Quando comparados com os valores referidos para outros fungos e grãos (Tabela N° 7), conclui-se que o conteúdo de aminoácidos é semelhante aos apontados pela FAO como apropriados para uma alimentação balanceada.

Tabela 5. Peso da massa micelilar de *C. sitophila* usando como substrato casca de arroz e sacarose (no décimo dia).

SUBSTRATO	PESO DO MICÉLIO (*)
casca de arroz (600 mg)	32,1 mg
sacarose (600 mg)	48,8 mg
casca de arroz (540 mg) + sacarose (60 mg)	42,4 mg

(*) erro máximo 2 %.

Tabela 6. Variação de proteína solúvel em mg/ml de culturas de *C. sitophila* crescendo em diferentes substratos.

	DIA 2	DIA 3	DIA 6	DIA 10
Casca de arroz (600 mg)	0,5	0,8	2,1	2,8
Celulose (600 mg)	0,6	0,6	0,6	0,6
Casca (540 mg) + sac. (60 mg)	1,3	0,9	2,8	3,0

Observando as tabelas 5 e 6, pode-se dizer que usando pequenas quantidades de sacarose, para obter um aumento no crescimento inicial, se obtém um aumento significativo da quantidade de proteína total.

Tabela N° 7. Conteúdo de aminoácidos de fungos celulolíticos, amendoim e soja. mg/ 100 mg de proteína.

	C. sitophila	T. reesei	Amendoim	Soja	FAO
		(a)	(a)	(a)	(a)
Alanina	6.70	5.10	4.20	3.30	-
Arginina	2.50	4.00	10.60	7.30	-
Ác. aspártico	7.50	7.70	15.10	3.70	-
Cisteína	0.01	-	1.60	1.90	1.2
Ác. glutâmico	8.30	9.90	17.40	18.40	-
Glicina	7.30	5.90	5.00	4.00	-
Histidina	1.45	1.60	2.10	2.90	-
Isoleucina	5.30	4.00	4.00	6.00	4.2
Leucina	5.70	5.10	6.70	8.00	4.8
Lisina	3.90	4.40	3.00	6.80	4.2
Metionina	1.45	2.00	1.00	1.70	2.2
Fenilalanina	2.90	5.50	5.10	5.30	2.8
Prolina	4.30	3.70	5.20	5.00	-
Serina	4.10	2.60	6.60	4.20	-
Treonina	4.65	4.40	1.60	3.90	2.8
Triptofano	-	-	-	-	1.4
Tirosina	2.00	3.70	4.40	4.00	2.8
Valina	6.90	4.80	4.40	5.30	4.2

(a) ref. (30).

III.4.1 Conclusões

O alto conteúdo proteico (12 %, base úmida) e a quantidade de massa micelar produzida por *C. sitophila* TFB 27441 quando crescido em casca de arroz, permitem pensar (considerando sua habilidade em degradar celulose e principalmente lignina) na utilização desta cepa para a preparação de rações animais deslignificadas e enriquezidas com a proteína micelar.

CAPÍTULO IV**CONCLUSÕES GERAIS**

IV CONCLUSÕES GERAIS

O fungo *Chysonilia sitophila* TFB-27441, apresentou uma atividade celulolítica comparável, em termos gerais, à de *Trichoderma reesei* QM-6a, que supõe a possibilidade de desenvolver mutantes com alta produção de enzimas celulolíticas, como têm sido desenvolvidos a partir de *T. reesei* QM-6a (48).

Se consideramos a alta atividade lignolítica, podemos pensar que este fungo tem um grande potencial no desenvolvimento de rações animais deslignificadas (52) e no polpeamento biológico de madeira na indústria do papel (53).

A proteína unicelular apresenta-se comparável a índices de aminoácidos sugeridos pela FAO (30) o que reafirma as possibilidades de usa-lo num processo de conversão direta do lignocelulósico a proteína unicelular (SCP).

APENDICE

A.- Síntese de álcool veratrílico (54).

Num balão de 1,0 l de três bocas conectadas a um condensador de refluxo e a um funil de adição contendo 52,4 ml de sulfato de metila foram adicionados 36,4 g de vanilina e 90,0 ml de água fervendo, esta solução foi aquecida num banho de vapor. Um volume de 72 ml de NaOH 5,0 M foi esquentado à 100 °C e adicionado à mistura de vanilina e água.

