


ANELI DE MELO BARBOSA



SELEÇÃO DE MICRORGANISMOS XILANOLÍTICOS
E PRODUÇÃO DE XILANASE POR *Trichoderma*
harzianum RIFAI EM BAGAÇO DE CANA.

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Ciências — BIOQUÍMICA.

CURITIBA
1992

ANELI DE MELO BARBOSA

SELEÇÃO DE MICRORGANISMOS XILANOLÍTICOS
E PRODUÇÃO DE XILANASE POR *Trichoderma*
harzianum RIFAI EM BAGAÇO DE CANA.

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Ciências — BIOQUÍMICA.

CURITIBA

1992

ORIENTADOR

Prof. Dr. José Domingos Fontana

ANELI DE MELO BARBOSA

SELEÇÃO DE MICRORGANISMOS XILANOLÍTICOS
E PRODUÇÃO DE XILANASE POR *Trichoderma*
harzianum RIFAI EM BAGAÇO DE CANA

Tese aprovada como requisito parcial
para obtenção do grau de Doutor no Curso
de Pós-Graduação em Bioquímica pela
Comissão formada pelos Professores:

Prof. Dr. Fabio de Oliveira Pedrosa
UFPR

Profª Drª Fany Reicher
UFPR

Prof. Dr. Carlos Kemmelmeier
Uem
Prof. Dr. Gilvan Wosiack
UEPG

Prof. Dr. Hector Francisco Terenzi
USP

Curitiba, 14 de dezembro de 1992

DEDICATÓRIA

A meus pais ALÍCIO e LEONINA
com amor e reconhecimento pela
dedicação e exemplo de vida.

A ciência é o patrimônio da humanidade que pode ser desvendado com a participação de cada um para o bem de todos. Cabe ao cientista aprender a ser um ser humano digno para entender a dignidade da ciência. Este é o primeiro passo para desvendar que a ciência pertence a si mesma e somente permite doações de conhecimento quando estas são conquistadas com respeito, trabalho e amor do cientista para consigo mesmo e para com ela própria.

A. M. Barbosa.

MINHA HOMENAGEM ESPECIAL

Ao Robert pela amizade, abnegação, apoio,
incentivo e colaboração.

À Asae pela solidariedade, confiança e amizade.

HOMENAGEM PÓSTUMA

A um verdadeiro Cientista que sabia demonstrar o seu amor pela ciência:

Prof. Dr. João Batista Chaves Corrêa .

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Ao Prof. Francisco Pedrotti, Prof. Jefferson Moriconi Cesário, Prof. Antonio Bacarin e todos os Professores e Funcionários dos Departamentos de Química e Bioquímica do CCE - UEL pela atenção, colaboração, respeito e solidariedade constantes.

AGRADECIMENTOS

- A DEUS , meu maior amigo.
- Ao Prof. Dr. José Domingos Fontana pela disponibilidade como Professor Orientador e pelos ensinamentos recebidos.
- Ao Prof. Dr. Fabio O. Pedrosa e ao Colegiado do Curso de Pós-graduação em Bioquímica pela atenção dispensada.
- Ao colega Generoso Manoel Chagas pela atenção, apoio e colaboração demonstrados.
- A todos os Professores do Curso de Pós-graduação em Bioquímica que direta ou indiretamente participaram de minha formação.
- Ao Prof. Carlos Roberto Antunes dos Santos e Profa. Muriel Mourão pela atenção, discernimento e colaboração.
- Ao Prof. Dionísio Borsato pelos esclarecimentos e sugestões do modelo SAS.
- Ao Prof. Carlos Câmara e Profa. Suzana Lucy Nixdorf pelos esclarecimentos prestados durante a digitação deste trabalho.
- À Comissão de Assessoria do Depto. de Matemática Aplicada da UEL pelas orientações prestadas.
- A todos os funcionários do Depto de Bioquímica da UFPR pela amizade demonstrada durante minha permanência neste Depto.
- Aos amigos Geraldo, "Serginho", "Rita", Maria de Lourdes, Keiko, "Betinha", Suzana, Miriam, Jorge, Munif , "Dedé", pela amizade, apoio e incentivo..
- A Profa. Eleidi Freire Maia, Professores e Funcionários do Depto de Genética o meu muito obrigada pela colaboração .
- Aos meus irmãos, cunhadas e sobrinhos que souberam com amor dar estímulo para a realização deste trabalho.
- Ao Prof. Jorge Bounassar e Prof. Dr. Carlos Roberto Appoloni pela colaboração na licença PICD.

- Ao NPD-UEL pelo processamento dos resultados do modelo estatístico utilizado neste trabalho.
- À equipe da Biblioteca Central da UEL e principalmente às bibliotecárias Maria Inês Tomael e Neide M. J. Zaninelli pela colaboração e esclarecimentos prestados.
- A "Cau", Darlene, "Inês", "Meire", "Cris", pela confiança, afeto e amizade que estimularam a redação final.
- A amiga Terezinha de Jesus Faria os meus profundos agradecimentos pela colaboração, incentivo e amizade .
- A Dona Julieta Pie e Marilza Doroti Lamour pela amizade.
- Aos colegas e estagiários do laboratório LQBB e a todos que direta ou indiretamente colaboraram para a realização desta tese.
- A CAPES pelo apoio financeiro.

ÍNDICE

	Pag.
Lista de Tabelas.....	v
Lista de Figuras.....	viii
Lista de Fotografias.....	xi
Lista de abreviaturas.....	xii
Resumo.....	xiii
Abstract.....	xv
1. INTRODUÇÃO.....	01
1.1. Materiais lignocelulósicos.....	03
1.1.1. Aproveitamento de celulose.....	09
1.1.2. Aproveitamento de lignina.....	12
1.1.3. Aproveitamento de hemiceluloses.....	16
1.1.3.1. Produção de xilanases.....	21
1.1.3.1.1. Microrganismos.....	24
1.1.3.1.2. Fonte de carbono, processo fermentativo e meio de cultivo.....	28
1.1.3.1.3. Determinação da atividade da xilanase.....	34
2. OBJETIVOS.....	38
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	40
3.1. Materiais.....	40
3.2. Métodos.....	41
3.2.1. Métodos Gerais.....	41
3.2.2. Métodos Analíticos.....	42
3.2.2.1. Métodos Colorimétricos.....	42
3.2.2.1.1. Ensaio das atividades enzimáticas	
a) Atividade da xilanase.....	42
b) Atividade da β -xilosidase.....	43
c) Atividade da celulase.....	43
d) Atividade da amilase.....	44
e) Atividade da pectinase.....	45
3.2.2.1.2. Carboidratos Totais.....	45
3.2.2.1.3. Carboidratos redutores.....	45
3.2.2.1.4. Proteínas.....	46
3.2.2.2. Métodos Cromatográficos.....	46
3.2.2.3. Métodos Eletroforéticos.....	47
3.2.2.4. Umidade.....	47
3.2.2.5. Nitrogênio total.....	47
3.2.3. Teste cromogênico.....	47

3.2.4	Preparação do bagaço de cana.....	48
3.2.5	Isolamento dos microrganismos.....	48
3.2.5.1	Microrganismos isolados em Londrina.....	48
3.2.5.2	Microrganismos isolados em Curitiba.....	49
3.2.6.	Manutenção dos microrganismos.....	50
3.2.7.	Condições de cultivo estabelecidas para selecionar os microrganismos xilanolíticos.....	51
3.2.8.	Inóculo.....	52
3.2.9.	Meios de cultivo.....	53
3.2.9.1.	Meio mínimo de Vogel.....	53
3.2.9.2.	Meio de Mandels.....	54
3.2.9.3.	Meio de YM.....	54
3.2.10.	Mutagênese.....	54
3.2.11.	Análise Estatística.....	55
3.2.11.1.	Experimento com o <i>T. harzianum</i> cultivado em bagaço de cana como única fonte de carbono.....	55
3.2.11.1.1.	Delineamento Experimental.....	55
3.2.11.1.2.	Análise dos Resultados.....	57
3.2.12.	Obtenção dos hidrolisados enzimáticos para análise cromatográfica.....	58
3.2.13.	Preparações Enzimáticas.....	58
3.2.14.	Eluição das xilanases das tiras de acetato celulose.....	59
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	60
4.1.	Seleção de microrganismos xilanolíticos.....	62
4.1.1.	Pré-inóculo.....	62
4.1.2.	Seleção dos microrganismos xilanolíticos em bagaço de cana como única fonte de carbono.....	64
4.1.3.	Avaliação da produção de xilanase pelos 10 microrganismos xilanolíticos selecionados cultivados em diferentes hemiceluloses.....	70
4.1.3.1.	Hemicelulose total isolada de bagaço de cana....	70
4.1.3.2.	Hemicelulose "A" isolada de bagaço de cana.....	75
4.1.3.3.	Xilana de "Larch".....	79

4.1.4.	Comparação da produção de xilanase em bagaço de cana e em hemiceluloses pelos 10 xilanolíticos selecionados.....	84
4.2.	Identificação dos 10 microrganismos xilanolíticos selecionados.....	86
4.3.	Comparação entre o potencial xilanolítico do <i>Trichoderma harzianum</i> nº 20 e do <i>Trichoderma aureo-viride</i> nº 49 em bagaço de cana 1 % nos meios de Vogel e de Mandels.....	88
4.4.	<i>Trichoderma harzianum</i> nº 20.....	92
4.4.1.	Avaliação simultânea das variáveis : concentração de bagaço de cana, inóculo e tempo de cultivo na produção de xilanase através da Metodologia Estatística Superfície de Resposta.....	93
4.4.2.	Avaliação da produção de celulase através da Superfície de Resposta.....	102
4.4.3.	Produção de xilanase em diferentes concentrações de bagaço de cana.....	103
4.4.4.	Produção de xilanase em hemiceluloses isoladas e outros resíduos lignocelulósicos.....	109
4.4.5.	Comparação da produção de xilanase e celulase pelos <i>T. harzianum</i> nº 20 e nº 2333 nas fontes de carbono:glucose,xilose ou celulose....	115
4.4.6.	Comparação da produção de xilanase e β -xilosidase em xilose 1 % entre o <i>T. harzianum</i> nº 20 e os outros nove microrganismos xilanolíticos	118
4.4.7.	<i>Trichoderma harzianum</i> em bagaço de cana 4,5 % e os outros nove microrganismos xilanolíticos.....	120
4.4.7.1.	No meio de Vogel.....	120
4.4.7.2.	No meio de YM.....	121

4.4.8.	Curva de crescimento do <i>T. harzianum</i> n° 20 em xilose 1 % durante 240 horas.....	124
4.4.9.	Mutagênese do <i>T. harzianum</i> n° 20.....	131
4.4.9.1.	Cultivo de alguns mutantes em xilose 1 %	137
4.4.10.	<i>Trichoderma harzianum</i> e o mutante 55.....	141
4.4.10.1.	<i>Trichoderma harzianum</i> n° 20	142
4.4.10.2.	Mutante 55	152
4.4.11.	<i>T.harzianum</i> n° 20 e <i>T.aureo-viride</i> n° 49	161
4.4.12.	Cromatografia dos produtos de hidrólise da xilana de "larch" pelas xilanases obtidas nos cultivos do <i>T.harzianum</i> n° 20 e n° 2333 do mutante 55 e do <i>T. aureo-viride</i> n° 49 cultivados em xilose 1 % (72 h) ou bagaço de cana 4,5 % (96 h)	166
4.4.13.	Comparação das atividades xilanásica, β -xilosidásica e celulásica entre as preparações enzimáticas 1 % (p/v) obtidas do <i>T. harzianum</i> n° 20 e do <i>T. aureo-viride</i> n° 49 crescidos em bagaço de cana 1 % ou 4,5 %.....	167
4.4.14.	Análise eletroforética em acetato celulose das preparações enzimáticas 1 % (p/v) obtidas do <i>T. harzianum</i> n° 20, do mutante 55 e do <i>T.aureo-viride</i> n° 49 crescidos em 4,5 % de bagaço de cana.....	170
5.	CONCLUSÕES.....	173
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	179

LISTA DE TABELAS

Tabela		Pag.
I	Variáveis e níveis da variação do delineamento experimental	56
II	Delineamento estatístico dos experimentos	56
III	Relação dos microrganismos a serem selecionados como xilanolíticos	60
IV	Produção de xilanases e celulases pelos microrganismos crescidos em bagaço de cana	66
V	Atividade xilanásica e celulásica dos 10 microrganismos selecionados e 4 de referências cultivados em HTBC	74
VI	Atividade xilanásica e celulásica dos 10 microrganismos selecionados e 4 de referências cultivados em hemicelulose "A" de bagaço de cana	78
VII	Atividade xilanásica e celulásica dos 10 microrganismos selecionados e 4 de referências cultivados em xilana de "Larch"	81
VIII	Atividade xilanásica dos 10 microrganismos selecionados cultivados em bagaço de cana e em hemiceluloses	84
IX	Nomes de Classificação dos 10 microrganismos selecionados	86
X	Produção de xilanases pelos <i>Trichodermas: harzianum</i> e <i>aureo-viride</i> em bagaço de cana 1 %	91
XI	Produção de xilanases pelo <i>T. harzianum</i> n° 20 em bagaço de cana	94
XII	Análise de variância para (Y) produção de xilanases 1	95

XIII	Análise de regressão para (Y) produção de xilanase 1	96
XIV	Comparação entre os valores observados (Y) e os valores estimados (Y), desvios e os respectivos intervalos de confiança para o delineamento completo 1	97
XV	Produção de celulase pelo <i>T. harzianum</i> n° 20 em bagaço de cana	102
XVI	Produção de xilanase em 4,5 % e em 1 % de hemiceluloses isoladas ou resíduos lignocelulósicos	111
XVII	Comparação da produção de xilanase pelos <i>T. harzianum</i> n° 20 e 2333 em xilose, glucose e celulose	116
XVIII	Comparação da produção de xilanase e β -xilosidase em xilose 1 % pelos 10 microrganismos xilolíticos selecionados	118
XIX	Comparação da produção de xilanase e outras hidrolases em bagaço de cana 4,5 % no meio mínimo de Vogel	120
XX	Comparação da produção de xilanase e outras hidrolases em bagaço de cana 4,5 % no meio de YM	123
XXI	Produção de xilanase pelo <i>T. harzianum</i> n° 20 em xilose 1 % durante 240 horas	125
XXII	Crescimento do <i>T. harzianum</i> n° 20 em xilose 1 % durante 240 horas	127
XXIII	Produção de proteína extracelular e variação do pH durante 240 h. nos cultivos do <i>T. harzianum</i> em xilose 1 %	130
XXIV	Atividade xilanásica e celulásica do <i>T. harzianum</i> n° 20 e dos 58 mutantes	133

XXV	Determinações do diâmetro da colônia e do halo de atividade xilanásica do <i>T. harzianum</i> n° 20	136
XXVI	Produção de xilanase e de biomassa microbiana pelo <i>T. harzianum</i> e alguns mutantes em xilose 1 % durante 48 e 96 horas	139
XXVII	Produção de xilanase pelo <i>T. harzianum</i> n° 20 em bagaço de cana 4,5 %	143
XXVIII	Produção de celulase pelo <i>T. harzianum</i> n° 20 em bagaço de cana 4,5 % durante 240 horas	145
XXIX	Açúcares solúveis residuais dos cultivos do <i>T. harzianum</i> n° 20 durante 240 horas	146
XXX	Variação do pH e produção de proteína extracelular nos cultivos do <i>T. harzianum</i> n° 20 em bagaço de cana 4,5 %	148
XXXI	Produção de xilanase pelo mutante 55 em bagaço de cana 4,5 %	153
XXXII	Produção de celulase pelo mutante 55 em bagaço de cana 4,5	154
XXXIII	Carboidratos totais solúveis e redutores nos cultivos do mutante 55 em bagaço de cana 4,5 % durante 240 horas	158
XXXIV	Comparação das preparações de xilanase 1% (p/v) do <i>T. harzianum</i> n° 20 e do <i>T. aureo-viride</i> n° 49	168

LISTA DE FIGURAS

	Pag.
Fig.01: Estrutura simplificada da parede celular de uma fibra vegetal segundo Wardrop citado por Timel(130).....	07
Fig.02: Distribuição da celulose, hemiceluloses e lignina no interior da parede celular segundo Fan e colaboradores (54).....	07
Fig.03: Algumas estruturas de hemiceluloses comumente encontradas em angiospermas e gimnospermas (37).....	18
Fig.04: Etapas da biodegradação de heteroxilanas segundo Dekker (37).....	23
Fig.05: Estrutura hipotética de uma xilana e os sítios de ataques das enzimas xilanolíticas microbianas, segundo Biely(09).	25
Fig.06: Seqüência de cultivos para a seleção dos microrganismos xilanolíticos.....	52
Fig.07: Produção de xilanase em BC 1 % pelos 10 microrganismos xilanolíticos selecionados e por 4 microrganismos de referência	68
Fig.08: Produção de xilanase em HTBC 1 % pelos 10 microrganismos xilanolíticos selecionados e por 4 microrganismos referência.	71
Fig.09: Produção de xilanase em H"A"BC 1 % pelos 10 microrganismo xilanolíticos selecionados e por 4 microrganismos de referência.....	76
Fig.10: Produção de xilanase em XIL 1 % pelos 10 microrganismos xilanolíticos selecionados e pelos 4 microrganismos de referência.....	80
Fig. 11 e 12: Atividades das xilanases do <i>T. harzianum</i> e do <i>T.aureo-viride</i> cultivados em diferentes fontes de carbono.....	88,89

Fig.13:	Superfície de resposta das variáveis: substrato e inóculo (13-A), inóculo e tempo (13-B) e substrato e tempo (13-C).	99,100
Fig.14:	Perfil da atividade xilanásica do <i>T.har-zianum</i> crescido no meio mínimo de Vogel em diferentes concentrações de BC.....	104
Fig.15:	Perfil da atividade celulásica do <i>T.har-zianum</i> crescido no meio mínimo de Vogel em diferentes concentrações de BC.....	106
Fig.16:	Perfil da quantidade de açúcar total residual solúvel presente nos meios de cultivo do <i>T.har-zianum</i> nas diferentes concentrações de bagaço de cana.....	106
Fig.17:	Perfil da quantidade de açúcar redutor residual presente nos meios de cultivo do <i>T. harzianum</i> nas diferentes concentrações de bagaço de cana	107
Fig.18:	Perfil da alteração do pH do cultivo do <i>T. harzianum</i> crescido nas diferentes concentrações de BC.....	108
Fig.19:	Perfil da produção de xilanase pelo <i>T. harzianum</i> crescido em diferentes resíduos lignocelulósicos ou em xilanas 4,5 %	112
Fig.20:	Perfil da produção de xilanase pelo <i>T. harzianum</i> crescido em diferentes resíduos lignocelulósicos ou em xilanas 1 %	112
Fig.21:	Produção de xilanase pelo <i>T. harzianum</i> cultivado em xilose 1% durante 240 horas	126
Fig.22:	Produção de biomassa pelo <i>T. harzianum</i> cultivado em xilose 1% durante 240 horas	128
Fig.23:	Produção de xilanase e celulase pelo <i>T. harzianum</i> crescido em BC 4,5 % durante 240 horas.....	144

Fig.24:	Produção de xilanase e liberação de CT e CR no meio de cultivo do <i>T. harzianum</i> em BC 4,5 % durante 240 horas.....	147
Fig.25:	Produção de xilanase, β -xilosidase e proteínas solúveis no cultivo do <i>T.harzianum</i> em BC 4,5 % durante 240 horas.....	149
Fig.26:	Produção de hidrolases pelo mutante 55 em BC 4,5 %	156
Fig.27:	Produção de xilanase e β -xilosidase pelo mutante 55 em BC 4,5 % durante 240 horas.....	157
Fig.28:	Carboidratos totais solúveis e redutores residuais presentes nos cultivos do mutante 55 em BC 4,5 % durante 240 horas..	160
Fig.29:	Produção de xilanase pelo <i>T.harzianum</i> e <i>T. aureo-viride</i> em diferentes concentrações de xilose.....	162
Fig.30:	Produção de biomassa microbiana pelos fungos <i>T.harzianum</i> e <i>T. aureo-viride</i> em diferentes concentrações de xilose.....	163
Fig.31:	Variação do pH nos cultivos do <i>T.harzianum</i> e <i>T. aureo-viride</i> em diferentes concentrações de xilose.....	165
Fig.32:	Consumo de xilose pelos fungos <i>T.harzianum</i> e <i>T.aureo-viride</i> crescidos em diferentes concentrações de xilose.....	165
Fig.33:	Análise da atividade xilanásica eluída das tiras de acetato-celulose após eletroforese das preparações enzimáticas do <i>T.harzianum</i> nº 20, do <i>T.aureo-viride</i> nº 49 e do mutante 55.	171

LISTA DE FOTOGRAFIAS

	Pag.
Fotografia 01 : Microrganismos crescidos no meio mínimo de Vogel em xilose 1 % durante 48 horas.....	63
Fotografia 02 : Biomassa microbiana obtida em 96 horas de cultivo no meio mínimo de Vogel contendo 1 % de HCBC ..	72
Fotografia 03 : <i>T. harzianum</i> nº 20 crescido no meio mínimo de Vogel em agar, BC, H"A"BC ou xilose	92
Fotografia 04 : Teste cromogênico para avaliação do halo de atividade xilanásica secretada durante 96 horas de cultivo em H"A" de BC	135
Fotografia 05 : Biomassa microbiana da linhagem selvagem do <i>T. harzianum</i> e dos mutantes nº 16, 14 e 18 cultivados em xilose 1 % durante 48 h...	138
Fotografia 06 : Biomassa microbiana dos mutantes nº 27, 35, 55 e 56 cultivados em xilose 1 % durante 48 h.....	138
Fotografia 07 : Biomassa microbiana da linhagem selvagem do <i>T. harzianum</i> , dos mutantes nº 16, 14 e 18 cultivados em xilose 1 % durante 96 h.....	140
Fotografia 08 : Biomassa microbiana dos mutantes nº 27, 35, 55 e 56 cultivados em xilose 1 % durante 96 h.....	141
Fotografia 09 : Cromatografia em camada delgada dos produtos de hidrólise das xilanasas do <i>T. harzianum</i> nº 20 e nº 2333, <i>T. aureo-viride</i> nº 49 e do mutante 55.....	166

LISTA DE ABREVIATURAS

atm	-	Atmosfera
Cadoxen	-	Óxido de cádmio em etilenodiamino aquoso
CMCS	-	tartarato de sódio, FeCl_3 , NaOH e NaSO_3
Cuoxan	-	complexo amoniacal de hidróxido de cobre
xil	-	xilose
r.p.m.	-	rotações por minuto
BC	-	bagaço de cana
HTBC	-	hemicelulose total de bagaço de cana
HT	-	hemicelulose total
H"A"BC	-	hemicelulose "A" isolada de bagaço de cana
H"A"	-	hemicelulose "A"
Micrgs	-	microrganismos
xlnase	-	xilanase
CMCase	-	carboximetilcelulase
FPase	-	atividade celulásica determinada com papel de filtro
β -xlsase	-	β -xilosidase
CT	-	carboidrato total
CR	-	carboidrato redutor
CR res.	-	carboidrato redutor residual
FTO	-	farelo de trigo original (sem pulverizar)
FTP	-	farelo de trigo pulverizado
FTSA	-	farelo de trigo sem amido
PMs	-	pulverizado de <i>Mimosa scabrella</i> (bracatinga)
H"A"Ms	-	hemicelulose "A" de <i>Mimosa scabrella</i>
XA	-	xilana de aveia
XL	-	xilana de "Larch"(lariço)
T.h.	-	<i>Trichoderma harzianum</i>
T.a-v	-	<i>Trichoderma aureo-viride</i>
n.d.	-	não determinado
(p/v)	-	peso por volume
Mu 55	-	mutante n ^o .55
U/ml	-	unidade por mililitro
U.E.	-	unidade de enzima

RESUMO

Setenta microrganismos englobando bactérias, fungos e leveduras foram isolados de materiais lignocelulósicos em decomposição e de trato digestivo de insetos fitófagos. Quinze eucariontes referenciais, dos ^{de} gêneros: *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Phanaerochete*, *Aureobasidium*, *Dactylium*, *Pichia*, *Pachysolen*, *Schizophillum* e *Chaetomium*, somados aos isolados, totalizando oitenta e cinco linhagens, foram estudados quanto a produção de xilanase em cultivo submerso, contendo bagaço de cana 1 % (p/v) como única fonte de carbono. Dos isolados dez deles apresentaram atividade xilanásica superior a 5 U/ml, sendo sete do gênero *Trichoderma*, dois *Rhizopus* e um *Aspergillus*. Estes dez fungos foram cultivados em hemicelulose total e em hemicelulose "A", isoladas de bagaço de cana, entre os quais destacou-se quanto a produção o *Trichoderma harzianum* nº 20, isolado de *Aspidosperma sp.* (Peroba).

Meio de cultivo, concentração de bagaço de cana e tempo de cultivo foram estudados para otimizar a produção de xilanase pelo *T. harzianum*. Atividade xilanásica de 66,5 U/ml foi produzida pelo microrganismo no meio mínimo de Vogel, em 4,5 % (p/v) de bagaço de cana durante 96 horas de cultivo. Quando o *T. harzianum* foi cultivado em hemicelulose "A" de bagaço de cana 1 % (p/v) e em xilana de aveia, em igual concentração, 64,0 U/ml e 69,9 U/ml foram obtidas, respectivamente. Este microrganismo também produziu xilanase em celulose microcristalina 4,5 % (p/v) e em diferentes concentrações de xilose, enquanto que em glucose 1 % (p/v) houve repressão desta enzima.

Os dez microrganismos xilanolíticos selecionados aumentaram significativamente a produção de xilanase nas condições otimizadas para o *T. harzianum* no meio de Vogel, porém esta enzima foi reprimida pela fonte de nitrogênio presente no meio de YM. A repressão foi maior para o gênero *Trichoderma* do que para o *Aspergillus* e *Rhizopus*.