Esta última mistura foi aquecida continuamente num banho de vapor. Foram adicionados 28,4 ml de sulfato de metila através do funil de adição numa velocidade suficiente para manter a ebulição que começa após a adição dos primeiros 2 a 3 ml. Logo após a adição do sulfato de metila, que requer aproximadamente de uma hora, a mistura de reação foi mantida em ebulição por mais 45 minutos. Após esse tempo um volume de 6 ml de sulfato de metila foi acrescentado a mesma velocidade que a primeira adição. Após 10 minutos de ebulição da mistura de reação, adicionaram-se 12 ml de hidróxido de sódio 5 M e outro volume de 6 ml de sulfato de metila. A adição alternada de 12 ml de hidróxido de sódio 5 M e de 6 ml de sulfato de metila foi repetida duas vezes mais, adicionando-se desta forma um volume total de 52,4 ml de sulfato de metila. A mistura de reação adicionaram-se 30 ml da solução de hidróxido de sódio 5 M e esta foi aquecida por 20 minutos. A mistura de reação foi esfriada rapidamente até 25 °C com agitação contínua e o aldeído veratrílico foi extraído três vezes com volumes de 60 ml de éter.

O extrato etéreo foi seco sobre sulfato de magnésio anidro e o éter foi posteriormente evaporado em evaporador rotatório. O rendimento alcançado foi de 28 g (70 %) de aldeído veratrílico (rendimento da literatura 84 %).

O aldeído foi reduzido para álcool veratrílico com borohidreto de sódio da seguinte forma: A uma solução de 15 g de aldeído dissolvidos em 1,5 l de uma solução água:etanol (1:4) foram adicionados 7,5 g de borohidreto de sódio. Após 24 h de agitação contínua o produto foi secado em evaporador rotatório até 25 ml e em seguida extraído com clorofórmio. Uma vez evaporado o clorofórmio o álcool veratrílico foi destilado sob vácuo para garantir sua pureza.

BIBLIOGRAFIA.

- 1.- Camacho Rubio F., Gonzales Tello P., Jurado Alameda E. e Paez Dueñas M. P.; Ing. Quim. (Espanha) **200**, 297 (1985).
- 2.- Janshekar H. e Flechter A.; Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. **27**, 119 (1983).
- 3.- Phillips J. A.; Chemtech **15**, 377 (1985).
- 4.- Klausner A.; Bio/Technol. **2**, 111 (1984).
- 5.- Fengel D. e Wegener G. em "Wood: Chemistry, Ultrastruture, Reactions", Walter de Gruyter, Berlin-New York, 1984.
- 6.- Mullings R.; Enzyme. Microbiol. Technol. **7**, 586 (1985).
- 7.- Poincelot R. P. e Day P.R.; Appl. Microbiol. **23**, 875 (1972).
- 8.- Leisola M. e Linko M.; Anal. Biochem. **70**, 592 (1976).
- 9.- Mandels M., Andreotti R. e Roche C.; Biotechnol. Bioeng. Symp. **6**, 21 (1976).
- 10.- Bisaria V. S. e Ghose T. K.; Enzyme. Microbiol. Technol. **3**, 90 (1981).
- 11.- Leisola M.S.A. e Fichter A.; Adv. Biotechnol. Processes. **5**, 59 (1985).
- 12.- Kirk T.K.; Ann. Rev. Phytopath. **9**, 185 (1971).
- 13.- Glenn J. K. e Gold M. H.; Appl. Env. Microbiol. **4**, 1741 (1983).
- 14.- Ulmer D.C., Leisola M.S.A. e Fichter A.; J. Biotechnol. **1**, 13 (1984).
- 15.- Tien M. e Kirk T.K.; Proc. Natl. Acad. Sci. USA **81**, 2280 (1984).