O *T. harzianum* foi irradiado com UV e entre os 125 mutantes obtidos, 58 foram avaliados quanto a produção de xilanase em meio líquido. O mutante 55 perdeu a capacidade de secretar xilanases em xilose e aumentou a produção de

β -xilosidase em bagaço de cana.

O *T. aureo-viride* n° 49, isolado de *Gynandrobrotica* sp. (inseto), não aumentou o nível basal de xilanase em diferentes concentrações de xilose. As preparações enzimáticas 1 % (p/v) do *T. harzianum* n° 20 e do *T. aureo-viride* n° 49, cultivados nas condições otimizadas, foram comparadas quanto a produção de xilanase, β -xilosidase, celulase, carboidratos totais, carboidratos redutores e proteínas. A preparação do *T. harzianum* n° 20 apresentou maior atividade endoxilanásica (1900 nkat/ml = 114 U/ml) em relação a do *T. aureo-viride* n° 49 (1116 nkat/ml = 67 U/ml) enquanto que a atividade β -xilosidásica deste último (12 nkat/ml) foi maior que a do primeiro (5 nkat/ml). A atividade celulásica (FPase) de ambas as preparações ficou em torno de 0,4 U/ml. As preparações destes dois microrganismos e a do mutante 55 apresentaram comportamentos eletroforéticos distintos.

ABSTRACT

Seventy microorganisms including bacterias, yeasts and fungi were isolated from decayed lignocellulosic materials and digestive tract of phytophagous insects. Fifteen eucariontes were studied as reference, like genera *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Phanaerochete*, *Aureobasidium*, *Dactylium*, *Pichia*, *Pachysolen*, *Schizophyllum* and *Chaetomium*. Every 85 microorganisms were screened as xylanase producer growing on cane bagasse 1 % (w/v) as sole carbon source in shaken flasks. Ten isolated fungi were found to produce xylanase activity above 5 U/ml. Seven were classified as *Trichoderma*, two *Rhizopus* and one *Aspergillus*. They were screened growing on total hemicellulose and on hemicellulose "A" from cane bagasse. A *Trichoderma harzianum* numbered as 20, isolated from *Aspidosperma* sp. (Peroba) was found as a high xylanase activity level producer.

Culture medium, cane bagasse concentration, time of culture were studied to optimize the xylanase production by *T. harzianum*. The value of 66,5 U/ml for xylanase activity in minimum Vogel's medium on cane bagasse 4,5 % (w/v) during 96 h was achieved. This fungus was also cultivated on both hemicellulose "A" 1 % (w/v) from cane bagasse and oat xylan. The xylanase activity were 64,0 U/ml and 69,9 U/ml respectively. *T. harzianum* produced xylanase when cultivated on microcrystalline cellulose and in different xylose concentrations. Glucose 1 % (w/v) repressed the xylanase production by this fungus studied.

Ten xylanolytic fungi previously screened were cultivated in Vogel's medium under the optimized conditions on cane bagasse. The level of xylanase had a significant improvement in all of them. However YM medium repressed xylanase production and this repression was stronger for the genera *Trichoderma* than *Aspergillus* or *Rhizopus*.

The *T. harzianum* was irradiated with UV and 125 mutants were obtained. Fifty eight mutants were cultivated in shaken flasks on cane bagasse 4,5 % (w/v). The mutant 55 lost the capacity to produce xylanase on xylose however the

β -xylosidase production on cane bagasse was improved.

The *T. aureo-viride* n^o. 49, isolated from *Gynandrobrotica* sp.(insect), did not improve the level of xylanase production on different xylose concentrations. The enzymatic preparation 1 % (w/v) obtained from *T. harzianum* n^o. 20 and *T. aureo-viride* n^o. 49 grown on cane bagasse, were compared. The xylanase preparation from *T. harzianum* n^o. 20 presented higher endoxylanase activity (1900 nkat/ml = 114 U/ml) than *T. aureo-viride* (1116 nkat/ml = 67 U/ml) while the β -xylosidase activity was 5 nkat/ml and 12 nkat/ml, respectively. The cellulase activity (FPAse) from both preparation were around 0,4 U/ml. The enzymatic preparations of these two microorganisms and of the mutant 55 showed distinctive eletrophoretic pattern.

1. INTRODUÇÃO

A preservação do meio ambiente nas décadas de 80 e 90 tem sido alvo de preocupação mundial, assim como a descoberta de novas fontes alternativas de energia foi intensamente investigada na década de 70, quando ocorreu o embargo do petróleo pela OPEP.

A devastação do planeta através das queimadas de florestas é responsável pela emissão de toneladas de carbono para a atmosfera, somadas a outros bilhões de toneladas provenientes de combustíveis fósseis (petróleo, carvão, etc.). Os resíduos e rejeitos agrícolas, industriais e urbanos acumulados são queimados, ou às vezes acondicionados ou transferidos para lugares não apropriados, colaborando gradativamente no aumento da poluição. O meio ambiente responde através das variações climáticas adversas e pelos lençóis freáticos, lagos, rios e mares contaminados. Todo este quadro de resposta ressalta a importância de uma reciclagem racional destes resíduos voltada para um controle da poluição.

A solução do equilíbrio ecológico é o desafio a ser enfrentado pelos pesquisadores de todas as áreas da ciência, que deverão desenvolver, através de uma ação conjunta, tecnologias apropriadas para a preservação do meio ambiente.

A energia solar transformada em energia química é acumulada pelas plantas durante a fotossíntese. A energia total utilizada na terra pelos homens é de $3 \cdot 10^{20}$ joules ($7,17 \times 10^{16}$ Kcal) por ano, o que equivale a menos de uma hora de sol na superfície do globo. A energia fixada por fotossíntese, principalmente sob a forma de ligação carbono-carbono dos

vegetais é de $3 \cdot 10^{21}$ joules ($7,17 \times 10^{17}$ Kcal) por ano (dos quais 50 % são fixados na biomassa terrestre e 40 % na biomassa marinha) o que representa 0,1 % da energia solar recebida e 10 vezes a energia total consumida no mundo. A fotossíntese corresponde em peso à produção de 115 bilhões de toneladas de matérias secas por ano, principalmente sob a forma de celulose (107).

A massa de matéria viva vegetal e animal, cujo crescimento tem por base a fotossíntese e a fixação de nitrogênio, são provenientes das florestas e dos resíduos agrícolas das culturas agroenergéticas (cana-de-açúcar, milho, beterraba, mandioca, e outras), dos dejetos urbanos e industriais, da biomassa marinha e da água doce.

O petróleo queimado atualmente por ano equivale ao que a natureza demorou um milhão de anos para obter através de processos físicos, químicos e biológicos. Desde a crise de energia da década de 70, a preocupação tem sido refazer biocombustíveis partindo da biomassa. Isto acarretou uma competição entre a agroenergética e a agroalimentação (24, 117).

Os biocombustíveis sólidos (madeira), líquidos (álcool) ou gasoso (metano, hidrogênio), trazem soluções complementares aos problemas energéticos das sociedades, porém a troca de energia do petróleo pela da biomassa requer a troca do tempo pelo espaço. A extensão territorial não é privilégio de todos os países. Porém a quantidade de resíduos lignocelulósicos disponíveis em países com vasta área cultivável como o Brasil, Estados Unidos, Austrália, África, Índia, China, etc, é significativa, e conseqüentemente induz a criação de projetos de investimentos

em pesquisa voltada para o aproveitamento desta biomassa. Vários especialistas internacionais tem estudado e discutido técnicas de aproveitamento de diferentes tipos de materiais lignocelulósicos porém, até o presente, o desafio continua, considerando que a parede celular dos vegetais ainda constitui uma barreira de difícil acesso para o completo aproveitamento, por via química e ou biológica, de forma integrada e viável economicamente. Neste sentido, a continuidade de estudos de agentes capazes de facilitar a extração e ou bioconversão dos componentes da parede celular do vegetal, trará benefícios para a despoluição ambiental pois impediria o acúmulo de materiais lignocelulósicos existentes e evitaria a queima indiscriminada. Ao mesmo tempo proporcionará uma transformação racional através do desenvolvimento de novas tecnologias de aproveitamento para obtenção de produtos nobres e de ampla aplicação (106).

1.1 MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS

São denominados materiais lignocelulósicos gramas, resíduos de florestas, de colheitas agrícolas (arroz, milho, algodão, soja, feijão, etc), aqueles remanescentes do processamento dos produtos (casca de arroz, sabugo de milho, bagaço de cana, serragem de madeira, borra de café, bagaço de sorgo, etc.) e de materiais resultantes dos derivados destes produtos (papel, estrume, resíduos urbanos, industriais e outros).

A composição química dos materiais lignocelulósicos, que corresponde a da parede celular do vegetal, varia dependendo do tipo de processamento recebido durante a

produção do derivado e da procedência botânica da planta, se angiosperma (madeira dura) ou gimnosperma (madeira mole). Porém, todo resíduo lignocelulósico terá em comum como componentes principais os polímeros : celulose, hemicelulose e lignina.

A celulose é um polímero linear de unidades de β - D - glucopirranose, interligadas por ligações glicosídicas (1 \rightarrow 4), formando os resíduos de celobiose, os quais constituem as unidades repetitivas na cadeia polimérica da ordem de 10 000 unidades de alto peso molecular (300 000 a 500 000) (107). O polímero apresenta uma estrutura altamente organizada, é insolúvel em água e somente ácidos, álcalis, soluções salinas concentradas ou reagentes complexos podem entumecer, dispersar ou até mesmo dissolver este polissacarídeo (64). Nas angiospermas o seu conteúdo varia entre 45 - 55 % e nas gimnospermas, 45 - 50 % (66).

O termo "hemicelulose" foi introduzido por Schulze em 1891 e se refere a um grupo de polissacarídeos de natureza polidiversa, polidispersa e polimolecular (113). Wilkie (142) definiu esta classe de polímeros como polissacarídeos não celulósicos, encontrados nas partes aéreas e normalmente lignificadas de órgãos de plantas superiores, dos quais elas podem ser extraídas com soluções alcalinas após a remoção da lignina, e posteriormente, separadas por neutralização e precipitação com etanol ou acetona. Estes polissacarídeos de baixo peso molecular, com grau de polimerização até 200 (66), também são denominados polissacarídeos não amídicos, descritos como gomas ou pentosanas de cereais (132, 142, 143). A maioria ocorre como heteroglicanas, con-

tendo diferentes tipos de unidades de hexoses (D-glucose, D-galactose, D-manose, ácido - 4 - O - metil - D - glucurônico , ácido D - galacturônico, ácido - D - glucurônico) e pentoses (D - xilose, L - arabinose) e em quantidades menores L - rhamnose, L - fucose e vários outros açúcares neutros O - metilados (132). As angiospermas possuem de 24 a 40 % de hemiceluloses enquanto que as gimnospermas, 25 a 35 % (66,132).

A lignina é o terceiro maior componente da parede celular e o principal constituinte da substância intercelular, responsável pela manutenção da integridade e coesão estrutural das fibras vegetais (27). É um polímero altamente ramificado, constituído de unidades de fenilpropano interligadas por diferentes tipos de ligações (alquil-aril, alquil-alquil, aril-aril). A proporção relativa dos álcoois cinâmílicos precursores : cumarílico, coniferílico e sinapílico, incorporados na lignina, varia não somente com a espécie vegetal, mas também com o tecido vegetal, idade, clima, luz solar, etc (75). As angiospermas apresentam entre 18 a 25 % de lignina, ao passo que as gimnospermas, possuem maior teor ou seja, de 25 a 35 % (66).

A lamela média que separa as células vegetais umas das outras, contém 70 % de lignina e constitui uma camada impermeável, sobre a parede vegetal, que impede, o acesso de agentes hidrolíticos, ao redor dos poros (65 , 107). A lignina está física e quimicamente ligada às hemiceluloses e à celulose através de ligações covalentes, pontes de hidrogênio e forças de Van der Waals (107).

Modelos que esquematizam a estrutura da parede celular de uma fibra vegetal (02, 132), celulose, hemicelulose

e lignina além dos diversos componentes celulares de angiospermas e gimnospermas tem sido publicados respectivamente por Timell (132) e Fan (55) e podem ser observados nas Figuras 01 e 02 . Além do arranjo molecular ordenado da celulose nas regiões cristalinas das microfibrilas, a lignina constitui a barreira física, ligada aos carboidratos, que limita a ação de celulasas e hemicelulasas. Portanto para o aproveitamento dos resíduos lignocelulósicos são necessários pré-tratamentos físicos, físico-químicos ou biológicos ou a ação seqüencial conjunta de dois ou mais pré-tratamentos para um aproveitamento eficiente e integrado.

O pré-tratamento físico permite a obtenção de materiais de baixo índice de cristalinidade e elevada superfície específica, que concorrem para o aumento da susceptibilidade à ação enzimática (47, 77). Inclui processos mecânicos e não mecânicos (pirólise, radiação de alta energia, moagem úmida) (34).

O pré-tratamento físico-químico compreende a ação de vapor (alta pressão, explosão) ou explosão por congelamento) (34).

A ação de compostos químicos como álcalis (hidróxido de sódio, amônia, sulfato de amônio), ácidos concentrados ou diluídos (clorídrico, sulfúrico, fosfórico), gases (ClO_2 , NO_2 , SO_2 , O_3), agentes oxidantes (H_2O_2 , ácido peracético), solventes de celulose puros ou combinados com álcalis ou sais (cadoxen * , CMCS * , Cuoxan *), e solventes (glicerol, etilenoglicol, dioxano, fenol) são usados para a

(*) ver índice de abreviaturas

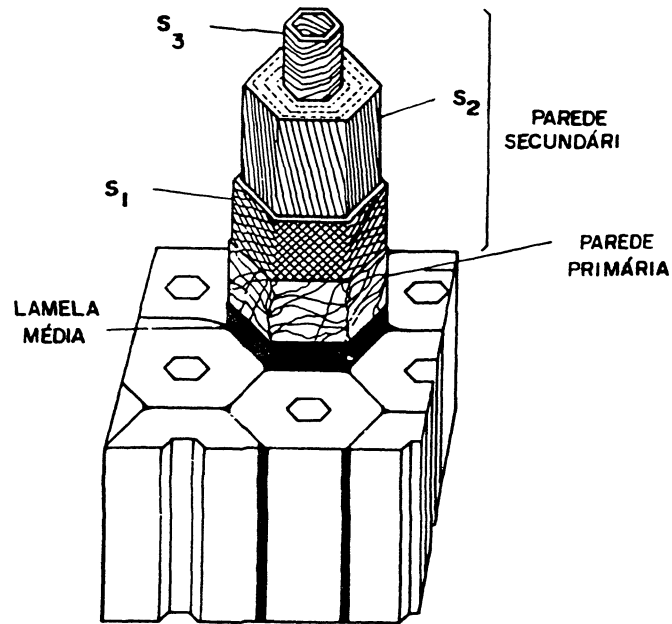


Figura 01 : Estrutura simplificada da parede celular de uma fibra vegetal segundo Wardrop citado por Timell (132).

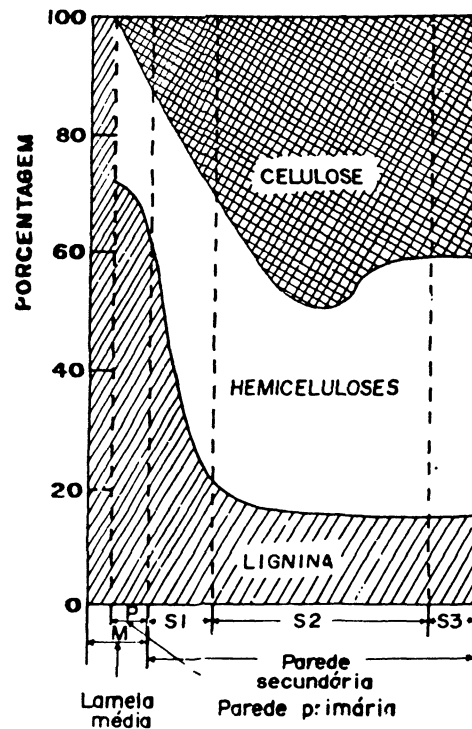


Figura 02 : Distribuição da celulose, hemiceluloses e lignina no interior da parede celular segundo Fan e colaboradores (55).

remoção de lignina e destruição da estrutura cristalina (25, 32, 34).

O pré-tratamento biológico compreende a ação de microrganismos apodrecedores de madeira, que podem metabolizar de forma mais eficaz um ou mais dos polímeros: celulose, hemicelulose e lignina, dependendo da sua fisiologia a qual é resultante do potencial genético bem como das condições de adaptação comandadas pelo seu habitat (01).

A produção de etanol a partir de materiais lignocelulósicos tem recebido mais atenção do que muitos outros produtos químicos. A razão para isto é o fato de que o etanol pode ser usado como combustível líquido, como solvente e como matéria prima para a síntese de uma ampla variedade de produtos (etileno, butadieno, acetaldeído, éter dietílico, etc.). O álcool combustível pode ser usado nos motores apropriados ou pode ser adicionado à gasolina para aumentar o volume da mistura combustível (79, 124).

Para a viabilização econômica da produção de etanol a partir de materiais lignocelulósicos, além do desenvolvimento de processos de pré-tratamentos menos onerosos e de menor consumo energético, também será necessária uma série de pesquisas dirigidas para a seleção e melhoramento de microrganismos produtores de enzimas celulolíticas, hemicelulolíticas e lignolíticas, diminuição do custo de produção das referidas enzimas, otimização das etapas de sacarificação e fermentação, incluindo o aproveitamento da lignina e a bioconversão da xilose (120)

Independentemente do(s) tipo(s) de pré-tratamento(s) efetuado(s) o objetivo maior é a modificação

da fibra celulósica deixando os polímeros: celulose, hemicelulose e lignina parcial ou totalmente solubilizados para uma etapa posterior do aproveitamento.

1.1.1 Aproveitamento de Celulose

A celulose proveniente de material lignocelulósico pré-tratado pode ser sacarificada para obtenção de glucose que poderá ser fermentada a etanol e outros solventes (acetona, butanol, isopropanol, etc). Porém para a eficiência desta conversão o pré-tratamento e as enzimas utilizadas são fatores primordiais.

A celulose pode ser hidrolisada através da ação de ácidos ou de enzimas para a produção de glucose. Processos comerciais de hidrólise existem na Rússia e novas tecnologias estão sendo pesquisadas. Porém existem limitações dos processos que utilizam ácidos tais como, a degradação da glucose (formação de hidroximetilfurfural), interação do ácido com materiais não celulósicos, corrosão dos equipamentos, resultando em baixa produtividade, xaropes impuros e de custo elevado (90).

Mary Mandels (90) salientou que muitos microrganismos crescem sobre a celulose, degradam-na, porém poucos produzem níveis significativos de enzima requeridos para degradar extensivamente a celulose "in vitro". O crescimento e a decomposição rápida da celulose ou a produção de níveis elevados de enzimas que degradam derivados solúveis de celulose, não são critérios adequados para a seleção de microrganismos produtores

de celulase para aplicação prática. O microrganismo deve secretar grandes quantidades de todas as enzimas componentes do complexo celulolítico no meio de cultivo. Espécies do gênero *Trichoderma* constituem fontes de celulase ativa, principalmente o *Trichoderma reesei*.

A produção de celulasas em escala piloto tem sido desenvolvida utilizando-se resíduos celulósicos e, subseqüentemente, as enzimas produzidas são utilizadas para hidrolisar o mesmo resíduo (06, 21, 89, 90).

Preparações de celulase de *Trichoderma* têm sido utilizadas na obtenção de açúcares solúveis a partir de vários tipos de celulose (31, 89, 90, 105, 140, 141).

Na década de 80 a auto-hidrólise através de explosão a vapor ("steam explosion") foi bastante estudada em vários tipos de resíduos como: bagaço de cana (47, 78, 88), cascas de semente de girassol, serragem de angiosperma (*Eucaliptus regnans*) e de gimnosperma (*Pinus radiata*) (47, 78, 88), casca de cevada (50). Vários trabalhos publicados mostram resíduos lignocelulósicos pré-tratados por explosão a vapor (17, 37, 87, 88, 115, 144) ou por outros métodos (01, 25, 58, 99, 110, 137) e em seguida sacarificados com celulasas (30, 39). Dekker e Wallis obtiveram 70 - 80 % de glucose após 72 horas de hidrólise da celulose de bagaço de cana, obtida após pré-tratamento com explosão a vapor, com celulasas de *Trichoderma reesei* QM 9414 .

Flickinger e Tsao (57) analisaram os produtos de fermentação a partir de materiais celulósicos. Além da produção de álcool industrial e outros derivados químicos como o etileno, ácido acético, n-butanol, 2,3-butanol, acetona,

butadieno, metil-etil-cetona, metil-vinil-cetona, etc., os referidos autores citaram os xaropes de glucose, obtidos a partir de resíduos celulósicos, como vantajosos para a produção de polissacarídeos microbianos tais como dextrana e goma xantana.

Dunlap e Callihan (52) relataram sobre a possibilidade econômica da produção de proteína unicelular a partir de celulose de bagaço de cana. O potencial dos carboidratos para a produção deste tipo de proteína também foi analisado por Flickinger e Tsao (57), que salientam os açúcares de fonte renovável como o maior potencial para o futuro. Dabbah (29) considera que a demanda alimentar continuará a aumentar drasticamente como resultado do crescimento da população, concomitantemente com o aumento do padrão de vida em todos os países do mundo .

Em se tratando do aproveitamento de celulose para a alimentação humana deve-se considerar a produção de cogumelos comestíveis. Segundo a revisão de Rajarathnam e Bano (111), existem microrganismos como o *Pleurotus ostreatus*, que na fase de frutificação dos cogumelos, consomem de forma significativa a celulose e o substrato residual colonizado pode, após a colheita dos frutos, ser utilizado como ração animal ou ainda como adubo (102, 111).

Merece atenção, o emprego da celulose visando a produção de pasta de celulose para a fabricação do papel. O bagaço de cana, em especial, constitui uma alternativa interessante considerando-se o caso do Brasil, que utiliza madeira (ex: eucalipto) para a produção da pasta de celulose e exporta parte dela para a Europa.

Ratledge (112) analisa entre vários substratos

para fermentação o amplo interesse mundial do aproveitamento da celulose de resíduos e cita estimativas de custos para utilização enzimática para conversão de celulose a glucose. Em suas conclusões gerais o referido autor comenta que a hidrólise química e enzimática mais a fermentação até etanol é provavelmente o método mais simples e mais econômico.

1.1.2 Aproveitamento de lignina

Kirk, Higuchi e Chang publicaram em 1981, dois volumes sobre Biodegradação de Lignina: Microbiologia, Química e Aplicações em potencial (75). Nestes livros estão compilados os trabalhos apresentados e as publicações dos participantes de um Congresso Internacional sobre Biodegradação de Lignina em 1978, onde a preocupação primeira era estimular um maior conhecimento sobre o assunto considerando que até então, a falta de um bom conhecimento da química de lignina bem como a inexistência de um incentivo prático, que gerasse suporte para pesquisa, eram evidentes. A partir deste Congresso, várias revisões citadas por Rodriguez e Durán (116) foram publicadas mostrando que a compreensão da biodegradação de lignina é a "chave" para o aproveitamento integral de toda biomassa renovável.

A lignina possui uma série ampla de utilização como por exemplo na produção de fertilizantes nitrogenados de liberação lenta, pesticidas de liberação controlada, dispersantes, antioxidantes, cargas de borracha e de asfalto e

grafites sintéticos (78).

Segundo Aspinall (03) algumas ligninas podem estar ligadas a hemiceluloses como arabinoxilanas e xiloglucanas. Corrêa e colaboradores (26) demonstraram a existência de ligação ester entre os ácidos urônicos pertencentes a O - acetil (4-O-metil-D-glucurono)-D-xilana e a lignina de *Mimosa scabrella* . Cerca de 30 % do total de ácidos urônicos desta hemicelulose nativa estavam ligados por ligações tipo-ester com a lignina.

Mackenzie e Bilous (84) relataram que polímeros de ácido ferúlico e de ácido p-cumárico fazem parte da constituição da parede celular das plantas. O ácido ferúlico foi identificado como 2-O-[5-O-(trans-feruloil)- β -L-arabino-furanosil]-D-xilopiranose no farelo de trigo e também foi encontrado na parede celular de casca de cevada juntamente com o ácido trans-p-cumárico também ligados à arabinoxilanas. Os referidos autores citam ainda que, no espinafre, os ácidos fenólicos estão esterificados com resíduos de galactopiranose e arabinopiranoses, e que ligações éster envolvendo ácidos fenólicos tem sido identificadas em certas ligninas. Porém, poucas informações sobre a hidrólise enzimática destas ligações estão disponíveis. A esterase do ácido fenólico de *Schizophyllum commune*, estudada pelos autores , libera ácido ferúlico de farelo de trigo livre de amido, foi produzida preferencialmente quando o microrganismo cresceu em celulose como fonte de substrato, e age sinergisticamente com xilanases não sendo capaz de atacar substrato com alto peso molecular.

A deslignificação de materiais lignocelulósicos pode ser obtida por solventes orgânicos puros ou em misturas

aquosas, com ou sem a adição de catalisadores, à temperatura na faixa de 150 a 200 °C. Podem ser utilizados solventes orgânicos como: metanol, etanol, etilenoglicol, álcool tetrahidrofurfurílico, dimetilsulfóxido, cetonas, éteres e fenóis, na presença ou não de catalisadores tais como: ácidos minerais, ácidos orgânicos, sais e bases (75).

O pré-tratamento biológico por fungo ou mesmo por bactérias poderá ter aplicabilidade biotecnológica futuramente.

A degradação de lignina por fungos é classificada como podridão branca (basidiomicetos e alguns ascomicetos), podridão marrom (basidiomicetos) e podridão suave (ascomicetos), dependendo do tipo de apodrecimento que eles causam (75).

Rodríguez e Durán revisaram sobre alguns aspectos novos da biodegradação enzimática de lignina (116). Citam que os fungos que decompõem lignina, cuja degradação é classificada como podridão branca, são conhecidos como os mais eficientes degradadores deste polímero, degradando mais de 97 % da lignina da madeira "goma doce" estudada por Cowling. Alguns fungos que degradam lignina têm sido selecionados. O *Picnoporus cinnabarinus* e *Phlebia radiata* são tão eficientes degradadores quanto o *Phanerochaete chrysosporium* (116).

As bactérias podem metabolizar monômeros aromáticos porém poucas atacam macromoléculas de lignina (116) . Xantomonas podem degradar rapidamente lignina sintética e actinomicetos termofílicos dissolvem rapidamente 40 % de lignina marcada (94).

Uma revisão sobre a degradação de lignocelulósicos por actinomicetos que abrange desde o

isolamento, papel ecológico, identificação, bem como a degradação de celulose, hemicelulose e lignina até a aplicação do potencial biotecnológico, foi publicado por McCarthy em 1987 (94). Segundo este autor, um melhor entendimento sobre a degradação de lignina por microrganismos teria também implicações importantes para a prevenção e tratamento do apodrecimento de madeira e a bioquímica de humificação do solo.

A degradação de lignina por actinomicetos está limitada principalmente a variedades de *Streptomyces*. A atividade degradativa primária dos actinomicetos é a solubilização de lignina. A identificação das enzimas envolvidas na degradação por actinomicetos é a prioridade mais importante nas pesquisas futuras de acordo com McCarthy (94).

A deslignificação biológica como alternativa para a polpação química é ainda um atrativo em escala comercial. Entretanto, as ligninases de *Phanerochaete chrysosporium* teriam aplicações comerciais nos processos de clareamento de polpa (131). Os actinomicetos são mais ativos sobre as ligninas de gramas e tem sido dada ênfase no uso de streptomicetos para obtenção de compostos fenólicos de baixo peso molecular a partir de resíduos lignocelulósicos. Futuramente poderão ser utilizadas técnicas de DNA recombinante para melhorar variedades de *Streptomyces*. O melhoramento da produção de enzimas pela amplificação e desrepressão de gene, e a construção de variedades recombinantes, podem seletivamente deslignificar e solubilizar completamente resíduos lignocelulósicos (94).

Crawford e colaboradores (28) mutaram através de irradiação ultravioleta e fusão de protoplastos uma cepa selvagem de *Streptomices viridosporus* T 7A a qual degrada

lignina e produz polímeros modificados denominados APPL (lignina polimérica precipitável por ácido) solúveis em água. Esta lignina polimérica pode ser útil como antioxidante, surfactante e pode ser utilizada como componente de resinas e adesivos. O mutante obtido por Crawford e colaboradores aumentou em mais de 90 % a capacidade de produção da lignina polimérica a partir de lignocelulose de sabugo de milho (28).

A ligninase é caracterizada como uma peroxidase com base nas suas propriedades espectrais e pelo peróxido de hidrogênio necessário na catálise. O mecanismo da atividade da ligninase foi discutido por Rodríguez e Durán (116).

As aplicações mais importantes do sistema lignolítico poderão ser : na manufatura de produtos de celulose, na conversão de resíduos lignocelulósicos em ração e alimento e na conversão e tratamento de derivados de lignina para produção de aditivos e outros produtos potencialmente utilizáveis.

1.1.3 Aproveitamento de hemiceluloses

Sendo as hemiceluloses um grupo de heteropolissacarídeos complexos no qual predominam hetero-1,4- β -xilanas ou hetero-1,4- β -mananas, torna-se mais difícil o aproveitamento integral, dada a heterogeneidade dos resíduos de açúcares ramificantes interligados à cadeia principal.

As hemiceluloses de angiospermas e de resíduos agrícolas tais como casca de cereais, sabugo de milho, bagaço

de cana, etc são constituídos principalmente de xilanas (38,49). As hemiceluloses de gimnospermas e de sementes de leguminosas tais como guar e gomas são constituídas principalmente de mananas (38). Na Figura 03 estão representadas estruturas de algumas hemiceluloses de angiospermas e gimnospermas comumente encontradas em espécies de madeira (38). As estruturas das hemiceluloses tem sido discutidas em detalhes por Aspinnall, Timell e Wilkie (03, 132, 133, 142).

Para se isolar hemicelulose o material lignocelulósico deve ser submetido a uma extração seqüencial sendo primeiramente tratado com benzeno-etanol (1:1) ou clorofórmio-metanol (2:1) para a remoção de lipídeos e carboidratos solúveis; solução de oxalato de amônio ou EDTA para remover substâncias pécticas e por último, solução alcalina 5 a 10 % , para solubilizar as xilanas ou 17 a 24 % , para as mananas. Os extratos alcalinos quando acidificados até pH 4,5 - 5,0 resultam na precipitação da hemicelulose "A" e os polissacarídeos que permanecem em solução são precipitados com três volumes de etanol, resultando a hemicelulose "B". A hemicelulose "A" comparativamente à hemicelulose "B" é caracterizada por apresentar maior peso molecular, ser insolúvel em água e apresentar menor conteúdo de ácido glucurônico e arabinose. A hemicelulose "B" é altamente ramificada, tem baixo peso molecular, é solúvel em água e contém mais ácido glucurônico e arabinose (36). Se o extrato alcalino for tratado diretamente com etanol são precipitadas as hemiceluloses totais (sem fracionamento pelo tamanho molecular). A extração de hemiceluloses de gimnospermas envolve outros tipos de tratamentos descritos por Timell (132).

Nos alimentos de origem vegetal e seus derivados como verduras, frutas, cereais e pão, as hemiceluloses juntamente com a celulose e lignina, constituem as fibras da dieta as quais não são hidrolisadas pelas enzimas do trato gastrointestinal humano, auxiliando na prevenção de certas doenças (36).

As enzimas que degradam as hemiceluloses são hidrolases denominadas hemicelulases. Estas enzimas são encontradas nos fungos de origem terrestre, sendo os fitopatógenos particularmente as fontes mais comuns (44). As bactérias de ambiente terrestre e marinho, leveduras, microrganismos do rúmen (bactérias e protozoários), bactérias do ceco de ruminantes e não ruminantes, simbiontes habitantes do trato digestivo de insetos xilófagos, certos moluscos, crustáceos, algas marinhas e sementes de plantas em fase de germinação, também constituem fontes de hemicelulases. Porém todas estas enzimas não tem sido detectadas na mucosa do trato digestivo dos vertebrados, incluindo o homem (36, 44).

As enzimas hemicelulolíticas são tipicamente aquelas que degradam as glicanas que constituem a cadeia principal das hemiceluloses recebendo a terminação ase correspondente ou seja: β -D-galactanases, β -D-mananases e β -D-xilanases. São excluídas deste grupo de enzimas as exoglicosidases específicas tais como as α e β -D-xilosidase, as quais hidrolisam não somente glicosídeos de baixo peso molecular como também as cadeias curtas ou os monossacarídeos ramificantes da cadeia principal das hemiceluloses (36).

Uma ampla revisão sobre hemicelulases foi publicada por Dekker e Richards em 1976 (44) onde foram

apresentados a ocorrência, os mecanismos de ação e as propriedades destas hidrolases desde 1950 a 1973.

Entre as hemicelulases, as xilanases se destacam devido a sua atuação sobre a xilana que é o principal constituinte das hemiceluloses das plantas (38). A xilana é considerada um estoque em potencial para gerar alimento e combustível, paralelamente com a celulose, à qual está intimamente ligada. Portanto, para o aproveitamento da hemicelulose, são necessários pré-tratamentos eficientes para extraí-las, solubilizá-las facilitando a etapa de sacarificação enzimática, que promoverá a obtenção, principalmente, do xarope de xilose. A bioconversão da xilose constará de uma outra etapa do processo para a produção de acetona, butanol, etanol ou xilitol, dependendo do potencial genético do microrganismo selecionado para a obtenção do produto desejado.

Magee e Kosaric em 1985 (86) abordaram o tema bioconversão de hemiceluloses salientando a ocorrência, o potencial destes carboidratos presentes nos resíduos agrícolas e os aspectos do metabolismo de pentoses pelas bactérias, leveduras e fungos. Também foram discutidos aspectos da extração de hemicelulose : autohidrólise, extração alcalina (fraciona - mento), hidrólise ácida seletiva e hidrólise enzimática. Estão exemplificados no artigo processos de utilização de sabugo de milho, palha de trigo e madeira de angiosperma e gimnosperma.

É evidente que a hidrólise enzimática constitui uma etapa importante no aproveitamento de hemiceluloses devido a grande especificidade, porém entre os inconvenientes estão o custo elevado das enzimas e a baixa velocidade de hidrólise (09, 86, 146).Conseqüentemente, estudos sobre a produção de xilanases

são necessários para viabilizar o processo de aproveitamento das hemiceluloses.

1.1.3.1 Produção de xilanases

A produção de xilanases visa dois aspectos para aplicação. O primeiro seria para a utilização conjunta com celulasas e o segundo envolve processos isentos de celulasas (09).

Em geral, as preparações de celulasas contém enzimas xilanolíticas. As xilanases são utilizadas juntamente com celulasas na conversão da xilana de resíduos agrícolas e de madeiras e nas indústrias de produção de polpa de papel, à D-xilose (09). O emprego destas enzimas juntamente com celulasas e pectinases promove clareamento de sucos e liquefação de frutas (09) e de mucilagem de café (146). Outro uso em potencial destas enzimas é na produção de vinho, para modificar as propriedades organolépticas e reológicas e no isolamento de protoplastos de folhas de batata, para posterior hibridização (146).

Os processos isentos de enzimas celulolíticas devem remover a xilana durante a produção de polpa dissolvida. Este processo envolve a extração alcalina resultando um licor rico em xilana o qual é descartado. Um processo enzimático bem sucedido poderia produzir uma mistura de açúcares fermentáveis em vez de líquidos poluentes contendo xilana. Uma outra

aplicação seria no processamento de fibras vegetais tais como linho e rami. Atualmente, a liberação da fibra é afetada por "retting", isto é, a remoção de material ligante nos tecidos usando enzimas produzidas "in situ" pelos microrganismos. Acredita-se que as pectinases desempenham o papel principal neste processo mas as xilanases podem também estar envolvidas. Uma pequena substituição, no "retting" natural pelo tratamento com mistura artificial de enzimas poderia se tornar uma nova e rápida tecnologia para a liberação de fibra (09).

As 1,4- β -D-xilanases (E.C. 3.2.1.8, 1,4 β -D-xilana xilano-hidrolases) são enzimas do tipo endo e somente estas tem sido claramente caracterizadas. Isto não impede, entretanto, a possibilidade da existência de exoxilanases [1,4 - β -D-xilana xilo(bio)hidrolases]. As xilanases hidrolisam as ligações 1,4 - β -D-xilopiranosídicas de xilanas tais como L-arabino-D-xilanas, L-arabino-D-glucurono-D-xilanas e D-glucurono-D-xilanas. Certas endoxilanases altamente purificadas são capazes de hidrolisar celulose tão bem quanto xilanas (38). Dekker (38) cita que Shikata estudou uma exo-1,4- β -D-glucanase (uma carboximetilcelulase), altamente purificada, que degradou carboximetilcelulose (CMC) a celobiose e glucose, e D-xilana a xilobiose, sem a concomitante produção de D-xilose. Porém esta enzima mostrou maior afinidade para celulose do que para xilana.

A Figura 04 apresenta as etapas da biodegradação das heteroxilanas segundo Dekker (37).

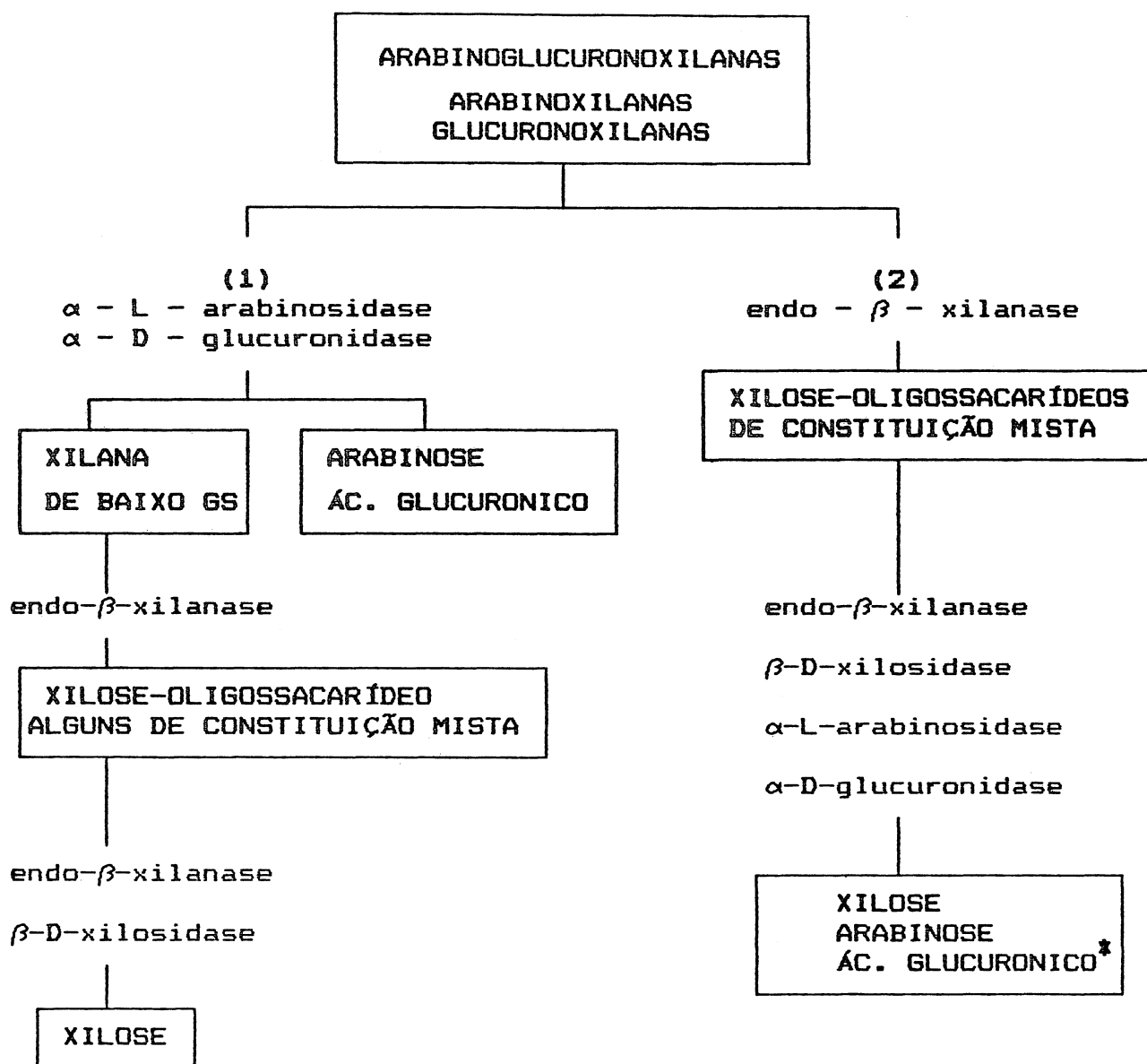


FIGURA 04 : Etapas da biodegradação de heteroxilanas segundo Dekker (37). * E seus 4-O-metil-derivados.

A maioria dos trabalhos tem se concentrado no estudo da purificação e caracterização de xilanases enquanto que muito pouco tem sido relatado sobre a produção, aplicação e o processo econômico de se utilizar as enzimas xilanolíticas(108).

As xilanases desempenham um papel importante na velocidade de decomposição das plantas no solo pelos microrganismos (36). Embora elas também possam ser isoladas de plantas, os microrganismos constituem a principal fonte de obtenção destas enzimas.

As xilanases de *Trichoderma viride* e de *Aspergillus niger* e várias enzimas que degradam polissacarídeos, tem sido identificadas como glicoproteínas. São sintetizadas nos poliribossomas do retículo endoplasmático, glicosiladas no aparelho de Golgi e transportadas através da parede celular , para o meio de cultivo. O mecanismo de transporte ainda não está bem esclarecido. Uma vez exportadas, as xilanases são capazes de degradar a fonte de substrato em produtos de pesos moleculares menores, os quais são permeáveis à parede celular, sendo portanto assimilados e utilizados pelos microrganismos (36).

A Figura 05 apresenta uma xilana hipotética e os sítios de ataque das enzimas xilanolíticas microbianas segundo Biely (09).

1.1.3.1.1. Microrganismos

A seleção de microrganismos produtores de xilanases constitui uma etapa importante de um processo

biotecnológico no qual estas enzimas deverão ser empregadas.

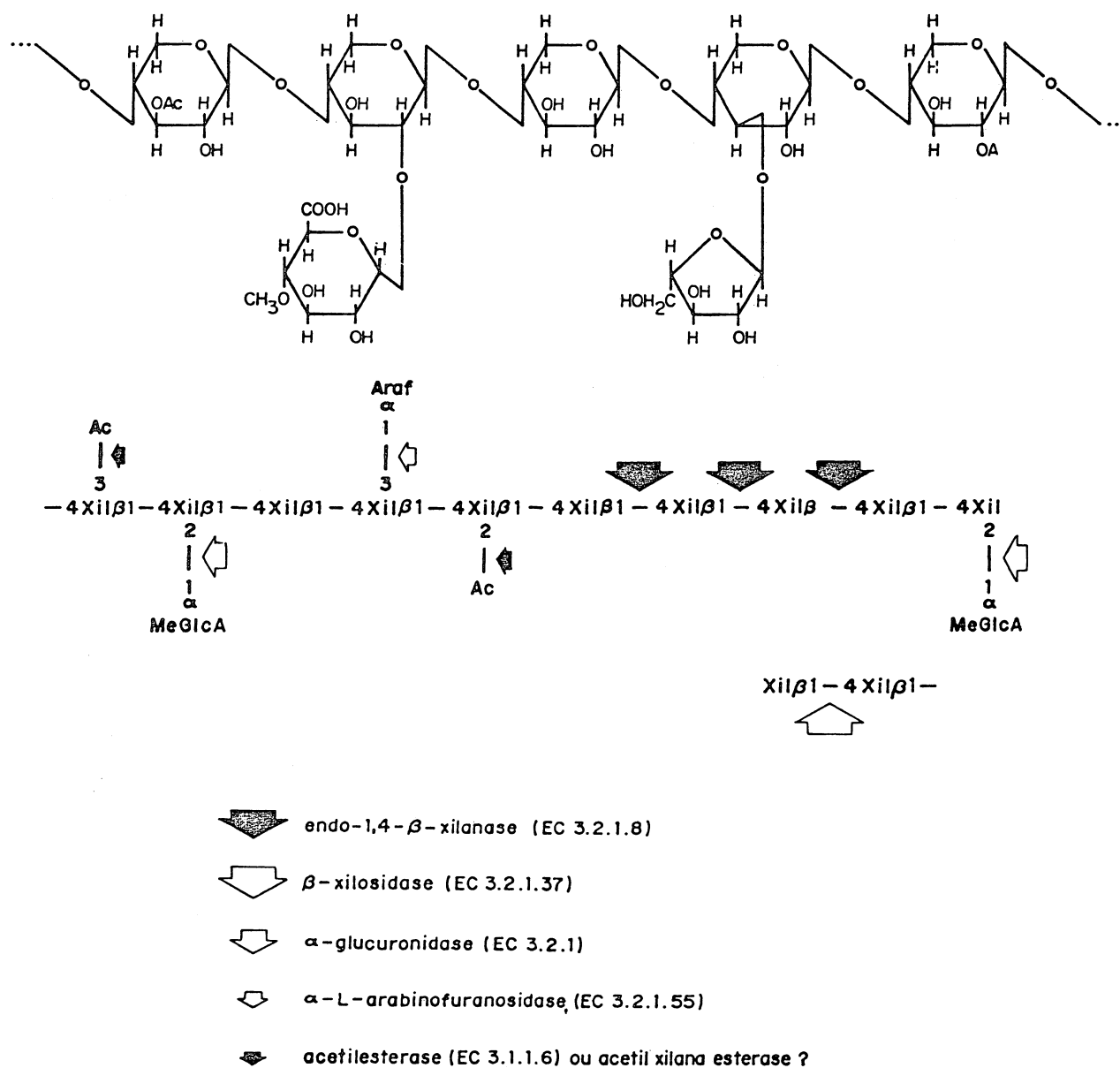


Figura 05 : Estrutura hipotética de uma xilana e os sítios de ataques das enzimas xilanolíticas microbianas, segundo Biely (09).

Cada linhagem de microrganismo produz um grande número de enzimas, mas a quantidade absoluta e relativa de várias enzimas produzidas varia bastante de uma espécie para outra, e também entre linhagens de uma mesma espécie. Portanto devem ser selecionadas linhagens que tenham alta capacidade de produção da enzima desejada. O processo de seleção consiste na escolha de culturas originais para produção da enzima e na obtenção de novas linhagens de potencial mais elevado (104).

A grande maioria dos estudos desenvolvidos até o presente, está direcionada para uma avaliação da atividade xilanásica de fitopatógenos como *Ceratocystis paradoxa* e *Cephalosporium sacchari*, decompositores do caule de cana de açúcar, ou de fungos celulolíticos como o *Trichoderma reesei* QM 9414 (31, 40, 41, 42, 43, 44). Fungos como *Dactylium dendroides*, apodrecedor de madeira, *Fusarium oxysporum*, fermentador de pentoses (05, 139), assim como diferentes linhagens de *Aspergillus niger* (60, 63) tem sido estudados como xilanolíticos, além de outras espécies de *Aspergillus* : *awamori* (04), *fumigatus* (76, 119, 127), *ochraceus* (12, 13) , *japonicum* (122). Recentemente, em 1988, um estudo comparativo da produção de xilanases por espécies de *Aspergillus* (04), foi publicado dada a ampla capacidade deste gênero na produção de hidrolases comerciais.

Xilanases produzidas por actinomicetos mesofílicos crescidos sobre bagaço de cana (73) ou sobre outros substratos (08, 62, 85) também tem sido descritas. Porém é evidente a carência de trabalhos que objetivem e que descrevam a seleção de microrganismos xilanolíticos.

Senior e Saddler em 1990 (121) revisaram sobre trabalhos desenvolvidos na década de 80 para selecionar microrganismos celulolíticos. Verificaram que algumas linhagens que mostraram um bom halo de hidrólise em agar mais celulose, não produziram grandes quantidades de celulasas quando crescidas em meio líquido, onde fatores como aeração, concentração de substrato, tipo de substrato influenciaram a produção de celulase e xilanase. Foi selecionado entre os celulolíticos um *Trichoderma harzianum* que produziu altos níveis de xilanase quando crescido em substratos relativamente puros tais como "solka floc" ou sigmacel.

Na literatura científica estão descritas técnicas que podem ser utilizadas para selecionar microrganismos celulolíticos e xilanolíticos em geis. Porém a xilana deve ser tratada com corante como o remazol brilliant blue R ou ser revelada com um reagente como lugol em cloreto de cálcio saturado(10, 56, 59). O halo claro resultante pode então ser analisado após a hidrólise da xilana . Entretanto para celulasas (118), o diâmetro do halo de atividade pode não corresponder aos valores de atividade obtidos em meio líquido, porque está na dependência de vários fatores interferentes como o próprio substrato insolúvel. Portanto a seleção de microrganismo em meio líquido, deve ser considerada uma técnica eficiente apesar de trabalhosa e do tempo requerido para se obter o resultado.

Considerando-se que a seleção de microrganismos é uma etapa fundamental na produção de xilanase dentro do estudo da viabilização de um processo, a escolha do substrato a ser utilizado como fonte de carbono para a produção destas enzimas

também é relevante.

1.1.3.1.2. Fonte de carbono, processo fermentativo e meio de cultivo

Em geral as enzimas hemicelulolíticas são induzidas quando o microrganismo é crescido em substratos celulósicos. Existem também relatos de hemicelulases produzidas constitutivamente independente do substrato de crescimento. A xilana é considerada o melhor substrato indutor para a produção de xilanase. A xilose e xilitol são considerados repressores da síntese de xilanase (09 , 32 , 34).

Estudos sobre os mecanismos regulatórios da síntese das enzimas xilanolíticas poderão colaborar no aumento da produção. Estes estudos tem sido desenvolvidos com bactérias e leveduras, porém a natureza da regulação em fungos filamentosos não tem sido estabelecida. Parece que xilanases de fungos são induzíveis ou controladas sob desrepressão, os quais incluem a produção da enzima em fontes de carbono que são usadas vagorosamente. Estudos regulatórios em fungos são frequentemente complicados devido a produção concorrente de xilanase e celulase e a especificidade cruzada de celulase e xilanase pelo substrato (09).

Os sistemas xilanolíticos e celulolíticos em alguns fungos filamentosos parecem estar sob controle regulatório separado. Durante o crescimento em xilana várias espécies produzem xilanases específicas com baixa ou sem atividade celulásica. Entretanto, quando crescidos em celulose,

são produzidas celulasas junto com xilanases . A razão para a produção de xilanases específicas em celulose não está clara. Talvez seja devido a presença de xilanas remanescentes na celulose ou desrepressão em celulose, a qual é uma fonte de carbono utilizada vagarosamente. Experimentos com *T. reesei* QM 9414 nos quais foram utilizados indutores de baixo peso molecular, mostraram que sofrorose induziu uma endo-1,4- β -glucanase específica e uma não específica, além da celobiohidrolase I (exo-1,4- β -glucanase) e muito pouca atividade xilanásica. A indução com xilobiose e xilana produziu somente xilanases específicas. Portanto, a estratégia para sistemas xilanolíticos livres de celulasas pode simplesmente ser o crescimento de células em xilanas não contaminadas por celulose (09 , 71).