- 16.- Kirk T. K.; Microbiol. Ser. 13, 14 (1984).
- 17.- Kuwahara M., Glenn J.K., Morgan M.A. e Gold M.H.; FEBS Lett. 169, 247 (1984).
- 18.- Kirk T.K., Tien M., Kersten P.J., Mozuch M.D e Kalyanaraman B.; Biochem. J. 236, 279 (1986).
- 19.- Litchfield J.H.; Adv. Appl. Microbiol. 22, 267 (1977).
- 20.- Litchfield J.H.; Science 219, 740 (1983).
- 21.- Kilberg R.; Ann. Review Microbiol. 26, 427 (1972).
- 22.- Rodwell V. em "Manual de Química Fisiológica", 4ª Edição ed. H.A. Haper; Atheneu editora São Paulo, Brasil 1977 pp 361.
- 23.- Tanaka M.E. e Matsuno R.; Enzyme. Microbiol. Technol. 7, 197 (1985).
- 24.- Datta R.; Proc. Biochem. 16, 16 (1981).
- 25.- Fan L.T., Lee Y.H. e Gharpuray M.M.; Adv. Biochem. Eng. 23, 158 (1982).
- 26.- Dekker R.F.H. e Wallis A.F.W.; Biotechnol. Bioeng. 25, 3027 (1983).
- 27.- Wagner R.P., Webber H.H. e Siu R.G.H.; Arch. Biochem. 12, 35 (1947).
- 28.- Hon D.N.S.; em "Developments in Polymer Degradation-3", Applied Science Publishers Ltd., Ripple Road, Barking, Essex, England. Cap. 8, 229 (1981).
- 29.- Park J.E., Rockill R.C. e Klein D.A.; J. Environ. Qual. 1, 298 (1972).
- 30.- Rogers C.J., Coleman E., Spino D.F. e Purcell T.C., Environ. Sci. Technol. 6, 715 (1978).

- 31.- Davies D.A. e Dixon G.D.; J. Appl. Polymer Sci. 16, 2449 (1972).
- 32.- Durán N. e Gómez E.; J. Photochem. 35, 109 (1986).
- 33.- Campos V., Salas E., Durán N., Rodríguez J., Baeza J., Bol. Micol. (Chile) 2, 161 (1986).
- 34.- Laboratorios Difco; "Difco Manual" Novena edição, Detroit, USA (1953) p 245.
- 35.- Ferraz A. e Durán N.; Appl. Environ. Microbiol. submetido.
- 36.- Reid I.D.; Can. J. Bot. 57, 2050 (1979).
- 37.- Smith R.E. Appl. Environ. Microbiol. 33, 980 (1977).
- 38.- Herr D.; Biotechnol. Bioeng. XXI, 1361 (1979).
- 39.- Mansilla H.; Tese de Doutorado, UNICAMP (1986).
- 40.- Kirk T.K.; Biotechnol. Bioeng. Symp. 5, 139 (1975).
- 41.- Gornall A.G., Bordawill C.J. e David M.M.; J. Biol. Chem. 177, 751 (1949).
- 42.- Plummer D. em "An introduction to Practical Biochemistry" Mc. Graw Hill 1971, p 156.
- 43.- Miller G.L.; Anal. Biochem. 31, 426 (1959).
- 44.- Dahlqvist A.; Anal. Biochem. 22, 99 (1968).
- 45.- Pepper J. M., Baylis P.E e Adler E.; Can. J. Chem. 37, 1241, (1959).
- 46.- Marrier J. R. e Boulet M.; J. Dairy Sci. 41, 1683 (1958).
- 47.- Mandels M.; Biotechnol. & Bioeng. Symp. 5, 81 (1975).
- 48.- Montenecout B.S.; Trends Biotechnol. 1, 156 (1983).
- 49.- Durán N., Gómez E. e Leite L.; Polymer Photochem., submet.
- 50.- Kirk T.K., Tien M., Joohnsrud S.C. and Eriksson K.-E.; Enzyme Microbiol. Technol. 8, 75 (1986).

- 51.- Beachat L.R.; Ec. Bot. 30, 227 (1976).
- 52.- Contreras O.R., Roura G. e Hernández D.; Rev. Lat.-Amer. Microbiol. 27, 329 (1985).
- 53.- Jurasek L. e Palce M.; Chemtech 16, 361 (1986).
- 54.- Buck J.S.; Org. Syn. Coll. 2, 619 (1943).