Um *Penicillium janthinellum* isolado de madeira em decomposição , foi crescido em separado nas seguintes fontes de substrato: xilana, bagaço de cana, papel de filtro, amido, avicel, sacarose, L-arabinose, lactose, D-galactose, D-glicose, D-manose, D-xilose, ác. glutâmico, alanina, casaminoácidos, extrato de levedura e glicina. Xilanases foram produzidas apenas nos meios que continham xilana, bagaço de cana, papel de filtro, lactose, xilose e arabinose. Sendo que em xilose e arabinose cerca de 10 % da atividade induzida em xilana foi detectada, indicando que estes açúcares exercem um controle na secreção destas enzimas (96).

Através do trabalho clássico de Simpson (123) pode-se constatar a variabilidade da atividade de pentosanases de *Aspergillus niger* e *Trichoderma viride* crescidos tanto em fontes monoméricas como poliméricas. Recentemente, as mais variadas fontes de carbono desde xilanas comerciais, xilanas

isoladas nos próprios laboratórios, extratos hemicelulósicos solubilizados por pré-tratamentos, até pulverizados de farelo de trigo, palha de arroz, bagaço de cana tem sido utilizadas para diferentes microrganismos (08, 50, 61, 62, 69, 70, 72). A concentração da fonte de carbono é fundamental devendo-se levar em consideração se ela é monomérica, oligomérica ou polimérica. O consumo irá variar no decorrer do tempo, dependendo da afinidade do microrganismo conforme o desempenho de suas vias metabólicas durante o processo fermentativo.

A produção de xilanase pode ser desenvolvida através de cultivo submerso ou em fase sólida. A maioria dos trabalhos relatam a obtenção destas enzimas em frascos agitados (04, 12, 13, 31, 127), em fermentadores (04 , 31, 93), e muito poucos em fase sólida (12, 13, 114).

Os dois processos apresentam aspectos positivos e negativos. No cultivo submerso por exemplo, o fato de as xilanases serem extracelulares e a xilana uma fonte de carbono insolúvel, a agitação além de favorecer a troca de gases, ainda promove uma homogeneização do substrato para ser hidrolisado em paralelo com a secreção das enzimas, favorecendo a utilização dos produtos pelo microrganismo, no decorrer do processo. As enzimas estarão presentes no meio de cultivo e parâmetros como variação de pH, taxa de oxigênio e alguns nutrientes poderão ser controlados em um fermentador adequado. Através de centrifugação e filtração as enzimas são coletadas para posterior concentração. O consumo de energia elétrica é constante no decorrer deste processo.

Na fermentação em fase sólida os parâmetros como pH, nutrientes, taxa de oxigênio não podem ser controlados.

Porém deve-se ter em mente que este é o processo que mais se aproxima da decomposição ocorrida na natureza. Não há consumo de energia elétrica, as enzimas devem ser submetidas a extração adequada para posterior concentração (14). Este processo denominado "koji" tem sido utilizado pelos orientais na preparação de alimentos (54, 145), porém deve ser mais investigado para a obtenção de enzimas xilanolíticas a partir de resíduos lignocelulósicos, conforme vem sendo demonstrado pelos trabalhos recentes de Biswas e colaboradores (12, 13) e Rezende e colaboradores (114).

Em qualquer uma das condições de cultivo citadas, a presença de macro e micronutrientes fornecidos por um meio de cultivo apropriado, são necessários para o microrganismo produtor de xilanase.

A escolha do meio de cultura é tão essencial para o sucesso de um processo fermentativo quanto a escolha do microrganismo. O meio deve fornecer nutrientes necessários para o crescimento e a energia necessária para a síntese de material celular, além de obviamente, fornecer o material exigido para a biossíntese das enzimas. Nem sempre o meio que permite o melhor desenvolvimento do microrganismo favorece a formação desta hidrolase.

Em bioquímica industrial, o meio ideal é aquele que garante a melhor produção, num mínimo de tempo, dificultando o crescimento de contaminantes sendo sobretudo, econômico (104).

Para se ter uma idéia do comportamento dos microrganismos num processo fermentativo, importa saber como os mesmos controlam suas atividades metabólicas, a fim de que se

possa tentar compreender a influência de certos fatores nutricionais sobre o processo de produção de xilanase.

Simpson em 1959 (123) estudou alguns fatores que afetam a produção de pentosanases pelo *Aspergillus niger* e *Trichoderma viride*. O meio basal testado consistia em 2 % de carboidrato, 0,4 % de $(\text{NH}_4)_2\text{PO}_4$, 0,1 % de KCl, 0,5 % de CaCO_3 e 0,10 % de uma mistura de sais : 1 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 0,01 g de $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0,005 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$, 0,0075 g $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ e 0,01 g $\text{FeSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$. Verificou que a adição de fonte de nitrogênio no meio basal afetou mais a produção de pentosanase para o *T. viride* do que pelo *A. niger*. O *T. viride* foi sensível a acetato uma vez que a produção de pentosanases foi menor na presença de acetato de amônio e de caseína hidrolisada. O germe de malte foi um excelente suplemento para a produção destas enzimas para ambos os gêneros, porém o caldo de milho foi eficiente apenas para o *A. niger*. O ácido glutâmico foi um importante nutriente para o *T. viride*.

O farelo de trigo foi selecionado por Simpson (123) para a produção de pentosanases pelo *A. niger* cuja concentração mais adequada foi 3 %, além de caldo de milho 3 %, carbonato de cálcio 1 %. A temperatura ótima foi 35 °C.

Dekker em 1983 (31) estudou a produção de xilanase e β -xilosidase pelo *T. reesei* QM 9414 em fermentador, contendo 1 % de hemicelulose total isolada de bagaço de cana, como fonte de carbono, durante 130 horas. Constatou que o controle do pH a 4,5 aumentou o nível das enzimas hemicelulolíticas e que a influência do pH foi mais pronunciada na síntese da β -xilosidase do que para a síntese de xilanase. Quando o pH do meio não foi controlado houve uma variação

significativa uma vez que o pH inicial era 5,3 e no final foi maior que 6,5. Quando o bagaço foi utilizado como fonte de carbono, em 24 horas, houve uma queda do pH para 4,3 - 5,0 e em seguida subiu novamente para 6,5 - 7,0 .

Poutanem e colaboradores em 1987 (108) fizeram uma avaliação de diferentes sistemas xilanolíticos microbianos. Estudaram xilanase de *T.reesei* QM 9414, *Aspergillus awamori*, *Fusarium oxysporum*, *Bacillus subtilis* e *Streptomyces olivochromogenes*. A fonte de carbono para o *T. reesei* foi celulose "solka flocc" a 6 % enquanto que para os outros microrganismos foi farelo de trigo 3 % . A concentração de K_2HPO_4 e KH_2PO_4 foi 0,5 % para os fungos e 0,09 % e 0,03 % respectivamente para bactéria. O pH inicial foi 5,5 para os fungos e 7,0 para bactéria. Os tempos de cultivos foram 110 h. para o *T. reesei*, 96 h para o *A. awamori*, 120 h. para o *F. oxysporum*, 45 h para o *B. subtilis* e 90 h. para o *S. olivochromogenes*, para que a atividade xilanásica atingisse um nível máximo. As atividades das xilanases e da β -xilosidase foram maiores nos filtrados do *T. reesei*, nos quais também foram detectadas as maiores atividades para hidrolisar os grupos da cadeia lateral ou seja : acetil xilana esterase, glucuronidase e arabinosidase comparativamente com os outros gêneros estudados. Porém a preparação enzimática do *T. reesei* foi a única entre as outras que não poderia ser aplicada em casos onde a hidrólise da celulose não fosse desejada.

Em 1989 Bailey e Poutanen (04) estudaram a produção de enzimas xilanolíticas em 7 espécies diferentes de *Aspergillus* : *awamori*, *foetidus*, *fumigatus*, *niger*, *oryzae*, *phaenicis* e *terreus*. Utilizaram como única fonte de carbono

farelo de trigo a 3 % . A fonte de nitrogênio orgânico foi um destilado de grãos o qual Bailey e Oksanen, em 1984, demonstraram ser um nutriente indutor eficiente para a produção de hidrolases extracelulares de fungos. O meio ainda continha KH_2PO_4 (0,15 %), $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$ (0,5 %) e um pH inicial de $4,8 \pm 0,2$ após a esterilização sem ajustamento. Concluíram que o *A. oryzae* e o *A. foetidus* em condições subótimas podem ter potencial como fontes de enzima para a hidrólise seletiva de xilana de resíduos lignocelulósicos.

É realmente difícil desvincular o microrganismo, o substrato, o meio de cultivo e as condições de obtenção de xilanase através do tempo com ou sem temperatura, pH e aeração controlados. Todos estes parâmetros estão intimamente integrados com o potencial do microrganismo em estudo utilizando um substrato específico. Para se obter uma resposta fidedigna da concentração do produto formado e se atingir um ótimo de produção, através do estudo da variação dos principais fatores que afetam a síntese, é necessária uma técnica de dosagem adequada, precisa e padronizada a nível internacional para favorecer o acompanhamento do índice de produção atingido.

A determinação da atividade da xilanase ainda constitui uma questão em fase de padronização a nível internacional.

1.1.3.1.3 Determinação da atividade da xilanase

A unidade de atividade da xilanase é definida através da liberação de xilose, em μmoles , sobre uma xilana, a

uma temperatura e tempo definidos. O açúcar redutor liberado é determinado através de um método colorimétrico.

Existem trabalhos que utilizam xilana de "larch" como fonte de substrato "in vitro" (12, 13, 48, 60, 63). Atualmente esta xilana não está sendo comercializada tendo sido substituída pela xilana de "birch". Porém existem trabalhos que utilizam xilana de aveia (08, 85), ou isoladas de outros materiais lignocelulósicos como : bagaço de cana (31), madeira nativa como a *Mimosa scabrella* (bracatinga) (05).

A atividade da xilanase produzida por um microrganismo pode variar dependendo da afinidade desta enzima pela xilana utilizada "in vitro", portanto é importante a padronização do uso de um único tipo de xilana para a determinação da atividade enzimática..

Outras variáveis que podem ser constatadas nas publicações sobre xilanase são o pH e a temperatura do sistema de incubação. O pH tem variado na faixa de 4,5 a 8,0 (83, 84) e a temperatura de 30 a 60 °C (11, 82). Porém a maior dificuldade que se verifica para efeito comparativo em termos de unidade de atividade enzimática é a variabilidade dos métodos colorimétricos para a determinação dos açúcares redutores.

A atividade da xilanase tem sido detectada principalmente pelo método de Somogyi-Nelson (100, 125) e pelo método do DNS (97). Existem outros métodos descritos que detectam a solubilização da xilana através da modificação de um método turbidimétrico (123), ou solubilização de um corante liberado da xilana previamente corada (11), ou até mesmo um método nefelométrico (101) pelo qual se acompanha a atividade utilizando-se uma xilana solúvel.

Breuil e Saddler (16) fizeram um estudo comparativo entre o método do DNS (97) e o de Somogyi-Nelson (100, 23) para determinar açúcares redutores e a atividade da celulase. Verificaram que o método do DNS é mais rapidamente influenciado pelas condições de incubação e pelos componentes derivados do substrato lignocelulósico. Os valores de atividade da endo-1,4- β -D-glucanase, se obtidos com o ensaio do DNS, foram sempre consideravelmente mais elevados do que aqueles obtidos com o método cúprico-alkalino e não deram compostos reduzidos que fossem proporcionais aos números de grupos hemiacetal redutores. O ensaio cúprico alkalino não foi afetado pelo grau de polimerização do substrato, porém foi menos afetado pelas condições de incubação, natureza do substrato e a influência de componentes da celulase em cada ensaio específico das enzimas.

Com a finalidade de padronizar o ensaio enzimático para a determinação da atividade da xilanase e promover uma uniformidade nas publicações futuras, para facilitar a comparação dos resultados obtidos pelas diferentes instituições internacionais, um grupo de pesquisadores representando um total de vinte e duas instituições localizadas na Finlândia, Tchecoslovaquia, Nova Zelândia, Bélgica, Irlanda, Austria, Estados Unidos, Suécia, Canada, Russia, Dinamarca, Itália, França, Alemanha, Suíça e Brasil participam do "IEA xylanase assay round-robin". Este grupo é coordenado pela Dra. Kaisa Poutanen e pelo Dr. Michael J. Bailey do VTT - Technical Research Centre of Finland.

No primeiro "round-robin" cada instituição participante recebeu uma amostra de xilanase e uma de xilana

de "birch". Foi determinada a atividade da xilanase pelo método de rotina de cada laboratório, com o substrato também de rotina. Em seguida, com o substrato (xilana) enviado e pelo método de rotina. Por último, a atividade xilanásica foi determinada pelo método do DNS, pela técnica e substrato enviados.

No segundo "round", uma nova amostra de xilanase foi enviada e o método do DNS foi utilizado na determinação da atividade. Foram avaliadas as faixas de linearidade deste método, através da curva de concentração da enzima e do tempo de incubação.

O método do DNS tem demonstrado ser adequado, simples e útil para a determinação da atividade da xilanase. Os resultados dos ensaios do "IEA - Round Robin" foram compilados pelos coordenadores e juntamente com as conclusões serão publicados no Journal of Biotechnology neste ano de 1992.

Portanto a padronização do método de atividade da xilanase favorecerá o estudo da produção desta hidrolase e conseqüente compreensão do sistema xilanolítico, o qual constitui um amplo campo de pesquisa que pode colaborar no aproveitamento racional e integrado da biomassa lignocelulósica. Assim sendo, será possível o aprimoramento de tecnologias que viabilizem o emprêgo deste complexo enzimático, não somente na resolução de problemas do meio ambiente, como também na produção de alimentos, proporcionando melhoria da qualidade de vida da população.

2. OBJETIVOS

- 2.1 Isolar microrganismos de diferentes fontes lignocelulósicas em decomposição e de trato digestivo de insetos fitófagos.
- 2.2 Avaliar a produção de xilanase pelos isolados e por algumas linhagens conhecidas como celulolíticas, xilanolíticas e ou lignolíticas, após o crescimento em pulverizado de bagaço de cana 1 % (p/v).
- 2.3 Selecionar um ou mais microrganismos xilanolíticos usando xilanas isoladas de bagaço de cana e xilana de lariço ("larch wood") como substratos e/ou indutores, que promovam níveis elevados de xilanase e reduzidos ou nulo de celulase.
- 2.4 Determinar alguns parâmetros da produção de xilanase em bagaço de cana como única fonte de carbono, tais como: concentração de bagaço, quantidade de inóculo, meio de cultivo, tempo de cultivo, para um microrganismo xilanolítico selecionado.
- 2.5 Comparar a produção de xilanase pelo microrganismo selecionado quando crescido em bagaço de cana, em outras fontes lignocelulósicas pré-tratadas ou não e em xilanas isoladas.

- 2.6 Avaliar o crescimento do microrganismo xilanolítico selecionado usando xilose como única fonte de carbono e energia.
- 2.7 Verificar o efeito da radiação ultra-violeta como agente mutagênico para o microrganismo selecionado. Selecionar mutantes xilanolíticos.
- 2.8 Preparar um concentrado sólido de xilanase produzida pelo microrganismo xilanolítico selecionado, após o cultivo do mesmo nas condições ótimas estabelecidas pelo item 2.4. Analisar a solução enzimática a 1 % (p/v) obtida a partir deste concentrado.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAIS

- 3.1.1 O bagaço de cana (*Saccharum officinarum*) foi fornecido pela Usina e Destilaria Dacalda de Jacarezinho, Pr. A serragem de bracatinga (*Mimosa scabrella*) pelo laboratório do Prof. João Batista C. Corrêa.
- 3.1.2 O farelo de trigo com ou sem pré-tratamento para a remoção de amido foram preparados no NRCC (National Research Council of Canada) pelo Prof. Dr. J. D. Fontana
- 3.1.3 As xilanas de aveia (oat spelt xylan) e de lariço (Larch wood) foram adquiridas da Sigma.
- 3.1.4 A hemicelulose "A" isolada de bagaço de cana foi isolada nos laboratórios do Depto de Química - FUEL (Projetos : n^o.135.952/84 e n^o. 152.239/85 - CPG - FUEL).
- 3.1.5 A pectina foi isolada de maçã no laboratório do Prof. Dr João Batista C. Corrêa pelo Prof. Dr. Gilvan Wosiack.
- 3.1.6 A hemicelulose total de bagaço de cana foi isolada pelo Dr. Fontana no LQBB - Depto de Bioquímica - UFPR.
- 3.1.7 Todos os reagentes utilizados apresentavam grau de pureza analítica.

3.1.8 As eletroforeses foram feitas em fitas de acetato de celulose (cellogel).

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Métodos Gerais

- As determinações espectrofotométricas foram efetuadas em aparelho UV-vis - Varian, modelo DMS 80.
- As leituras e o ajuste do índice de pH foram feitas à temperatura ambiente no pHmetro Micronal, modelo B-247.
- As evaporações foram realizadas em evaporador rotatório Buchi, modelo RE 120, a vácuo e em banho de água com temperatura externa de 70 °C.
- As centrifugações foram realizadas em centrífuga Fanem, modelo 204 - SR.
- As incubações foram realizadas em banho maria termostaticado com temperatura controlada a 50 °C.
- A filtração dos meios de cultivos foi feita através de lã de vidro aderida a um funil de haste curta, inserido em um tubo de ensaio coletor, fixado previamente em banho de gelo.
- As esterilizações dos meios de cultivo foram feitas em autoclave Fanem, modelo 103, durante 20 minutos a 1

atm.

- Os cultivos líquidos foram mantidos em agitador rotatório a 110 r.p.m. e temperatura controlada para 28 °C.

- As hemiceluloses "A" isoladas de bagaço de cana e de *Mimosa scabrella* (bracatinga) foram extraídas segundo o método descrito por O'Dwyer (103).

3.2.2 Métodos Analíticos

3.2.2.1 Métodos colorimétricos

3.2.2.1.1 Ensaio das Atividades Enzimáticas

a) Atividade da Xilanase

O sistema de incubação foi padronizado para um volume final de 0,5 ml, contendo 100 µl de uma solução 2,5 % de xilana de "Larch" , 50 µl de tampão acetato 0,5 M , pH 5,0 e 25 µl de solução enzimática (meio de cultivo isento de células, diluído ou não, ou solução enzimática diluída, preparada partir de extrato bruto enzimático dialisado e liofilizado). O ensaio foi incubado durante 20 minutos em banho termostatzado, com temperatura controlada para 50 °C . Todas as determinações foram feitas em duplicata, acompanhadas com os respectivos controles nos quais foram omitidos o substrato ou a fonte da enzima. A interrupção da atividade enzimática foi através da adição de 0,5 ml do reativo de Somogyi. Portanto, a atividade xilanásica foi

quantificada através da formação do produto, ou seja, a quantidade de açúcares redutores liberados da xilana. A determinação do produto foi feita através do método colorimétrico descrito por Somogyi (125) e Nelson (100). Como padrão de açúcar redutor foi utilizado D-xilose.

A unidade de enzima (U.E.) foi definida como a quantidade de enzima (em volume) que libera 1 μmol de açúcar redutor , xilose, por minuto nas condições padrão de ensaio e a atividade específica, o número de unidades enzimáticas por miligrama de proteína.

A unidade de enzima expressa em nkcat.ml^{-1} corresponde a U.E., definida acima, dividida por 60 segundos e multiplicada por mil .

b) Atividade da β -xilosidase

A unidade de enzima (U.E.) foi definida como a quantidade de enzima, em volume, que libera 1 μmol de o-nitrofenol ou p-nitrofenol por minuto nas condições padrão do ensaio. As condições do ensaio padrão foram desenvolvidas conforme descrito por Dekker (31), utilizando-se como substratos o-nitrofenil- β -D-xilopiranosídeo ou p-nitrofenil- β -D-xilopiranosídeo. As leituras da cor desenvolvida nesta reação foram medidas nos seguintes comprimentos de onda : 420 nm para o-nitrofenol e 400 nm para p-nitrofenol.

c) Atividade da celulase

A atividade das celulases foi medida utilizando-se nos ensaios o papel de filtro (FPU ou FPA) ou a

carboximetilcelulose (CMC). A técnica dos ensaios nos quais o papel de filtro foi utilizado como substrato, foi desenvolvida conforme descrito por Mandels e colaboradores (89), utilizando-se o reativo do ácido dinitrosalicílico (DNS) para determinar os açúcares redutores liberados. Os ensaios com a CMC, continham um volume final de 0,5 ml no qual 0.45 ml era uma solução de CMC 0,5 % em tampão acetato 0.05 M pH 5,0 e 0,05 ml da solução de enzima. A incubação foi feita durante 30 minutos a uma temperatura constante de 50 °C. A atividade enzimática foi interrompida com 0,5 ml do reativo de Somogyi (125), seguindo-se a técnica colorimétrica para determinação dos açúcares redutores liberados, descritas por Somogyi (125) e Nelson (100). Como padrão de referência foi utilizada glucose.

A unidade de enzima (U.E.) foi definida como a quantidade de enzima (em volume) que libera 1 μ mol de açúcar redutor, glucose, por minuto nas condições de ensaio descritas para FPAse e CMCase.

c) Atividade da amilase

O sistema de incubação foi padronizado para um volume final de 0,5 ml, contendo 100 μ l de uma solução 1 % de amido solúvel (ECIBRA) em tampão acetato 0,5 M, pH 5,0 e 25 μ l de solução enzimática (meio de cultivo isento de células). O ensaio foi incubado durante 30 minutos em banho termostaticado, com temperatura controlada para 50 °C. A interrupção da atividade foi desenvolvida conforme descrito em (a) para a xilanase tendo sido utilizado como padrão D-glucose.

A unidade de enzima (U.E.) foi definida como a

quantidade de enzima (em volume) que libera 1 μmol de açúcar redutor, glucose, por minuto nas condições padrão de ensaio.

e) Atividade da pectinase

O sistema de incubação foi semelhante àquele descrito para a determinação da atividade amilásica utilizando-se como substrato uma solução 1 % de pectina e 50 μl de solução enzimática. O ensaio foi incubado durante 15 minutos à 50 °C, a interrupção foi feita conforme descrito em a) e o padrão utilizado foi o ácido glucurônico (SIGMA).

A unidade de enzima (U.E.) foi definida como a quantidade de enzima (em volume) que libera 1 μmol de açúcar redutor, ácido galacturônico ou seu derivado insaturado, por minuto nas condições padrão de ensaio.

3.2.2.1.2 Carboidratos Totais (CT)

Os carboidratos totais foram determinados pelo método do fenol-ácido sulfúrico, descrito por DUBOIS e colaboradores (51). O complexo colorido, resultante da reação do hidroximetilfurfural (hexoses) ou furfural (pentoses) com o fenol, foi lido em 490 nm (hexoses) ou 480 nm (pentoses), usando-se respectivamente a D-glucose ou a D-xilose como padrões na faixa de sensibilidade de 10 a 60 μg / ensaio, com volume final de 3,5 ml.

3.2.2.1.3 Carboidratos Redutores (CR)

Os carboidratos redutores (pentoses e hexoses) foram determinados pelo método do Somogyi-Nelson (100 , 125). A mistura final de óxidos de molibdênio foi lida a 535 nm, usando-se D-xilose como padrão, na faixa de sensibilidade 10 a 60 μg /ensaio, com volume final de 5 ml.

3.2.2.1.4 Proteínas

As proteínas totais foram determinadas pelo método de Hartree (67), o qual constitui uma modificação do método de Lowry e colaboradores (83), que combina as reações do biureto para ligações peptídicas e a de Folin-Ciocalteu para tirosina. A absorbância foi lida em 650 nm, comparativamente a um padrão de soro albumina bovina, na faixa de 5 a 60 μg / ml de ensaio num volume final de 5 ml.

3.2.2.2 Métodos Cromatográficos

As cromatografias em papel ou em camada delgada foram desenvolvidas pela técnica de irrigação ascendente, utilizando-se desenvolvimentos singulares ou múltiplos. Os suportes foram papel whatman nº 1 ou placas de sílica-gel G (Merck).

Como fases móveis foram utilizados os seguintes sistemas de solventes:

a) benzeno : butanol : piridina : água (1:5:3:3 v/v , fase superior).

b) isopropanol : acetato de etila : água (85 : 5 : 10 v/v) .

Os reagentes reveladores de açúcares foram:

I) nitrato de prata alcalino (134) .

II) orcinol 0,5 % mais ácido sulfúrico 5 % , em solução metanólica.

3.2.2.3 Métodos Eletroforéticos

Eletroforese em acetato de celulose

As tiras de Cellogel foram previamente umedecidas em tampão acetato 50 mM, pH 5,0 . O excesso de tampão foi removido através da compressão entre duas folhas de papel de filtro. As preparações enzimáticas foram aplicadas em banda. A corrida foi desenvolvida durante uma hora e vinte minutos, com 2 mA/ fita.

3.2.2.4. Umidade

O teor de umidade foi determinado em estufa a 105 °C

3.2.2.5. Nitrogênio Total

O teor de nitrogênio total foi determinado pelo método de microKjeldahl (74). O teor de proteínas foi calculado usando-se o fator (teor de N x 6,25).

3.2.3 Teste cromogênico

A uma solução 0,5 % de hemicelulose "A", isolada de ba-

gaço de cana, foi adicionado agar para conferir uma concentração final de 1 % . Após aquecimento, até obtenção de uma solução transparente, esta foi transferida para placas de petri, em quantidade suficiente para se obter uma camada de 1mm de espessura. Depois de gelatinizado xilanases são aplicadas através de um capilar, e as placas são incubadas à 37 °C durante 60 minutos (dependendo da atividade da solução enzimática). Em seguida, adiciona-se uma solução de lugol diluída 50 vezes em solução saturada de CaCl₂.

3.2.4 Preparação do Bagaço de Cana

O bagaço de cana foi lavado intensamente com água de torneira. Em seguida foi espalhado sobre um plástico e exposto ao sol durante vários dias consecutivos. Depois de seco, foi triturado em triturador de ração (Pereira-Metalon) em seguida, pulverizado em moinho Wiley, utilizando-se peneira de 35 mesh.

3.2.5 Isolamento dos microrganismos

Os microrganismos foram isolados de várias fontes e locais. Trinta e seis foram isolados nos laboratórios da UEL.

3.2.5.1 Microrganismos isolados em Londrina:

Insetos (termitas e hemipteras) foram coletados no Campus Universitário e dissecados pelo entomologista Francisco Cividanes (UEL). Os tratos digestivos foram colocados sob placas de petri contendo meio mínimo sólido estéril de Vogel e hemicelulose "A" de bracatinga 0,5 % ou xilose 1 % . Dei-

xadas à temperatura ambiente que oscilou entre 25 e 28 °C , as placas foram examinadas a cada intervalo de 24 horas. A variada flora microbiana caracterizada pela morfologia e cores das colônias foram repicadas consecutivamente até a obtenção de colônias puras a olho nu. Os repiques foram feitos no mesmo tipo de meio de cultivo contendo como fonte de carbono xilose 1 % .

Pequena quantidade de materiais em decomposição tais como bagaço de cana, madeira (peroba), folhas, totora (planta nativa do Lago Titicaca - Peru), foi colocada em placas contendo a mesma composição do meio citado acima. Após o crescimento, microrganismos foram isolados através de repiques sucessivos. Líquidos contaminados como vinhoto ou vinhaça foram plaqueados diretamente e o mesmo procedimento foi desenvolvido para obtenção dos isolados.

3.2.5.2 Microrganismos isolados em Curitiba:

Materiais como terra, madeira, semente de jaca, líquidos contaminados (os quais continham celulose, celobiose, xilanas), suco do caramujo *Megalobulimus paranaguensis* foram também distribuídos em placas contendo o meio mínimo de Vogel, para posterior isolamento dos microrganismos. Também foram isolados microrganismos de *Palembus dermestoides*, em sua fase larvária. Este inseto é cultivado em amendoim e foi cedido pelo Departamento de Zoologia da UFPR. O *Palembus* e outros insetos: formiga, *Gynandrobrotica sp.* ("joaninha"), coletados no Centro Politécnico, no jardim lateral da porta de entrada do Departamento de Bioquímica (canteiro de plantas do LQBB), foram

também colocados diretamente sobre placa contendo meio de cultivo citado anteriormente. Um conjunto de cada inseto em separado foi macerado previamente em um gral e em seguida o líquido liberado durante a maceração, foi plaqueado.

Vinte e seis microrganismos foram isolados em Curitiba, oito outros tinham sido isolados previamente pelo Prof. Dr. J. D. Fontana. Quinze dos microrganismos testados, entre eles fungos e uma levedura, já estavam classificados: *Dactylium dendroides* (UFPR - DBQ), *Fusarium oxysporum moniliforme* IAPAR, Londrina, Pr.), *Fusarium oxysporum* (isolado de Capinópolis, região de Londrina pelos pesquisadores do IAPAR), *Fusarium oxysporum* 1884 - R (IAPAR, Londrina), *Fusarium oxysporum* var. *vasinfectum* (IAPAR, Londrina), *Fusarium oxysporum* (Argentina), *Trichoderma reesei*, *Chaetomium globosum* (NRC - 41208), *Aspergillus aculeatus* (NRC 5681), *Aureobasidium pullulans*, *Phanaerochete chrisosporium*, *Schizophillum comune*, *Aspergillus japonicum* (NRC 5682), *Aureobasidium pullulans* 3060, *Pichia stipitis* (NRC 2892). Portanto, 85 microrganismos foram utilizados no teste para selecionar quais seriam os xilanolíticos sendo: 36 isolados em Londrina, 26 em Curitiba, 8 isolados pelo Dr. Fontana (Canada e Curitiba) e 15 previamente classificados.

3.2.6 Manutenção dos microrganismos

Todos os 85 microrganismos foram mantidos em agar inclinado (2 %), contendo sais de Vogel e xilose 1 % como fonte de carbono. Repiques sucessivos foram feitos a cada três meses. Para aumentar a durabilidade do tempo de manutenção foi adicionado óleo mineral (nujol) estéril.

3.2.7 Condições de cultivo estabelecidas para selecionar os microrganismos xilanolíticos (Figura 06)

Cada um dos 85 microrganismos foi repicado do meio de manutenção para um tubo de cinco centímetros de comprimento com um centímetro de diâmetro, o qual continha 1,5 ml de meio sólido inclinado contendo 2 % de agar, sais de Vogel e 1 % de xilose. Após 72 horas de crescimento, os microrganismos desenvolvidos na superfície do meio, foram transferidos para tubos de ensaio do mesmo tamanho, os quais continham 1,5 ml de meio líquido de Vogel e xilose 1 % como fonte de carbono. Os tubos de ensaio foram acondicionados adequadamente em um becker de plástico, protegidos com algodão entre as paredes de vidro, e o becker foi adaptado no interior das garras de um "shaker" , mantido a 110 r.p.m., à 28 °C durante 48 horas. Decorridas as 48 horas, cada tubo foi centrifugado durante 10 minutos a 3000 r.p.m. e em seguida, o sobrenadante foi decantado assepticamente próximo à chama de um bico de Bunsen. A biomassa microbiana foi então transferida para um erlenmeyer de 50 ml, o qual continha 10 ml de meio de Vogel mínimo e 1 % de pulverizado de bagaço de cana. Após 7 dias de cultivo, a 110 r.p.m e à 28 °C, os cultivos foram transferidos para tubos de fundo cônico e centrifugados durante 10 minutos a 3000 r.p.m.. O sobrenadante foi filtrado em lã de vidro. Em cada meio de cultivo foram feitas as seguintes determinações : atividade xilanásica, atividade celulásica (CMCase e FPase) e proteína .

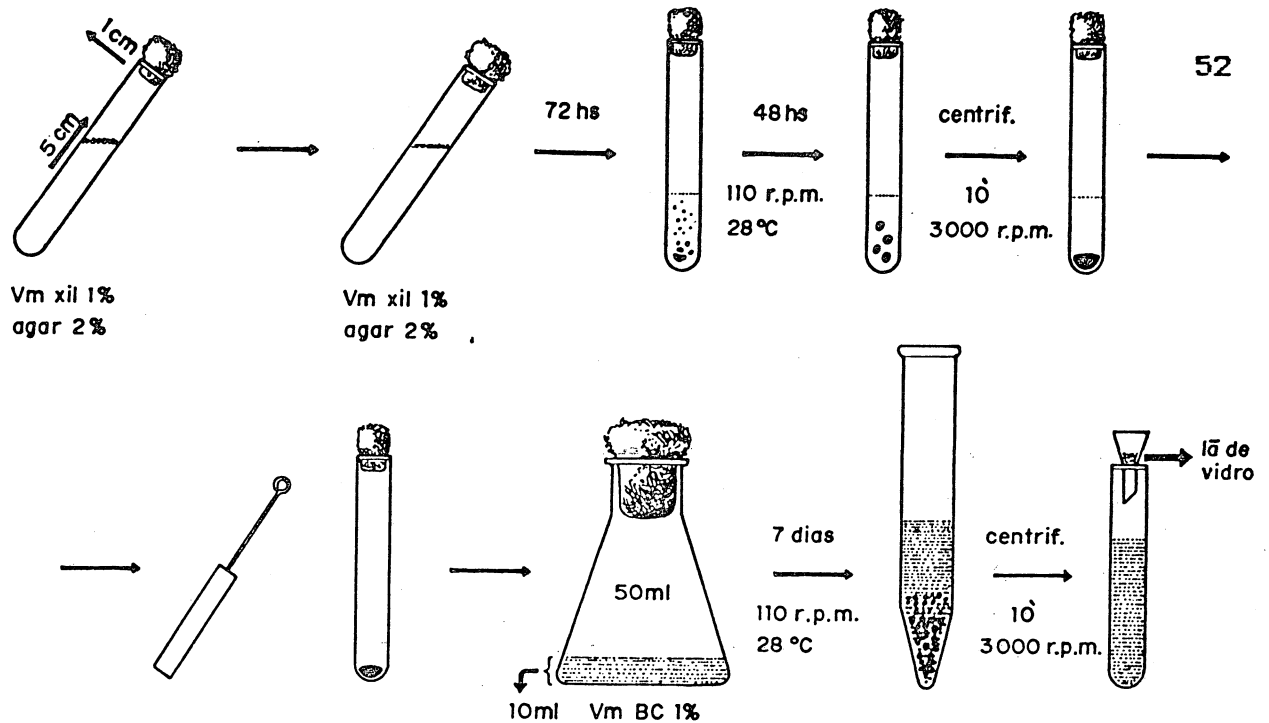


Figura 06: Seqüência de cultivos para a seleção dos microrganismos xilanolíticos

3.2.8 Inóculo

Os conídios foram suspensos em salina fisiológica mais Tween 80 % 0,1 % (1:1). A contagem foi feita em câmara de Neubauer. Quando não especificado no texto, nos experimentos, o número de esporos adicionados foi $1 \cdot 10^7$, nos cultivos realizados nos frascos de 125 ml com 25 ml de meio.

Todas as soluções de conídios foram preparadas de forma concentrada para não exceder 0.5 ml o volume de inóculo. Nos cultivos comparativos entre microrganismos de espécies diferentes, os volumes foram os mais aproximados possíveis para conferir quantidade de células.

Nos cultivos comparativos dos microrganismos de gêneros diferentes, e dos mutantes estudados, foram transferidos conídios, hifas ou hifas e conídios de uma superfície padronizada, 1,5 ml de meio sólido inclinado em tubo de ensaio de 5 cm de comprimento.

padronizada, 1,5 ml de meio sólido inclinado em tubo de ensaio de 5 cm de comprimento.

Células de 24 horas de cultivo, obtidas no meio mínimo de Vogel contendo xilose 1 % (p/v), foram coletadas assepticamente em tubo de fundo cônico estéril. Após centrifugação, as mesmas foram ressuspensas em salina fisiológica estéril. Esta última operação foi repetida por mais duas vezes consecutivas. A contagem foi feita em câmara de Neubauer e 4×10^6 células foram inoculadas conforme descrito em 4.4.3.

3.2.9. Meios de cultivos

3.2.9.1. Meio mínimo de Vogel (138)

citrato de sódio 5.(1/2) H ₂ O	150 g
KH ₂ PO ₄ anidro	250 g
NH ₄ NO ₃ anidro	100 g
MgSO ₄ 7 H ₂ O	10 g
CaCl ₂ 2 H ₂ O	5 g
Solução de elementos traços	5,0 ml
Solução de biotina	2,5 ml

O volume final é de acertado para 1 litro. Para uso, este meio é diluído 50 vezes com água destilada.

Solução de elementos traços:

ácido cítrico 1 H ₂ O	5,00 g
ZnSO ₄ 7 H ₂ O	5,00 g
Fe(NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂ 6 H ₂ O	1,00 g
Cu SO ₄ 5 H ₂ O	0,25 g
MnSO ₄ 1 H ₂ O	0,05 g
H ₃ BO ₃ anidro	0,05 g
Na ₂ MoO ₄ 2 H ₂ O	0,05 g

O volume final da solução de elementos traços é de 100 ml. A solução de biotina é preparada dissolvendo-se 5,0 mg em 50 ml de água destilada.

Neste trabalho, as fontes de carbono monoméricas, nos cultivos líquidos foram xilose ou glucose, foram autoclavadas separadamente. Quando a fonte de carbono era resíduo lignocelulósico ou hemiceluloses, foi autoclavada juntamente com o meio de cultivo utilizado.

3.2.9.2. Meio de Mandels (91)

Composição/litro

$(\text{NH})_2\text{SO}_4$	1,4	g
KH_2PO_4	2,0	g
Uréia	0,3	g
CaCl_2	0,3	g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,3	g
Proteose peptona	1,0	g
Tween 80	2,0	g
$\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	5,0	mg
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	1,6	mg
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	1,4	mg
CoCl_2	2,0	mg

3.2.9.3 Meio de YM

Composição/litro

extrato de levedura	3,0	g
extrato de malte	3,0	g
peptona	5,0	g
fonte de carbono	10,0	g

Nos cultivos no meio de YM foram utilizados 4,5 % de bagaço de cana como fonte de carbono.

3.2.10 Mutagênese

Sobrevivência à Luz ultra violeta

Suspensões de conídios de *Trichoderma harzianum* em tween-80 contendo $1 \cdot 10^6$ conídios/ml foram transferidos para uma placa de petri estéril. A placa foi irradiada utilizando-se

o comprimento de onda longo (365 nm) de uma ChromatoVue C-70 G da IVP Inc. (USA), durante 1, 3, 6, 10, e 20 minutos. Os conídios não irradiados (tempo zero) foram diluídos mil vezes e dez mil vezes e plaqueados em 2 e 3 placas, respectivamente (placas controle). Os conídios irradiados durante 1, 3 e 6 minutos foram diluídos cem e mil vezes e plaqueados em 2 e 3 placas, respectivamente. Para os irradiados durante 10 e 20 minutos as diluições foram cem e dez vezes e plaqueados em 2 e 3 placas respectivamente. As placas para as quais os conídios, irradiados ou não, foram transferidos, continha meio mínimo de Vogel e pulverizado de bagaço de cana 1 %.

Os sobreviventes foram transferidos com palitos, previamente esterilizados, para placas contendo o mesmo meio de cultivo e xilose 1 % como fonte de carbono ou hemicelulose "A" isolada de bagaço de cana 0,2 % .

3.2.11 Análise Estatística

3.2.11.1 Experimento com o *Trichoderma harzianum* cultivado em bagaço de cana como única fonte de carbono.

3.2.11.1.1 Delineamento Experimental

Para avaliar o efeito das variáveis : tempo, concentração de esporos e concentração de bagaço de cana para a produção de xilanases empregou-se a Metodologia da Superfície de Resposta (126) com um delineamento fatorial incompleto de 3 variáveis em três níveis de variação equidistantes (3^3), conforme proposto por Box & Behnken (1960). Os níveis reais destas variáveis são apresentados na TABELA I .

TABELA I :. Variáveis e níveis de variação do delineamento experimental

VARIÁVEIS		NÍVEIS DE VARIAÇÃO		
X ₁	Concentração de bagaço de cana (%)	0,1	2,7	5,3
X ₂	Concentração de conídios (x 10 ⁶)	0,5	3,0	5,5
X ₃	Tempo (dias)	2	8	14

O delineamento fatorial incompleto se constitui de um grupo com 12 experimentos e outro grupo com 3 repetições do ponto central, totalizando 15 experimentos, conforme é apresentado na TABELA II

A ordem de realização dos experimentos foi aleatória.

TABELA II : Delineamento estatístico dos experimentos

EXPERIMENTO	VARIÁVEIS					
	Codificadas			Reais		
	x ₁	x ₂	x ₃	X ₁	X ₂	X ₃
			(%)	(10 ⁶)	(dias)	
01	-1	-1	0	0,1	0,5	08
02	1	-1	0	5,3	0,5	08
03	-1	1	0	0,1	5,5	08
04	1	1	0	5,3	5,5	08
05	-1	0	-1	0,1	3,0	02
06	1	0	-1	5,3	3,0	02
07	-1	0	1	0,1	3,0	14
08	1	0	1	5,3	3,0	14
09	0	-1	-1	2,7	0,5	02
10	0	1	-1	2,7	5,5	02
11	0	-1	1	2,7	0,5	14
12	0	1	1	2,7	5,5	14
13	0	0	0	2,7	3,0	08
14	0	0	0	2,7	3,0	08
15	0	0	0	2,7	3,0	08

X1 = concentração de bagaço de cana (%)

X2 = concentração de esporos

X3 = tempo (dias)

3.2.11.1.2 Análise dos Resultados

Os resultados experimentais foram tratados por Análise de Regressão Múltipla para desenvolver modelos matemáticos de segunda ordem contendo os termos lineares, quadráticos e de interação das 3 variáveis independentes. Empregou-se a programação do SAS (Statistical Analysis System, 1985) (126), em computador IBM 3287. O modelo preditivo é representado pela Equação n (Box & Wilson, 1951).

$$\hat{Y}_i = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_3 x_3 + \beta_{11} x_1^2 + \beta_{22} x_2^2 + \beta_{33} x_3^2 + \beta_{12} x_1 x_2 + \beta_{13} x_1 x_3 + \beta_{23} x_2 x_3 + \xi$$

(equação n)

onde :

\hat{Y}_i = função resposta genérica;

x_1, x_2, x_3 = níveis codificados das variáveis independentes.

β 's = coeficientes estimados pelo método dos mínimos quadrados.

ξ = resíduo que mede o erro experimental apresentando uma distribuição normal com média zero e variância igual a σ^2 .

3.2.11.1.2.1 Intervalo de Confiança (I.C.)

A partir da estimativa de Y e aplicando-se as propriedades de variância na equação n e com o emprego da matriz de dispersão $D = (X'X)^{-1} \sigma^2$, foi possível calcular a variância em cada ponto.

Com as variâncias calculadas, os respectivos intervalos de confiança podem ser obtidos:

$$I.C.(Y) = \hat{Y} \pm t \sqrt{V(\hat{Y})}, \quad t \text{ onde a estatística está tabelada (07).}$$

3.2.12 Obtenção dos hidrolisados enzimáticos para análise cromatográfica.

O sistema de incubação foi idêntico ao descrito em (a) do item 3.2.2.1.1. O tempo de incubação foi aproximadamente 12 horas e a interrupção do ensaio através da adição de 1 ml de metanol P.A.. O conteúdo de cada tubo foi evaporado até securo e duas gotas de etanol 50 % (v/v) foram adicionadas para a análise cromatográfica dos hidrolisados.

3.2.13 Preparações enzimáticas

Foram obtidas após o crescimento do microrganismo em erlenmeyer de 2 l com 400 ml de meio de Vogel em bagaço de cana 1 % ou 4,5 % (p/v), durante 96 horas de cultivo. Após centrifugação refrigerada a 10.000 r.p.m., o sobrenadante foi filtrado em lã de vidro e dialisado em papel celofane contra

água destilada a 4 °C. Depois de congeladas foram liofilizadas e o pó utilizado para o preparo de soluções.

3.2.14 Eluição das xilanases das tiras de acetato de celulose

A área útil do eletroforetograma foi seccionada a cada 0,5 cm e cada secção foi mergulhada em 0,4 ml de tampão acetato 50 mM pH 5,0 e 200 µl foram utilizados para a determinação da atividade xilanásica, mantendo-se as outras condições do ensaio padrão.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os oitenta e cinco microrganismos estudados foram numerados aleatoriamente e estão relacionados na TABELA III na qual consta a fonte de isolamento ou local de origem e a cidade onde foram isolados.

TABELA III : Relação dos microrganismos a serem selecionados como xilanolíticos

Microrg. Número	Fonte de isolamento ou Local de Origem	Cidade
01	bagaço de cana em decomposição	Londrina
02	peroba em decomposição	Londrina
03	solução de xilana contaminada	Curitiba
04	inseto termite (cupim)	Londrina
05	inseto (Hemiptera) - paina	Londrina
06	peroba em decomposição	" "
07	inseto termite (cupim)	" "
08	" " "	" "
09	" " "	" "
10	tatora em decomposição (Peru)	" "
11	" " "	" "
12	" " "	" "
13	inseto (Hemiptera) - paina	" "
14	peroba em decomposição	" "
15	" " "	" "
16	inseto termite (cupim)	" "
17	vinhoto contaminado	" "
18	" " "	" "
19	" " "	" "
20	peroba em decomposição	" "
21	vinhoto contaminado	" "
22	inseto termite (cupim)	" "
23	peroba em decomposição	" "
24	inseto termite (cupim)	" "
25	" " "	" "
26	" " "	" "
27	" " "	" "
28	" " "	" "
29	peroba em decomposição	Londrina
30	<i>F.oxysporum moniliforme</i> , IAPAR	" "
31	<i>F.oxysporum</i> , Capinópolis, IAPAR	" "
32	<i>F.oxysporum</i> , 1884 R, IAPAR	" "
33	Inseto termite (cupim)	" "
34	peroba em decomposição	" "
35	fólya em decomposição	" "

TABELA III : Continuação

36	fôlha em decomposição	Londrina
37	vinhoto contaminado	" "
38	madeira em decomposição	Curitiba
39	inseto: <i>Palembus dermestoides</i> , UFPR	" "
40	<i>F.oxysporum</i> (Argentina)	
41	inseto: <i>Gynandrobrotica sp.</i>	Curitiba
42	<i>Dactylium dendroides</i>	" "
43	inseto: <i>Gynandrobrotica sp.</i>	" "
44	" " "	" "
45	meio de cultivo contaminado	" "
46	solução de celobiose contaminada	" "
47	solução de xiloglucana contaminada	" "
48	solução de arabinoxilana contaminada	" "
49	inseto : <i>Gynandrobrotica sp.</i>	" "
50	semente de jaca em decomposição	" "
51	peroba em decomposição	" "
52	madeira em decomposição	" "
53	inseto : <i>Gynandrobrotica sp.</i>	" "
54	" " "	" "
55	inseto : <i>Palembus dermestoides</i>	
56	meio de cultivo contaminado	" "
57	" " " "	" "
58	Semente de jaca em decomposição	" "
59	Inseto:(Percevejo) - paina	" "
60	Terra (Depto de Agronomia, UFPR)	" "
61	<i>Trichoderma reesei</i>	
62	<i>Chaetomium globosum</i> NRC 41208	
63	<i>Aspergillus aculeatus</i> NRC 5681	
64	JD. 7	Curitiba
65	JD. 9 (jelly former, orange)	" "
66	JD. 10 (black yeast)	" "
67	Terra (Depto de Agronomia, UFPR)	Curitiba
68	Inseto: Formiga	" "
69	<i>F.oxysporum var. vasinfectum</i> (IAPAR)	Londrina
70	<i>Aureobasidium pullulans</i>	
71	<i>Phanaerochete chryso sporium</i>	
72	<i>Schizophillum comune</i> NRC	
73	JD. 8	Curitiba
74	<i>Aspergillus japonicum</i> NRC 5682	
75	<i>Aureobasidium pullulans</i> 3060	
76	JD. 1	Curitiba
77	JD. 2	" "
78	JD. 6	" "
79	Meio sólido com bactéria	" "
80	JD.4	" "
81	Pinhão em decomposição	" "
82	Suco de <i>Megalobulimus paranaguensis</i>	" "
83	Meio cultivo com bactéria alaranjada	" "
84	<i>Pichia stipitis</i> NRC 2892	
85	Meio sólido com bactéria	" "

Primeiramente todos os microrganismos foram repicados para placas contendo agar 2 %, sais de Vogel mínimo e hemicelulose "A", isolada de bagaço de cana 0,5 % . Decorridas 48 horas, observou-se que todos apresentaram grau de crescimento significativo, ou seja, tinham proliferado além do local do repique. Nesta avaliação empírica foi considerado o fato de que entre os microrganismos estavam fungos, leveduras e bactérias. Portanto a morfologia e o espaço preenchido durante o crescimento também variava significativamente. Outro fator considerado foi a esporulação uma vez que dentre os fungos estavam aqueles que esporulavam ou não, bem como aqueles que preliminarmente proliferavam através de hifas e esporulavam posteriormente. O objetivo principal deste teste preliminar foi verificar a viabilidade de crescimento em uma hemicelulose isolada de bagaço de cana.

4.1 Seleção de microrganismos xilanolíticos

4.1.1 Pré-inóculo

Conforme descrito no item 3.2.7, os microrganismos foram primeiramente repicados do meio de manutenção para tubos com meio líquido de Vogel mínimo, contendo xilose 1 % como fonte de carbono. Através do pré-inóculo foi possível verificar o crescimento das células, provenientes de uma superfície padronizada de agar inclinado, durante 72 horas de cultivo. O potencial de crescimento dos microrganismos no meio de manutenção sem a presença do agar, foi avaliado, embora superficialmente. Estas condições poderiam favorecer ou não a

proliferação dos microrganismos promovendo um primeiro teste em meio líquido, no qual micélios e ou conídios e ou outros tipos de células, com ou sem pigmentos, seriam formados de acordo com a peculiaridade de cada microrganismo em estudo.

A fotografia 01 mostra um total de 12 cultivos os quais são dos microrganismos 5, 14, 15, 16, 20, 38, 49, 58, 63, 69, 71 e 72, nas condições citadas anteriormente, antes de serem submetidos a centrifugação. Pode-se observar nesta amostragem que a morfologia, pigmentação e crescimento variam significativamente.



Fotografia 01: Microrganismos crescidos no meio mínimo de Vogel em xilose 1 % durante 48 horas.

4.1.2 Seleção dos microrganismos xilanolíticos em bagaço de cana como única fonte de carbono

Trabalhos da literatura científica internacional, avaliam a atividade das xilanases de microrganismos de diferentes gêneros cultivados em xilana 1 % como fonte de carbono (08, 31, 85, 127). Considerando-se que a extração de xilana é um processo que envolve várias etapas conforme citado anteriormente no item 1.1.3 e que embora um rendimento de 11 a 14 % possa ser considerado elevado do ponto de vista acadêmico, pode porém não ser promissor do ponto de vista biotecnológico, uma vez que a utilização de xilanas isoladas poderia inviabilizar economicamente a produção de xilanase em escala piloto ou industrial. Alguns trabalhos antigos e recentes citam farelo de trigo(04, 12, 13, 108, 123) como fonte de carbono para produção de xilanases. A palha de arroz e o bagaço de cana com ou sem suplementação com xilana são fontes de substrato menos estudadas (12, 13, 127). Uma vez que todos os microrganismos foram mantidos em xilose como única fonte de carbono, tinham apresentado crescimento mais ou menos significativo em hemicelulose "A" isolada de bagaço de cana, optou-se por utilizar apenas o próprio bagaço de cana, previamente lavado e pulverizado, como única fonte de carbono, no mesmo meio simples de manutenção para selecionar através de um primeiro experimento, os microrganismos xilanolíticos. Foi também considerado o fato de que seria dispendioso utilizar xilana comercial para cultivar 85 microrganismos, como também utilizar a hemicelulose "A", isolada de bagaço, devido ao tempo

requerido para isolá-la. Consequentemente, o(s) microrganismo(s) que produzisse(m) xilanase quando crescido(s) em 1 % de bagaço, seria(m) promissor(es). Quanto à concentração de bagaço de cana escolhida, foi usado como referência o trabalho de Dekker (31) que estudou a produção de xilanase pelo *Trichoderma reesei* QM 9414 em bagaço de cana, em hemiceluloses de bagaço de cana e em xilana de "larch" (Sigma), nas concentrações de 1 a 4 % (p/v) e obteve atividades semelhantes (1,2 a 1,6 IU/ml). Logo, 1 % de bagaço de cana seria quantidade significativa de fonte de carbono, na qual os diferentes tipos de açúcares estariam naturalmente interligados quimicamente. Os polissacarídeos associados à lignina confeririam aos microrganismos uma realidade mais próxima daquela encontrada na parede celular do vegetal.

Optou-se pelo método de Somogyi-Nelson (100, 125) para detectar a atividade xilanásica. Além de económico, devido ao uso de menor quantidade de xilana no ensaio modificado, este método é mais sensível, pois detecta menores concentrações de açúcares do que o método do DNS (dinitrosalicilato). Além do reagente cúprico alcalino ter uma relação estequiométrica aparente com o número de grupos hemiacetal redutores, este método também parece ser menos afetado por possíveis produtos interferentes derivados de substratos celulósicos ou do meio de cultivo (16).

A atividade celulásica foi detectada utilizando-se dois substratos e métodos diferentes. Um substrato solúvel, carboximetilcelulose, e um substrato insolúvel, papel de filtro. Considerando-se a natureza dos multicomponentes do filtrado da cultura dos substratos lignocelulósicos (16),

empregou-se o método de Somogyi-Nelson (100, 125) para detectar a atividade da carboximetilcelulase e o método clássico de Miller (97) para detectar a FPase conforme descrito por Mandels e colaboradores (89).

Os resultados das atividades xilanásica e celulásica(CMCase e FPase) e a quantidade de proteína presentes no sobrenadante do meio de cultivo de cada um dos 85 microrganismos estudados estão citados na TABELA IV.

TABELA IV : Produção de Xilanase e Celulase dos Microrganismos crescidos em Bagaço de Cana.

FUNGO (Número)	Atividades Enzimáticas (U/ml)			Proteína (mg/ml)
	xlnase	CMCase	FPase	
01	0,18	0,01	0,02	0,37
02	1,04	0,12	0,04	0,37
03	0,00	0,01	0,00	0,19
04	0,27	0,01	0,00	0,20
05	9,50	0,30	0,13	0,45
06	2,86	0,19	0,11	0,47
07	3,36	0,18	0,06	0,30
08	0,77	0,10	0,04	0,26
09	1,28	0,12	0,04	0,30
10	1,21	0,11	0,02	0,27
11	0,88	0,05	0,01	0,26
12	0,24	0,04	0,01	0,15
13	1,66	0,02	0,01	0,60
14	6,66	0,15	0,04	0,38
15	7,83	0,25	0,07	0,48
16	5,14	0,19	0,08	0,33
17	1,08	0,13	0,05	0,32
18	0,38	0,00	0,00	0,18
19	0,22	0,10	0,02	0,16
20	5,86	0,24	0,06	0,36
21	0,10	0,00	0,00	0,16
22	2,57	0,01	0,02	0,51
23	1,72	0,16	0,09	0,46
24	1,31	0,00	0,01	0,42
25	1,55	0,02	0,02	0,65
26	1,24	0,13	0,05	0,33
27	1,39	0,00	0,04	0,33
28	0,68	0,00	0,00	0,47
29	1,15	0,09	0,04	0,53
30	1,99	0,12	0,07	0,29
31	2,16	0,24	0,12	0,40
32	0,74	0,12	0,04	0,32

TABELA IV : Continuação

33	1,10	0,12	0,05	0,44
34	0,74	0,04	0,03	0,45
35	0,45	0,00	0,00	0,33
36	0,34	0,00	0,01	0,18
37	0,08	0,06	0,01	0,09
38	5,61	0,27	0,07	0,43
39	0,06	0,00	0,00	0,35
40	4,05	0,28	0,13	0,42
41	2,56	0,22	0,06	0,29
42	2,28	0,25	0,13	0,51
43	0,91	0,17	0,03	0,24
44	1,63	0,17	0,09	0,24
45	0,00	0,00	0,00	0,26
46	1,84	0,15	0,00	0,23
47	0,63	0,00	0,03	0,18
48	2,78	0,20	0,05	0,28
49	13,13	0,20	0,13	0,42
50	0,24	0,00	0,00	0,29
51	0,75	0,00	0,02	0,45
52	1,58	0,04	0,01	0,42
53	7,00	0,21	0,07	0,39
54	11,77	0,28	0,12	0,47
55	0,25	0,00	0,01	0,48
56	0,29	0,02	0,02	0,26
57	0,94	0,07	0,04	0,23
58	6,10	0,17	0,05	0,32
59	0,73	0,02	0,02	0,48
60	0,00	0,00	0,00	0,23
61	1,17	0,00	0,00	0,27
62	0,15	0,01	0,02	0,36
63	4,00	0,13	0,04	0,34
64	0,72	0,15	0,05	0,49
65	0,00	0,00	0,00	0,23
66	0,03	0,02	0,02	0,22
67	0,02	0,00	0,00	0,32
68	0,00	0,00	0,00	0,35
69	3,62	0,25	0,10	0,37
70	0,00	0,00	0,00	0,16
71	2,47	0,21	0,08	0,41
72	7,61	0,14	0,06	0,34
73	0,09	0,03	0,00	0,18
74	0,25	0,02	0,00	0,25
75	0,15	0,00	0,00	0,14
76	0,03	0,00	0,00	0,15
77	0,08	0,00	0,00	0,15
78	0,00	0,00	0,00	0,17
79	0,02	0,00	0,00	0,31
80	0,06	0,00	0,00	0,24
81	1,09	0,06	0,06	n.d.
82	0,00	0,00	0,00	n.d.
83	0,00	0,00	0,00	n.d.
84	0,00	0,00	0,00	n.d.
85	0,00	0,00	0,00	n.d.

Os resultados em negrito na TABELA IV pertencem àqueles microrganismos que apresentaram atividade xilanásica superior a 5 U/ml entre os 85 microrganismos estudados. Estes dados estão compilados e apresentados na Figura 07.

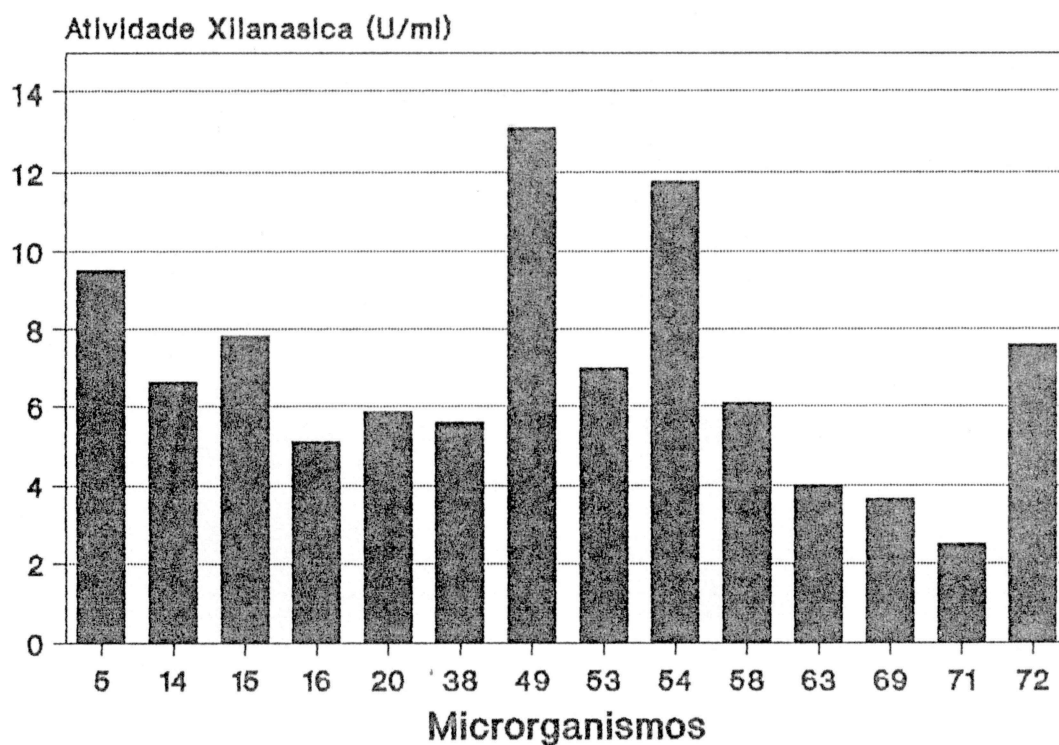


Figura 07: Produção de xilanase em BC 1 % pelos 10 microrganismos selecionados como xilanolíticos e por 4 microrganismos de referência.

Através de todos os resultados obtidos foi possível selecionar 10 isolados denominados até então pelos números: 05, 14, 15, 16, 20, 38, 49, 53, 54 e 58 os quais apresentaram atividade enzimática significativa em bagaço de cana, destacando-se o microrganismo número 49 cuja atividade foi

em torno de 13 U/ml. Vale ressaltar que os dois isolados mais produtivos com base neste "screening" prévio, sejam procedentes do mesmo nicho ecológico, ou seja, trato digestivo do inseto *Gynandrobrotica*, predador de folhas verdes .

Johnson e colaboradores (73) cultivaram *Streptomyces* em 1 % de bagaço de cana e detectaram 0,52 U/ml em 96 horas. Dekker (31) detectou 1,3 U/ml no cultivo do *T. reesei* QM 9414 em igual concentração desta fonte de carbono. Biswas e colaboradores (13) detectaram 8,5 U/ml de atividade xilanásica quando o *Aspergillus ochraceus* foi crescido em bagaço de cana durante 7 dias de cultivo em fase submersa.

A atividade CMCase detectada foi inferior a 0,5 U/ml para todos os 10 isolados selecionados.

Van Zyl (136) estudou *Streptomyces albogriseolus*, *S. nitrosporeus* e *Micromonospora melanospora*, selecionados como celulolíticos entre 252 linhagens de actinomicetos mesofílicos celulolíticos. Após o cultivo dos três microrganismos em bagaço de cana, a atividade celulásica detectada com papel de filtro ficou entre 0,9 a 1,0 U/ml. Considerando-se os resultados da celulase detectada por este mesmo método, para os 10 microrganismos xilanolíticos selecionados em bagaço de cana, estes foram menores ou igual a 0,13 U/ml, demonstrando que nas condições estudadas somente a produção de xilanase foi potencializada.

Os resultados das atividades enzimáticas dos microrganismos n^o. 63, 69, 71 e 72 foram inseridos nos gráficos como parâmetro de referência, uma vez que já se conhecia a classificação dos mesmos, ou seja, *Aspergillus aculeatus* NRC 5681, *Fusarium oxysporum* var. *vasinfectum* (IAPAR -

Londrina), *Phanaerochete chryso sporium* e *Schizophillum comune* NRC. O gênero *Aspergillus* tem sido estudado como produtor de xilanase por vários pesquisadores (04, 60, 63, 76, 122) , o *Fusarium oxysporum* além de xilanolítico também é fermentador de pentose (05, 128, 139), o *Phanaerochete chryso sporium* tem sido estudado como lignolítico (76) e o *Schizophillum commune* também como xilanolítico e lignolítico (84). Porém, as condições pré-estabelecidas para o cultivo e seleção de microrganismos xilanolíticos neste trabalho, foram diferentes daquelas estudadas para as linhagens de referência. Vale ressaltar que o *Schizophillum commune*, n^o. 72 da Figura 07 , apresentou atividade xilanásica 7,61 U/ml, valor este superior à das outras linhagens de referência, porém 1,7 vezes inferior à do isolado n^o-49. A atividade FPA sica de todos os microrganismos de referência não foi superior a 0,10 U/ml.

4.1.3 Avaliação da produção de xilanase pelos 10 microrganismos xilanolíticos selecionados cultivados em diferentes hemiceluloses

4.1.3.1 Hemicelulose total isolada de bagaço de cana

Dando continuidade ao estudo da produção de xilanase pelos 10 isolados selecionados até então e objetivando escolher uma linhagem que demonstrasse um potencial peculiar para a produção destas enzimas, decidiu-se cultivá-los seguindo-se a mesma sequência pré-estabelecida, porém utilizando-se hemicelulose total, isolada de bagaço de cana, no lugar do bagaço como fonte de carbono e mantendo-se igual concentração, ou seja

1 % . Estes cultivos foram desenvolvidos em duplicata porém não em paralelo. Os resultados apresentados no Figura 08 mostram a média da atividade xilanásica obtida em ambos os cultivos em 4 dias (96 horas).

O perfil do cultivo dos microrganismos em hemicelulose total foi completamente diferente daquele obtido em bagaço de cana. A atividade xilanásica foi superior para oito dos dez isolados cultivados em hemicelulose total. Apenas para o microrganismo n^o. 54, a atividade caiu aproximadamente para

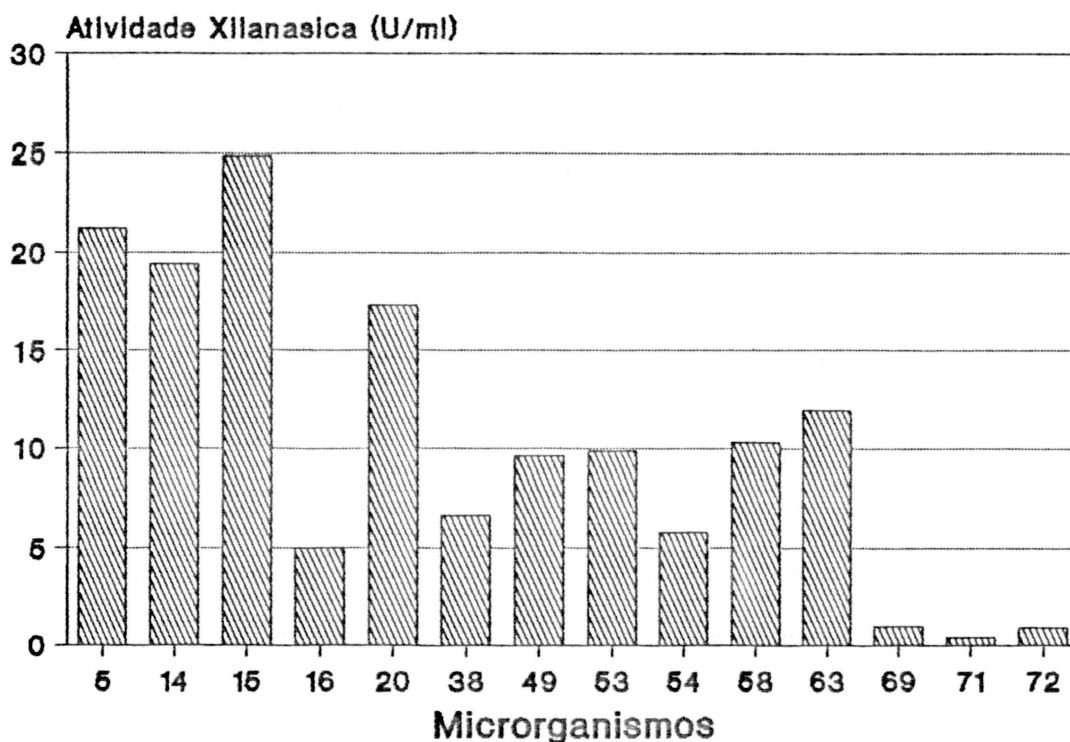
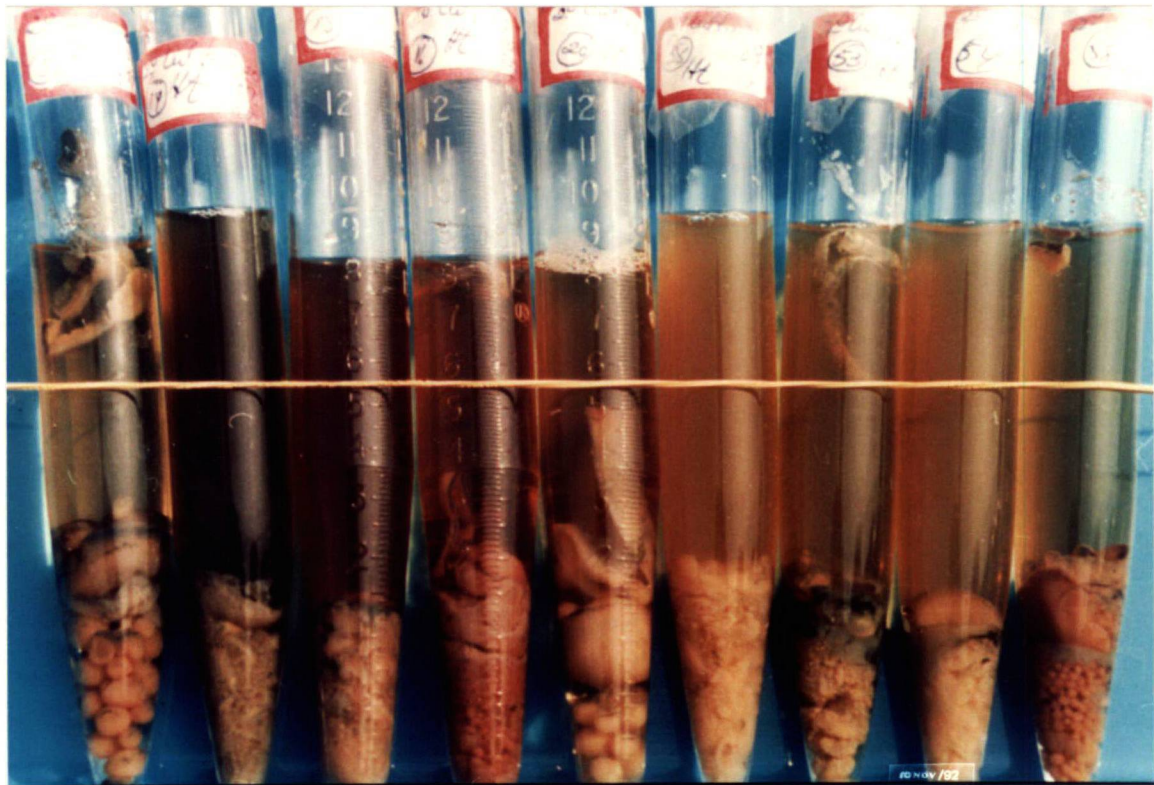


Figura 08 : Produção de xilanase em HTBC 1 % pelos 10 microrganismos xilanolíticos selecionados e por 4 microrganismos referência.

metade (5,8 U/ ml) quando comparada com a do mesmo crescido em bagaço, ou seja, 11,8 U/ml. Deve-se observar a ordenada da Figura 08 cujo valor máximo dobrou para 30 U/ml quando comparado com o da Figura 07, devido ao microrganismo nº 15 que se destacou como xilanolítico, nestas condições, com atividade xilanásica de 24,84 U/ml. Entre os microrganismos utilizados como referência apenas o *Aspergillus aculeatus* apresentou atividade xilanásica quatro vezes superior à obtida em bagaço. Os outros três microrganismos de referência mostraram uma queda superior a 50 % desta enzima.



Fotografia 02 : Biomassa microbiana obtida em 96 horas de cultivo no meio mínimo de Vogel contendo 1 % de HTBC.

Segundo Biely (09) as enzimas xilanolíticas são produzidas em grandes quantidades durante o crescimento em xilana. Os resultados aqui obtidos comprovam esta afirmativa embora tenham sido utilizadas xilanas de diferentes pesos moleculares, constituintes da hemicelulose total isolada do bagaço.

A biomassa microbiana obtida nestes cultivos não foi avaliada sistematicamente, considerando que neste estágio do trabalho este parâmetro não estava inserido no objetivo principal. Porém a biomassa obtida em um dos cultivos em hemicelulose total dos microrganismos n^o. 05, 14, 15, 16, 20,38, 53, 54 e 58 pode ser observada na Fotografia 02. Nesta foto pode ser constatada as variações das tonalidades do sobrenadante do meio de cultivo, como também da biomassa dos respectivos microrganismos, sedimentada no fundo dos tubos cônicos após centrifugação. O que se observou nestes cultivos como em outros, não fotografados, é que o volume de biomassa não apresentou correlação direta com a atividade xilanásica.

No filtrado do sobrenadante de cada meio de cultivo dos dez isolados e quatro microrganismos de referência foram analisados os açúcares totais solúveis e redutores residuais, além das atividades xilanásica e celulásica. Foram determinados os valores de pH inicial e final. Todos os resultados acima referidos podem ser observados na TABELA V.

TABELA V: Atividade Xilanásica e Celulásica dos 10 microrganismos selecionados e de 4 de referência cultivados em HTBC.

Micrgrs.	Ativid.Enzimáticas U/ml			Açúcares mg/ml		pH* final
	Xlnase.	CMCase	FPase	Totais	Reduts.	
05	21,20	0,12	0,04	0,61	0,11	6,9
14	19,40	0,06	0,03	0,80	0,22	6,9
15	24,84	0,10	0,08	1,40	0,33	7,0
16	5,00	0,04	0,02	0,56	0,08	7,1
20	17,30	0,20	0,09	1,24	0,32	6,9
38	6,70	0,26	0,14	1,53	0,29	7,0
49	9,60	0,10	0,03	0,70	0,20	7,0
53	9,84	0,11	0,03	0,80	0,19	6,5
54	5,80	0,12	0,12	2,36	0,52	7,1
58	10,32	0,04	0,03	0,52	0,11	6,8
63	11,96	0,14	0,05	0,55	0,09	4,7
69	1,02	0,10	0,03	0,54	0,19	7,0
71	0,40	0,05	0,05	0,78	0,26	6,0
72	0,92	0,06	0,15	2,82	0,68	6,8

* pH inicial = 6,3

A grande maioria da atividade celulásica foi inferior à obtida quando os microrganismos foram cultivados em bagaço de cana.

Apesar de terem sido detectados os açúcares totais solúveis, estes não representam os açúcares totais residuais, visto que após a centrifugação da biomassa microbiana, parte da hemicelulose, não solubilizada, ficou sedimentada no fundo do tubo de ensaio. O grau de sedimentação foi variado, possivelmente, devido ao metabolismo dos microrganismos conforme demonstrado através das atividades xilanásicas respectivas. Consequentemente o consumo de açúcares totais também deve ter variado em diferentes graus. Portanto se a hemicelulose total tivesse sido sedimentada juntamente com a biomassa, os açúcares totais não poderiam ser detectados. Se a

quantidade de açúcares redutores do sobrenadante fosse avaliada, poderia ser comparada à dos açúcares totais solúveis. Estes foram os motivos pelos quais foram determinados os açúcares totais solúveis e redutores. Analisando-se estes dados como um todo não é possível generalizar, por exemplo, que existe maior quantidade de açúcares totais solúveis e/ou redutores nos cultivos dos microrganismos que apresentaram maior atividade xilanolítica.

Os valores de pH aumentaram na maioria dos cultivos dos microrganismos, na ordem de 0,2 a 0,8 unidade, quando comparados com o valor inicial de pH igual a 6,3. As duas exceções foram os cultivos dos microrganismos de referência: *Aspergillus aculeatus* (n^o.63), cujo o pH do meio caiu para 4,7 e o do *Phanaerochete chrysosporium* (n^o.71), no qual o pH final foi 6,0. O aumento do pH foi observado por Dekker (31) quando cultivou o *T. reesei* QM 9414 em hemicelulose total de bagaço de cana, no qual o pH inicial era 5,3 e atingiu 6,5 entre 24 a 48 horas, quando a produção da enzima cessou.

4.1.3.2 Hemicelulose "A" isolada de bagaço de cana

Uma vez que tinha sido observado um aumento significativo da produção de xilanase, quando os dez isolados foram cultivados em hemicelulose total, decidiu-se cultivá-los nas mesmas condições, trocando-se a fonte de carbono pela hemicelulose "A" também isolada de bagaço. Assim poderia ser verificado se esta hemicelulose influencia, positivamente ou não, na produção da enzima estudada, em comparação com a

presença de polímeros de açúcares, com diferentes tamanhos e graus de solubilidade (hemicelulose total).

Os resultados dos cultivos acima explicitados estão apresentados na Figura 09, na qual pode ser observado o perfil da produção de xilanase que também variou significativamente. Estes resultados também constituem a média de cultivos realizados separadamente e interrompidos quando completaram quatro dias (96 horas).

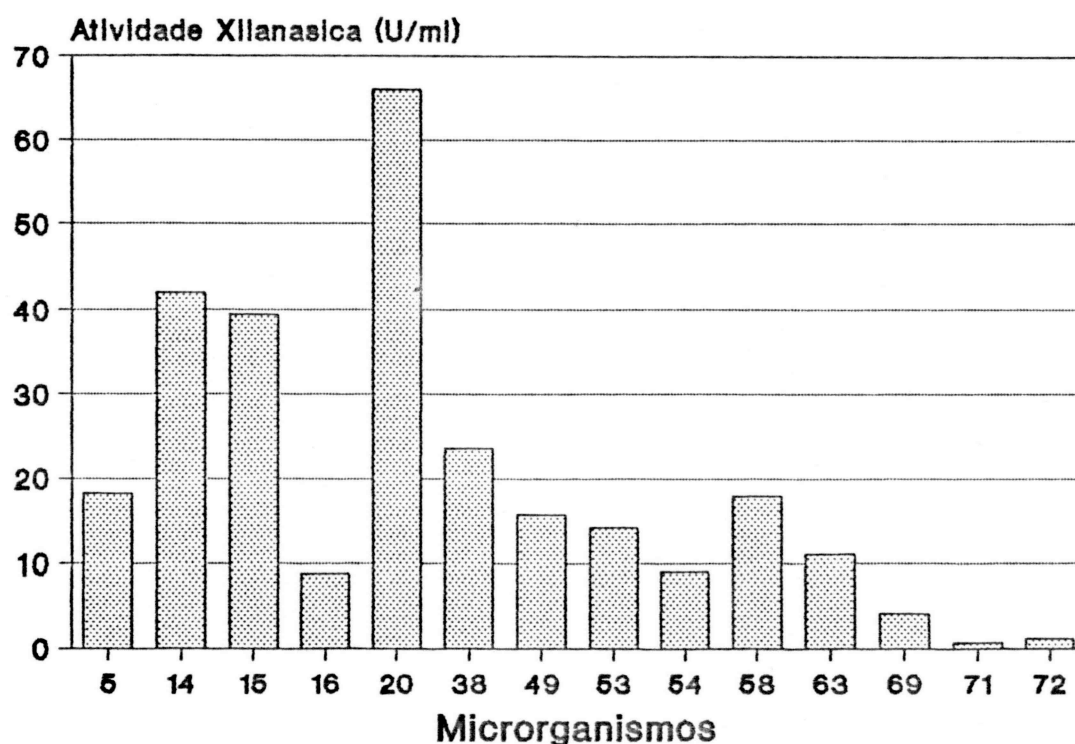


Figura 09 : Produção de xilanase em H"A"BC 1% pelos 10 microrganismos xilanolíticos selecionados e por 4 microrganismos de referência.

O microrganismo que se destacou como produtor em hemicelulose "A" foi o n^o. 20, cuja atividade xilanásica foi aproximadamente 66 U/ml. Todos os 10 isolados cultivados nesta hemicelulose apresentaram atividade xilanásica mais elevada, que variou de 8,8 a 66 U/ml, em comparação com os cultivos em hemicelulose total, 5,8 à 24,8 U/ml, e em bagaço de cana 5,1 à 13,1 U/ml. O mesmo não ocorreu com os microrganismos de referência. *Aspergillus aculeatus* (n^o. 63) manteve a atividade em torno de 11,0 U/ml, semelhante à obtida em hemiceluloses totais e superior à da obtida em bagaço - 4,0 U/ml. O *Fusarium oxysporum* (n^o. 69) apresentou 4,17 U/ml comparada com 1,0 U/ml em hemicelulose total e 3,62 U/ml em bagaço. Portanto, o aumento não foi significativo. O *Phanaerochete chrysosporium* (n^o. 71) e o *Schizophillum commune* (n^o. 72) mostraram atividade xilanásica inferior à obtida em bagaço.

Também foram determinados nestes cultivos os açúcares totais solúveis residuais e redutores além da atividade celulásica. Estes resultados estão apresentados na TABELA VI.

Analisando-se os resultados da atividade celulásica verifica-se que a variação da atividade CMCase ficou entre 0,05 à 0,30 U/ml, para todos os 10 isolados e, para estes, a atividade foi pouco mais elevada em comparação com aquela obtida em hemicelulose total, que variou de 0,04 a 0,26 U/ml. A atividade FPAse variou entre 0,02 a 0,13 mantendo níveis compatíveis com os dos cultivos em hemicelulose total e pulverizado de bagaço.

A hemicelulose "A" é insolúvel em água; portanto, devem ser consideradas as mesmas ponderações explicitadas

TABELA VI : Atividade Xilanásica e Celulásica dos 10 microrganismos cultivados em Hemicelulose "A" de BC.

Micrgrs.	Ativid.enzimática U/ml			Açúcares mg/ml		pH* final
	Xlnase	CMCase	FPase	Totais	Redut.	
05	18,24	0,20	0,08	0,25	0,04	6,2
14	42,10	0,14	0,05	0,45	0,06	6,3
15	39,53	0,13	0,05	0,39	0,07	6,3
16	8,84	0,06	0,02	0,22	0,02	6,6
20	66,00	0,30	0,10	0,40	0,06	6,3
38	23,54	0,39	0,10	0,41	0,08	6,2
49	15,70	0,22	0,07	0,53	0,08	6,4
53	14,20	0,18	0,05	0,41	0,10	6,4
54	9,10	0,13	0,13	2,44	0,52	6,8
58	17,86	0,15	0,04	0,43	0,04	6,5
63	11,00	0,09	0,03	0,23	0,04	4,3
69	4,17	0,13	0,03	0,24	0,03	6,6
71	0,67	0,19	0,18	3,96	1,06	5,1
72	1,13	0,12	0,23	5,83	1,54	6,0

* pH inicial = 6,0

anteriormente no item 4.1.3.1, sobre a análise de açúcar total e redutor. É conveniente observar, nos resultados sobre a concentração de açúcares redutores, que os microrganismos *Phanaerochete cryso sporium* (n^o.71) e o *Schizophillum commune* (n^o.72) apresentaram as maiores concentrações de açúcares redutores residuais, 1,06 e 1,54 mg/ml respectivamente. Os resultados dos açúcares totais residuais solúveis para estes microrganismos foram 3,96 e 5,83 mg/ml, respectivamente. Porém as atividades xilanásicas, 0,67 e 1,13 U/ml, foram as mais baixas comparadas com os outros dois microrganismos de referência bem como os dez isolados cultivados nesta hemicelulose.

Considerando-se o pH final do meio de cultivo, houve um aumento de 0,2 a 0,6 unidade para a maioria dos microrganismos isolados e os de referência, e novamente houve um

abaixamento do pH do meio de cultivo do *Aspergillus aculeatus* (n^o.63), cujo pH final foi 4,3 e também do *Phanaerochete chrysosporium* (n^o.71) com o pH final igual a 5,1.

4.1.3.3 Xilana de "Larch"

Uma vez que todos os dez isolados tinham aumentado a produção de xilanase em hemicelulose "A" isolada de bagaço de cana, em comparação com a obtida em bagaço atingindo uma atividade xilanásica onze vezes maior para o microrganismo número 20, seria conveniente verificar a produção de xilanases em uma xilana adquirida comercialmente. Segundo a análise feita por Dekker (30) esta xilana contém xilose e ácido glucurônico porém não apresenta arabinose ou glucose.

As condições e o tempo de cultivo foram os mesmos seguidos para as outras hemiceluloses trocando-se apenas a fonte de carbono e mantendo-se a concentração de 1 % . A Figura 10 apresenta os resultados destes cultivos.

Os resultados apresentados na Figura 10 evidenciam novamente os microrganismos n^o.20 seguido pelo n^o.15 como melhores xilanolíticos, com atividades de 37,68 e 34,31 U/ml respectivamente. Porém, o que se observou para a maioria dos dez isolados estudados foi uma queda na produção de xilanases em comparação com os obtidos em hemicelulose "A". A diminuição da atividade xilanásica para o microrganismo n^o.20 foi aproximadamente de 43 % , enquanto que a do n^o.15 foi em torno de 13 % . Os microrganismos de referência apresentaram atividade xilanásica inferior à dos microrganismos n^o.15 e n^o.20 como também de cinco outros isolados. Apenas o *Aspergillus*

aculeatus (n^o.63) com atividade xilanásica de 7,56 U/ml superou as atividades dos isolados n^o.05, 54 e 58, nesta fonte de carbono.

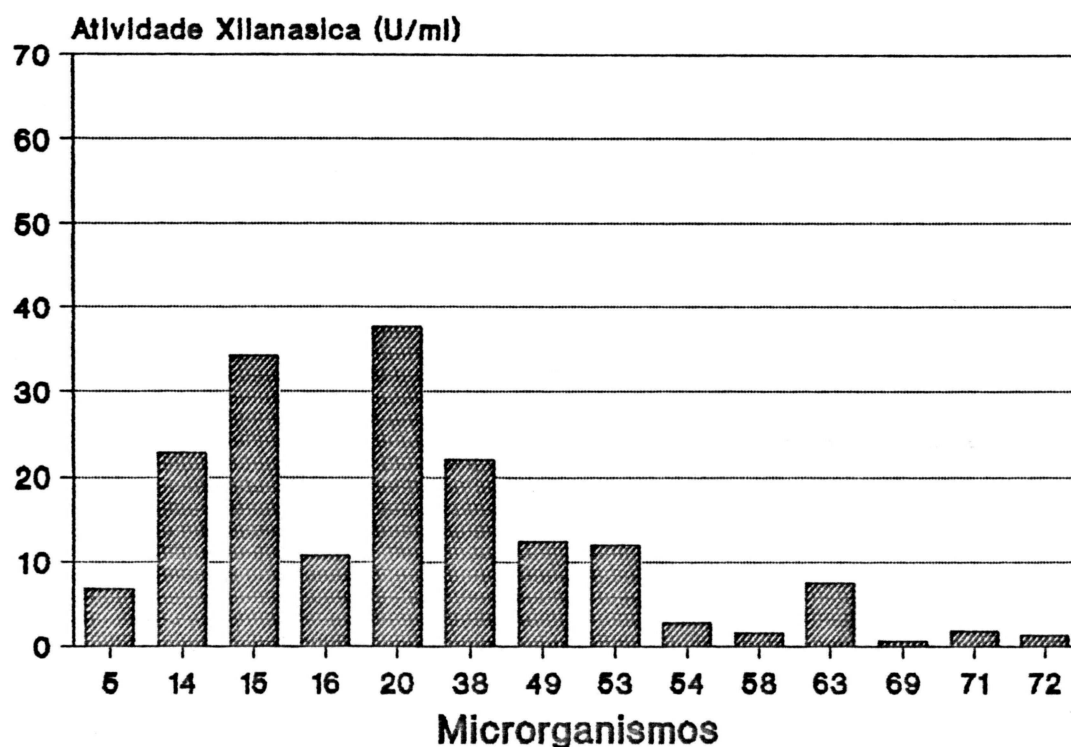


Figura 10 : Produção de xilanase em XL 1 % pelos 10 microrganismos xilanolíticos selecionados e pelos 4 microrganismos de referência.

Ghosh e Deb (61) em 1988, estudaram a produção e caracterização de xilanase de *Thielaviopsis basicola*. Constataram que este microrganismo produziu 12 U/ml desta hidrolase quando crescido em palha de arroz não tratada, 4,8 U/ml no mesmo substrato pré-tratado com alcali e 7,3 U/ml em

xilana comercial. Estes resultados, concomitantemente com os obtidos neste trabalho, até o momento, demonstram que xilana comercial pode não ser o substrato ideal para a produção de xilanase e que um substrato não tratado pode ser promissor se estudados parâmetros de cultivo para otimização.

A xilana de "larch" é praticamente solubilizada sob aquecimento. Porém à temperatura de 28 °C é parcialmente solúvel. O grau de solubilidade desta xilana é superior ao da hemicelulose total e ao da hemicelulose "A" de bagaço de cana.

Os resultados das atividades enzimáticas e açúcares totais solúveis e redutores residuais estão apresentados na TABELA VII.

TABELA VII : Atividade Xilanásica e Celulásica dos 10 microrganismos selecionados cultivados em xilana de "Larch".

Micrgrs	Ativ.Enzimáticas		U/ml FPAse	Açúcares mg/ml		pH* final
	Xlnase	CMCase		Totais.	Redut.	
05	6,85	0,04	0,00	1,60	0,53	6,9
14	22,64	0,01	0,00	0,77	0,04	6,7
15	34,31	0,00	0,00	0,51	0,04	6,7
16	10,78	0,02	0,00	1,55	0,22	7,0
20	37,68	0,00	0,00	0,53	0,06	6,7
38	21,92	0,00	0,00	0,88	0,20	6,6
49	12,41	0,01	0,00	0,42	0,09	6,0
53	11,98	0,02	0,00	0,57	0,08	6,6
54	2,80	0,01	0,00	5,15	0,62	7,0
58	1,61	0,01	0,00	2,63	0,61	6,6
63	7,56	0,10	0,00	1,55	0,08	5,9
69	0,55	0,00	0,00	2,16	0,15	6,9
71	1,84	0,01	0,00	6,82	1,29	5,9
72	1,22	0,02	0,00	4,67	1,38	6,3

* pH inicial = 6,1

A atividade celulásica, determinada com carboximetilcelulose, foi muito baixa para a maioria dos microrganismos e quando determinada com o papel de filtro como substrato, ela não foi detectada nos cultivos de todos os microrganismos, incluindo os de referência. Portanto, durante o crescimento em xilana, várias espécies produzem xilanases específicas com pouca ou nenhuma atividade celulásica (09).

Analisando-se os açúcares totais e redutores residuais, observa-se que os meios de cultivo dos microrganismos n^o. 54, 58, 71 e 72 apresentam atividade xilanásica mais baixa: 2,80 ; 1,61 ; 1,84 e 1,22 U/ml respectivamente. Os açúcares totais solúveis residuais foram os mais elevados: 5,15 ; 2,63; 6,82 e 4,67 mg/ml na ordem respectiva dos microrganismos citados. Os açúcares redutores foram 0,62; 0,61; 1,29 e 1,38 mg/ml respectivamente. Porém a atividade xilanásica do *Aspergillus aculeatus* foi 7,56 U/ml, destacando-o entre os microrganismos citados anteriormente. O açúcar total residual foi 1,55 mg/ml e o redutor 0,08 mg/ml. Estes resultados demonstram que não é conveniente generalizar a baixa atividade xilanásica com baixo consumo de açúcar total pelo microrganismo, evidenciado pela maior quantidade de açúcar total residual solúvel. Somente a quantificação da biomassa microbiana resultante dos cultivos, nesta condição, poderia fornecer resultados para tal conclusão, considerando-se também a fisiologia peculiar de cada microrganismo em estudo.

O pH dos meios de cultivo também variou, em uma faixa de 0,6 à 0,9 para a maioria dos isolados. Apenas o cultivo do isolado n^o. 49 apresentou pH final igual a 6,0 e os cultivos dos microrganismos de referência, *Aspergillus aculeatus* (n^o. 63)

e *Phanaerochete chryso sporium* (n^o. 71), o pH final caiu para 5,9 em comparação com o inicial que foi 6,1. Vale ressaltar que o pH final do meio de cultivo do *Aspergillus aculeatus* em hemicelulose total de bagaço foi 4,7 e em hemicelulose "A", isolada também de bagaço de cana, foi 4,3. Portanto o abaixamento do pH no cultivo em xilana de "Larch" foi muito menor para este microrganismo.

Simpson (123) verificou que *Aspergillus niger* quando crescido em farelo de trigo 3 %, em condições submersa, o pH caiu de 7,0 para 6,0 em 48 horas e para 4,9 em 72 horas, quando a proporção meio:ar foi (1:5) conforme utilizado neste trabalho. Segundo os resultados de Simpson, a variação da quantidade de ar pode ajudar no controle do pH da fermentação pelo *Aspergillus niger*.

Stewart e colaboradores (127) cultivaram o *Aspergillus fumigatus* em xilana de "Larch" 1 %, adquirida da Sigma e da Aldrich. A atividade da xilanase induzida com a xilana comercializada pela Sigma correspondeu a 66 % em relação à atividade induzida com feno (100 %), sem pré-tratamento, e 40 % com a xilana da Aldrich. Estes resultados de Stewart e colaboradores, demonstram claramente que a procedência da xilana e o resíduo lignocelulósico utilizado, com e sem pré-tratamento afetam diretamente a produção de xilanase pelo microrganismo em estudo. Para o *Aspergillus fumigatus* Fresenius, o pH variou consideravelmente conforme a fonte de carbono por eles estudadas. Comparativamente os dados desta tese, usando-se hemicelulose "A" de bagaço de cana e xilana comercial (Figuras 09 e 10), seriam aceitáveis.

Os resultados numéricos das atividades das

xilanases detectadas por Simpson (123) e por Stewart e colaboradores (127), aqui discutidos , não tem sido especificados devido a metodologia por eles empregada, a qual foi distinta da utilizada neste trabalho.

4.1.4 Comparação da produção de xilanase em bagaço de cana e em hemiceluloses pelos 10 microrganismos xilanolíticos selecionados.

Todos os resultados das atividades xilanásicas obtidas pelos 10 isolados e os 4 microrganismos de referência nos cultivos em pulverizado de bagaço de cana e nas diferentes hemiceluloses estudadas, hemicelulose total, hemicelulose "A", isoladas de bagaço, e xilana de "Larch", estão apresentados na TABELA VIII.

TABELA VIII: Atividade Xilanásica dos 10 microrganismos selecionados em bagaço de cana cultivados nas hemiceluloses isoladas.

Microrgs.	Atividade Xilanásica (U/ml)			XL
	BC	HT	H"A"	
05	9,50	21,20	18,24	6,85
14	6,66	19,40	42,10	22,64
15	7,83	24,84	39,53	34,31
16	5,14	5,00	8,84	10,78
20	5,86	17,30	66,00	37,68
38	5,61	6,70	23,54	21,92
49	13,13	9,60	15,70	12,41
53	7,00	9,84	14,20	11,98
54	11,77	5,80	9,10	2,80
58	6,10	10,32	17,86	1,61
<i>A. aculeatus</i>	4,00	11,96	11,00	7,56
<i>F. oxysporum</i>	3,62	1,02	4,17	0,55
<i>P. chrysosporium</i>	2,47	0,40	0,67	1,84
<i>S. commune</i>	7,61	0,92	1,13	1,22

Observando-se os resultados da atividade xilanásica dos cultivos de cada um dos dez isolados, nas diferentes fontes de carbono, é possível constituir, de forma rudimentar, três grupos de microrganismos : o grupo I seria para aqueles que nos traram atividade xilanásica crescente à medida em que a fonte de carbono foi gradativamente sendo purificada ou seja PBC < HT < H"A" Neste grupo estariam os microrganismos nº 14, 15, 20, 38, 53 e 58. O grupo II seria para aqueles cuja a atividade xilanásica foi semelhante independentemente do grau de purificação da hemicelulose do bagaço de cana. A este grupo pertenceriam os microrganismos nº 16, 49 e 54. O grupo III seria para aqueles cuja a atividade xilanásica aumentou nas hemiceluloses isoladas e foi semelhante independentemente se hemicelulose total ou hemicelulose "A" de bagaço. A este grupo pertenceria o isolado nº.05. Considerando-se que os microrganismos tinham sido selecionados previamente em bagaço de cana, conseqüentemente foram apenas os resultados da atividade xilanásica dos cultivos nas hemiceluloses isoladas de bagaço, os parâmetros de análise para se determinar o microrganismo xilanolítico, a ser utilizado para dar continuidade no estudo da produção da xilanase. Portanto, a xilana de "Larch" forneceu uma informação adicional do potencial xilanolítico destes microrganismos quando crescidos em uma xilana que poderia, até então, ser adquirida comercialmente e tem sido citada como fonte indutora de xilanase em alguns trabalhos da literatura (08, 127). Entre os microrganismos utilizados como referência, apenas o *Aspergillus aculeatus* poderia ser incluído no grupo III. O *Phanaerochete chrysosporium* e o *Schizophillum commune* mostraram uma queda acentuada da atividade xilanásica em

hemicelulose total e em hemicelulose "A" de bagaço. A atividade desta enzima pelo *Fusarium oxysporum* crescido em pulverizado de bagaço e em hemicelulose "A" foi 3,62 e 4,17 U/ml respectivamente enquanto que em hemicelulose total foi 1,02 U/ml.

4.2 Identificação dos microrganismos xilanolíticos selecionados

Os 10 isolados xilanolíticos selecionados foram enviados para o Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco, Recife para serem identificados. Os nomes de classificação destes microrganismos estão relacionados na TABELA IX, juntamente com as fontes de isolamento.

TABELA IX : Nomes de Classificação dos 10 microrganismos selecionados

Micrg. N ^o .	Nome científico	Fonte de Isolamento
05	<i>Rhizopus oryzae</i> Went & Prinsen Geerl	inseto (Hemiptera)
14	<i>Trichoderma harzianum</i> Rifai	<i>Aspidosperma</i> sp.
15	<i>Trichoderma viride</i> Pers & S.F.Gray	" " "
16	<i>Aspergillus fumigatus</i> Fresenius	inseto (Termita)
20	<i>Trichoderma harzianum</i> Rifai	<i>Aspidosperma</i> sp.
38	<i>Trichoderma pseudokoningii</i> Rifai	" Madeira"
49	<i>Trichoderma aureo-viride</i> Rifai	<i>Gynandrobrotica</i> sp.
53	<i>Trichoderma aureo-viride</i> Rifai	" " "
54	<i>Trichoderma pseudokoniingii</i> Rifai	" " "
58	<i>Rhizopus oryzae</i> Went & Prinsen Geerl	<i>Artocarpus</i> sp.

Surpreendentemente sete dos dez microrganismos classificados pertencem ao gênero *Trichoderma*. A espécie variou relativamente. Os microrganismos n^o. 14 e 20 são *T. harzianum*. Os n^o. 49 e 53, *T. aureo-viride*. O n^o.38 e 54 *T. pseudokoningii* e o n^o. 15, *T. viride*. Os outros três microrganismos, pertencentes a outros gêneros, foram os n^o. 05 e 58 classificados como *Rhizopus oryzae* e o n^o. 16, *Aspergillus fumigatus*. Através destes resultados pode-se constatar que independentemente da procedência do microrganismo, ou seja, se isolado de madeira em decomposição ou de trato digestivo de inseto o gênero *Trichoderma* tem participação significativa na degradação das hemiceluloses. O gênero *Rhizopus* está em segundo lugar e em terceiro o *Aspergillus*.

O microrganismo n^o. 61, é um *Trichoderma reesei* e foi utilizado como referência apenas quando os 85 microrganismos foram cultivados em pulverizado de bagaço de cana (TABELA III). Os resultados estão apresentados na TABELA IV onde se observa 1,17 U/ml de atividade xilanásica. Considerando que este gênero é muito estudado como produtor de celulase (22, 31, 71, 91, 98, 129, 130, 140, 141) e o objetivo geral deste trabalho é a produção de xilanase em específico, o *Trichoderma reesei* não foi utilizado como referência na segunda fase de estudo dos xilanolíticos em diferentes hemiceluloses. Também foi considerado o baixo valor da atividade xilanásica do referido *Trichoderma*, em comparação com os valores dos isolados.

4.3 Comparação entre o potencial xilanolítico do *Trichoderma harzianum* (n^o.20) e do *Trichoderma aureo-viride* (n^o.49) em bagaço de cana 1 % nos meios de Vogel e de Mandels.

Para dar prosseguimento no estudo da produção de xilanase era necessário escolher um dos microrganismos entre os 10 isolados identificados. O critério de escolha foi baseado nos grupos I e II constituídos e explicitados no item 4.1.4. Na TABELA VIII destacam-se os microrganismos n^o.20 e n^o.49 os quais foram identificados como *T. harzianum* e *T. aureo-viride* respectivamente. Os resultados das atividades xilanásicas de ambos os microrganismos em pulverizado de bagaço de cana e nas hemiceluloses testadas e citadas anteriormente estão apresentados nas Figuras 11 e 12 .

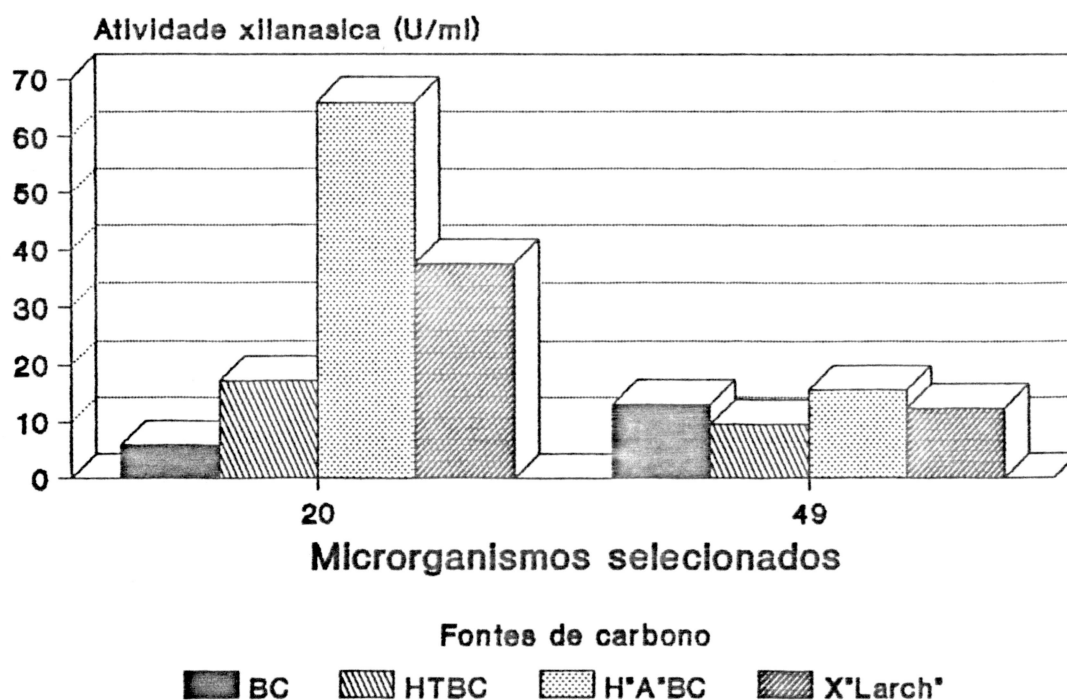


Figura 11

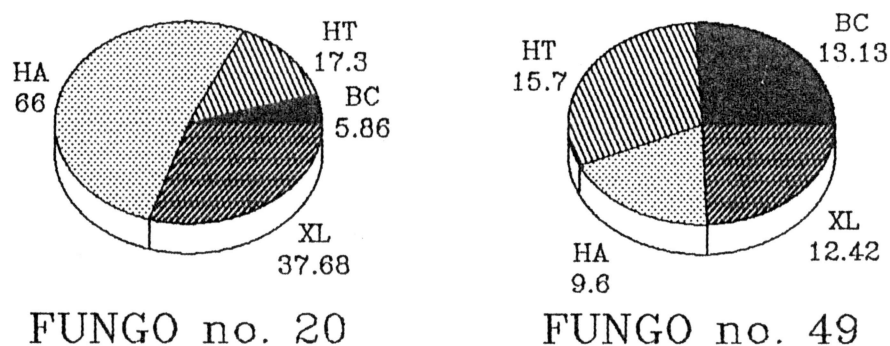


Figura 12

Figuras 11 e 12 : Atividades das Xilanases do *T. harzianum* e do *T. aureo-viride* cultivados em diferentes fontes de carbono no meio mínimo de Vogel.

O *Trichoderma harzianum* representando o grupo I foi o fungo que apresentou maior atividade xilanolítica em hemicelulose "A" isolada de bagaço, demonstrando possuir um potencial significativo para produzir a enzima. O *Trichoderma aureo-viride* representante do grupo II, demonstrou que o seu potencial de produção de xilanase é similar independentemente do grau de purificação da xilana indutora.

O meio de Mandels (91) quando comparado com o de Vogel (138) difere em alguns componentes. Enquanto o

primeiro contém 0,1 % (p/v) de proteose peptona, 0,2 % (v/v) de tween 80 e cobalto (Co^{2+}) como um dos elementos traços, o segundo não contém estes componentes. Porém somente o meio mínimo de Vogel contém citrato, cuja concentração final fica em torno de 0,3 % (p/v), cobre (Cu^{2+}) e molibidênio (Mo^+) entre os elementos traços e biotina como fonte de vitamina. Os íons fosfato, sulfato, cálcio, magnésio, potássio são comuns aos dois meios variando-se a concentração em maior ou menor grau. Ambos os meios de cultivo também apresentam amônio em sua composição, cuja concentração é inferior à 0,15 % (p/v). O pH de ambos os meios foi acertado para 6,0 com ácido fosfórico 0,1 N antes de completar o volume final e adicionar a fonte de carbono.

Um *Trichoderma harzianum*, cepa designada por NRCC 2333, doada ao Dr. J. D. Fontana pelo Dr. John N. Sadler (Forintek - Canadá), foi utilizada como referência nestes cultivos.

Considerando-se que os microrganismos do gênero *Trichoderma* esporulam e que o grau de esporulação varia de acordo com a espécie, como também com o meio de cultivo e a fonte de carbono utilizada, tratou-se neste experimento, de se encontrar uma diluição da solução de conídios que conferisse um número muito próximo de células a serem inoculados em um volume que também não variasse significativamente. Isto porque tinha sido observado que o *Trichoderma harzianum* (n^o.20) produzia mais esporos que o *T. harzianum* 2333, que por sua vez, esporulava mais do que o *T. aureo-viride*, quando crescidos em agar 2 %, sais de Vogel e xilose 1 % como fonte de carbono, em 96 horas.

Os resultados das atividades xilanásica e celulásica, que constituem a média dos cultivos destes

microrganismos nos meios de Vogel ou no de Mandels, bem como o volume do inóculo adicionado, conferindo um total de $1,5 \cdot 10^6$ conídios inoculados, além do pH final estão apresentados na TABELA X.

TABELA X : Produção de Xilanase pelos *Trichodermas* : *harzianum* e *aureo-viride* em bagaço de cana 1%.

Meio de cultivo	Fungo	Ativ. Enzimática (U/ml)			Inóculo (ml)	pH final
		Xlnase	CMCase	FPase		
Vogel	<i>T.h.</i> (20)	13,00	0,42	0,09	0,26	6,80
	<i>T.h.</i> 2333	9,74	0,46	0,14	0,21	6,82
	<i>T.a-v</i> (49)	2,16	0,02	0,01	0,24	6,84
	controle	0,00	0,00	0,00	0,00	5,86
Mandels	<i>T.h.</i> (20)	16,00	0,46	0,10	0,26	6,39
	<i>T.h.</i> 2333	14,41	0,52	0,16	0,21	6,50
	<i>T.a-v</i> (49)	8,00	0,31	0,05	0,24	6,47
	controle	0,00	0,00	0,00	0,00	5,69

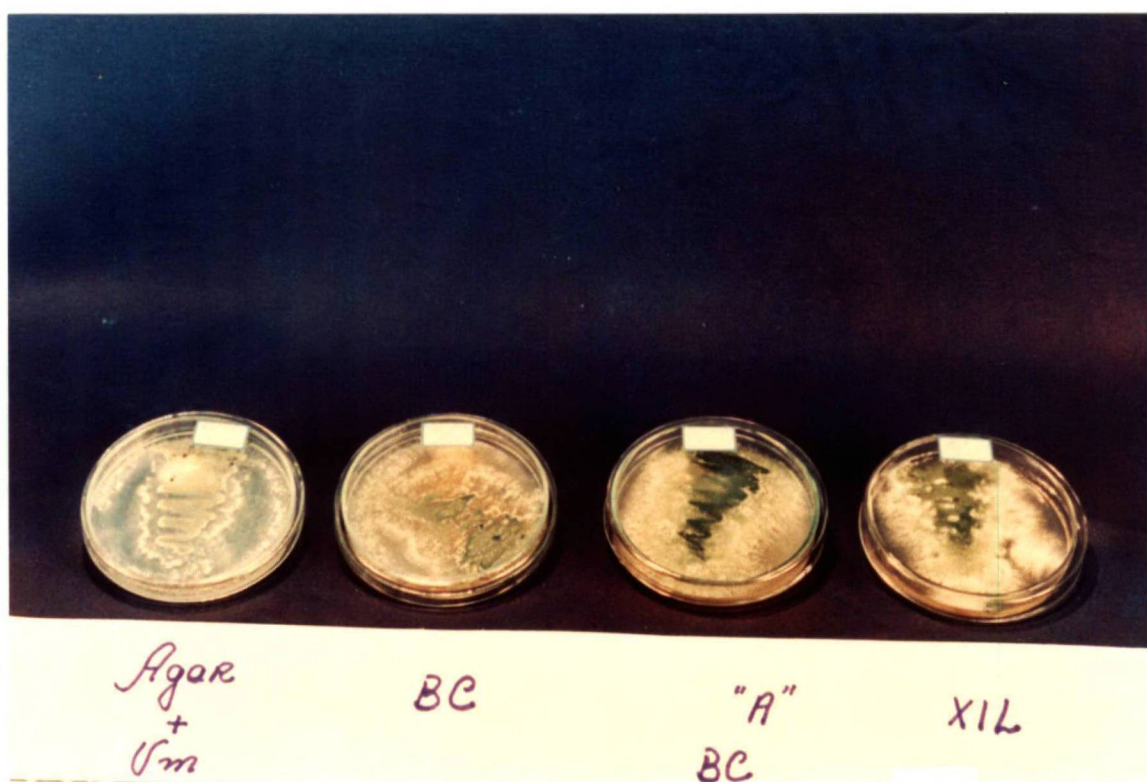
Os resultados da TABELA X mostram que o perfil da produção de xilanase não sofreu inversão para os três microrganismos independentemente se o meio de cultivo foi Vogel ou Mandels. Porém todos os microrganismos apresentaram atividade xilanásica mais elevada no meio de Mandels do que no de Vogel. A queda da atividade xilanásica do *Trichoderma aureo-viride* no meio de Vogel pode ser explicada pela diferença do tipo de inóculo que era constituído de micélios, nos cultivos anteriores, conforme explicitados no item 3.2.8. Porém o potencial do *T. aureo-viride* foi demonstrado no meio de Mandels o qual se mostrou mais eficiente inclusive para os dois

Trichoderma harzianum estudados. Cabe salientar os níveis reduzidos da atividade celulásica no meio de Mandels, ou quase nulos no meio de Vogel, do isolado do *Trichoderma aureo-viride* n^o 49. A atividade celulásica aumentou quando os três microrganismos foram crescidos no meio de Mandels. Os valores de pH aumentaram em relação ao pH inicial independentemente do meio de cultivo.

4.4 *Trichoderma harzianum* (n^o.20)

Considerando-se que o *T. harzianum* (n^o.20):

a) Apresenta grande capacidade de esporulação quando cultivado em meio sólido com sais de Vogel contendo bagaço de cana ou hemicelulose "A" isolada de bagaço ou xilose 1 %, conforme pode ser observado na Fotografia 03,



Fotografia 03 : *T. harzianum* crescido no meio mínimo de Vogel em agar, bagaço de cana, H"A"BC ou xilose.

b) Aumentou a atividade xilanásica de 5,86 U/ml (TABELA IV) para 13,00 U/ml no meio de Vogel mínimo (TABELA X), em pulverizado de bagaço, após a inoculação com esporos;

c) Apresentou atividade xilanásica de 66 U/ml quando crescido em hemicelulose "A" isolada de bagaço. Decidiu-se continuar o estudo da produção de xilanase deste microrganismo utilizando-se apenas o pulverizado de bagaço de cana como fonte de carbono.

4.4.1 Avaliação simultânea das variáveis : concentração de bagaço de cana, inóculo e tempo de cultivo na produção de xilanase através da Metodologia Estatística da Superfície de Resposta.

Encontrar uma produção ótima de xilanase através da seleção de um conjunto de fatores potencialmente importantes é uma tarefa difícil, que exige um grande número de ensaios experimentais. Para aumentar a eficiência na busca da solução ótima, estudando-se apenas os parâmetros citados acima, optou-se por utilizar um delineamento estatístico, como um instrumento de apoio, para avaliar a viabilidade do uso do bagaço de cana como única fonte de carbono para um microrganismo cujo potencial tinha sido destacado. Por outro lado poderia ser verificada a aplicação de um delineamento estatístico em ensaios biológicos para a produção de xilanase.

Para aplicar a metodologia da superfície de resposta foram codificadas as variáveis X_1 (concentração de bagaço de cana em g %), X_2 (inóculo = concentração de conídios $\times 10^6$) e X_3 (tempo de cultivo = dias). O intervalo de cada uma

destas variáveis, a sequência aleatória dos 15 experimentos desenvolvidos e os resultados das atividades xilanásicas estão apresentados na TABELA XI .

TABELA XI: Produção de Xilanase pelo *T. harzianum* (n^o.20) em bagaço de cana

Experi- mentos	Sequência Aleatória	Condições dos cultivos			Atividade xilanásica (U/ml)
		[BC] (%)	inóculo x 10 ⁶	tempo (dias)	
01	3 ^o .	0,1	0,5	8	1,88
02	10 ^o .	5,3	0,5	8	43,66
03	7 ^o .	0,1	5,5	8	0,92
04	1 ^o .	5,3	5,5	8	46,85
05	9 ^o .	0,1	3,0	2	0,04
06	6 ^o .	5,3	3,0	2	6,98
07	8 ^o .	0,1	3,0	14	0,88
08	12 ^o .	5,3	3,0	14	49,79
09	15 ^o .	2,7	0,5	2	2,19
10	2 ^o .	2,7	5,5	2	4,95
11	14 ^o .	2,7	0,5	14	37,13
12	5 ^o .	2,7	5,5	14	42,81
13	11 ^o .	2,7	3,0	8	34,63
14	4 ^o .	2,7	3,0	8	35,03
15	13 ^o .	2,7	3,0	8	33,00

O coeficiente de variação calculado foi 32,13 % . A faixa aceitável para este coeficiente é até 25 % em se tratando de microrganismo(68), portanto o coeficiente de variação obtido neste delineamento para a produção de xilanase , mostra que as condições estudadas, não se ajustam ao

modelo matemático. Porém através da análise de variância apresentada na TABELA XII, observa-se que a regressão linear é a fonte de variação que explica a maior parte da variação e esta é significativa a nível de 1 % . O desvio da regressão foi elevado e significativo a nível de 5 % . O valor do erro experimental foi muito baixo, conforme pode ser comprovado pelos valores das repetições nos experimentos 13,14 e 15 da TABELA XI.

A TABELA XIII mostra a análise da regressão. O coeficiente de correlação obtido foi 0,9575, evidenciando que 95,75 % de determinação é explicada pelo modelo. De acordo com Henika e Palmer (1976), quando se trata de ensaios biológicos (fermentação), R^2 da ordem de 75 % podem ser considerados satisfatórios (68).

TABELA XII: Análise de Variância para (Y_1) Produção de Xilanase

Fonte de Variação	Graus de Liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrado Médio	F Calculado
Regressão Linear	9	5409,51	601,05	519,81 **
Quadrática	3	4285,48	1428,49	1235,40 **
Interação	3	677,22	225,74	195,23 **
Desvio da Regressão	3	446,80	148,93	128,80 **
Erro Experim.	3	237,92	79,31	68,59 *
	2	2,31	1,15	
Total	14	5649,73		

* Significativo ao nível de 5 % de probabilidade
 ** Significativo ao nível de 1 % de probabilidade

TABELA XIII: Análise de regressão para (Y_1) produção de xilanase

Erro padrão	6,93	
Coefficiente de Determinação Total (R^2)	0,9575	95,75 %
Variação explicada pela:		
regressão linear		75,85 %
regressão quadrática		11,99 %
interação		7,91 %
Variação explicada pelo modelo		95,75 %
Variação não explicada pelo modelo nem pelo erro experimental		4,21 %

A equação de regressão múltipla (modelo preditivo) obtida, com base nos valores experimentais, da atividade xilanásica usando-se o método dos mínimos quadrados, está apresentada abaixo:

$$\hat{Y} = 34,22 + 17,94 x_1 + 1,33 x_2 + 14,55 x_3 - 9,12 x_1^2 - 1,77 x_2^2 - 10,67 x_3^2 + 1,03 x_1 x_2 + 10,49 x_1 x_3 + 0,73 x_2 x_3$$

A comparação entre os valores observados (Y_1) e os valores estimados (\hat{Y}_1), desvios e os intervalos de confiança para o delineamento completo estão na TABELA XIV.

TABELA XIV : Comparação entre os valores observados (Y_1) e os valores estimados (\hat{Y}_1), desvios e os respectivos intervalos de confiança (I.C.) para o delineamento completo.

$$Y_1 = \text{Produção de Xilanase (U/ml)}$$

N ^o .do Tratamento	Y_1	\hat{Y}_1	Desvios ($Y_1 - \hat{Y}_1$)	Limite de Superior	I.C. ¹ . Inferior
1	1,88	5,08	-3,20	-8,88	19,05
2	43,66	38,90	4,76	24,93	52,86
3	0,92	5,68	-4,76	-8,29	19,64
4	46,85	43,64	3,20	29,67	57,61
5	0,04	-7,58	7,62	-21,55	6,38
6	6,98	7,32	-0,34	-6,65	21,28
7	0,88	0,54	0,34	-13,42	14,50
8	49,79	57,41	-7,62	43,45	71,38
9	2,19	6,61	-4,42	-7,35	20,57
10	4,95	7,81	-2,86	-6,15	21,78
11	37,13	34,26	2,86	20,29	48,23
12	42,81	38,39	4,42	24,42	52,35
13	34,63	34,22	0,41	20,25	48,18
14	35,03	34,22	0,81	20,25	48,18
15	33,00	34,22	-1,22	20,25	48,18

¹I.C. com 90 % de probabilidade

Examinando-se os I.C. (TABELA XIV), pode-se comparar os valores observados experimentalmente (Y_1) com os valores estimados (\hat{Y}_1) pelo modelo. Em todos os ensaios, os valores de Y_1 situam-se dentro do I.C. Portanto, com o emprego da equação de regressão múltipla (modelo preditivo), pode-se estimar a produção de xilanase, a diferentes níveis de concentração de bagaço de cana (X_1), inóculo (n^o. de conídios) (X_2) e do tempo de cultivo (X_3).

Analisando-se os parâmetros estudados observa-se que X_2 é a variável menos significativa, conforme pode ser verificado pelas respostas dos experimentos n^o. 11 e 12 (TABELA XI). Nestes experimentos a concentração de bagaço de cana foi

fixada em 2,7 % e o tempo de cultivo em 14 dias, a atividade xilanásica foi 37,13 U/ml com $0,5 \times 10^6$ conídios e 42,81 U/ml com $5,5 \times 10^6$ conídios respectivamente. Esta diferença de 5,68 U/ml não foi mantida quando se observa o experimento n^o.2 e o n^o.4 nos quais a concentração de bagaço foi 5,3 % e em 8 dias de cultivo as atividades foram respectivamente 43,66 U/ml com $0,5 \times 10^6$ conídios e 46,85 U/ml com $5,5 \times 10^6$ conídios. A diferença caiu para 3,19 U/ml. As variáveis X_1 (concentração de bagaço de cana) e X_3 (tempo de cultivo) foram mais significativas. Com concentrações muito baixas de bagaço, da ordem de 0,1 %, obteve-se 1,88 U/ml de atividade xilanásica em 8 dias de cultivo (experimento n^o.1 da TABELA XI) enquanto que com 5,3 % obteve-se 43,66 U/ml com $0,5 \times 10^6$ conídios em 8 dias (experimento n^o.2). Porém, em 2 dias nas mesmas concentrações de bagaço citadas e com 3×10^6 conídios, a atividade xilanásica aumentou de 0,04 para 6,98 U/ml. Mostrando portanto que as variáveis X_1 e X_3 tiveram efeito significativo e provavelmente seja uma das explicações para o elevado coeficiente de variação obtido neste delineamento estatístico.

As Figuras 13-A, 13-B e 13-C mostram a superfície de resposta para a produção de xilanase em relação às variáveis substrato e inóculo, inóculo e tempo, substrato e tempo respectivamente.

Na Figura 13-A o tempo foi fixado e apenas as variáveis substrato e inóculo foram avaliadas. Observa-se que à medida que a concentração de substrato é aumentada até o limite superior, a atividade xilanásica aumenta significativamente.

Na Figura 13-B o substrato foi fixado e apenas as variáveis inóculo e tempo foram analisadas. Constatou-se que à

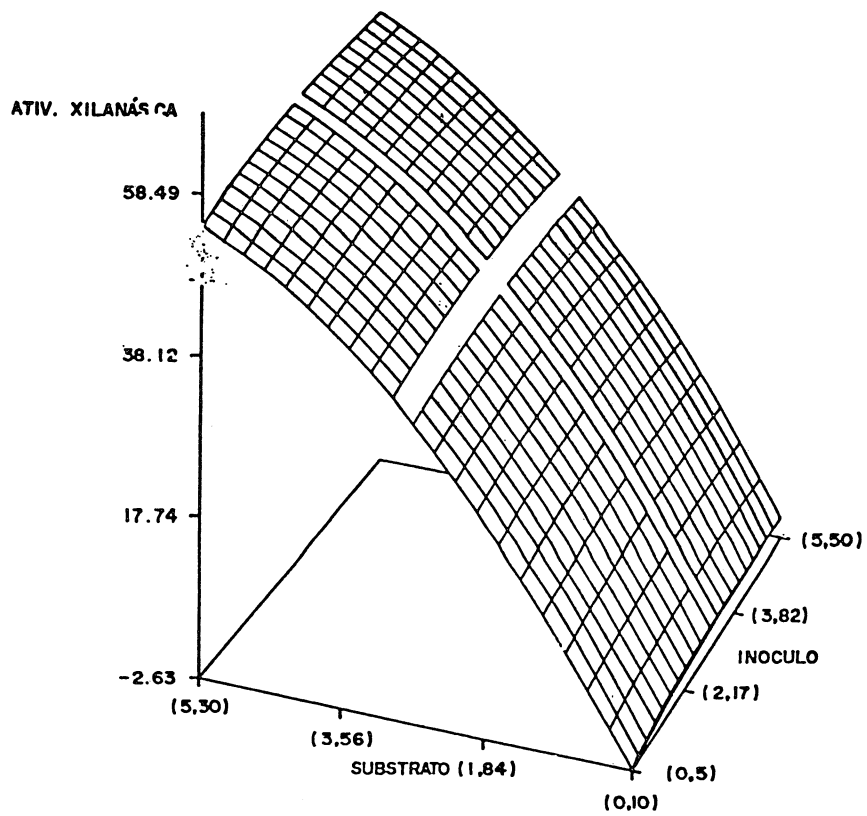


Figura 13 - A

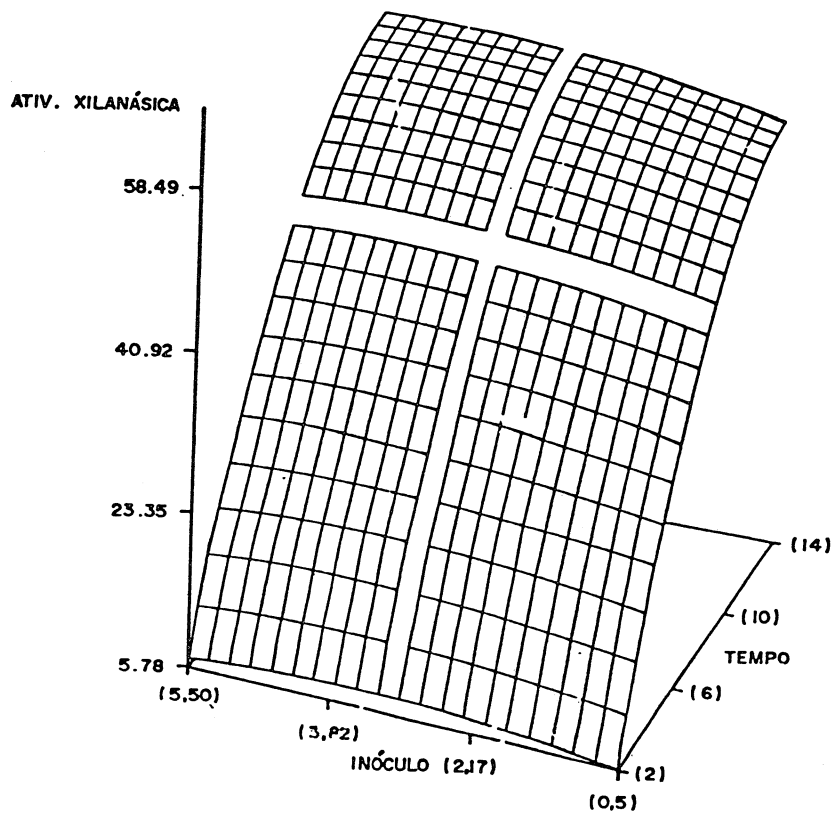


Figura 13 - B

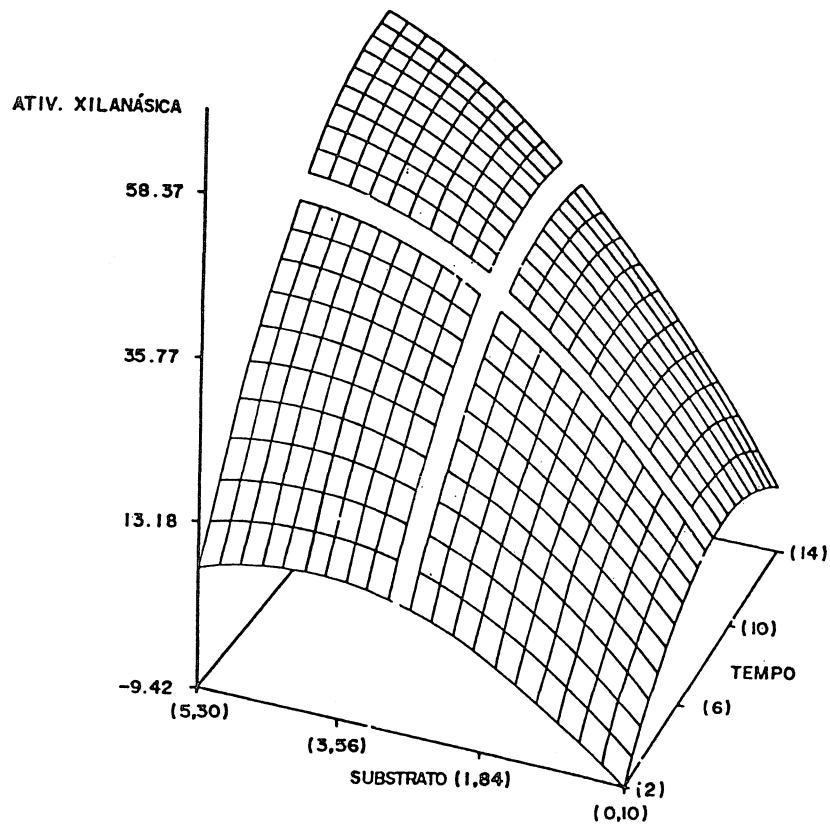


Figura 13 - C

Figura 13 : Superfície de resposta das variáveis : substrato e inóculo (13-A), inóculo e tempo (13-B) e substrato e Tempo (13-C).
Inóculo utilizado (1×10^6) conídios.

medida que aumenta-se o tempo até o limite superior do delineamento, a atividade xilanásica também aumenta significativamente.

Na Figura 13-C foi fixada a variável inóculo, analisando-se apenas o substrato e o tempo comprovando-se pela análise da superfície que a atividade xilanásica pode ser aumentada estudando-se estas duas variáveis.

Os gráficos de superfície das Figuras 13-A, 13-B

e 13-C apenas mostram as respostas em superfície dos dados obtidos na TABELA XI. Porém através do modelo preditivo se observa que é possível atingir níveis de atividade xilanásica acima daqueles obtidos experimentalmente. Este delineamento matemático também fornece uma solução para a resposta ótima. O valor crítico nesta condição foi 2,06 para x_1 (substrato = bagaço de cana), 0,99 para x_2 (inóculo) e 1,63 para x_3 (tempo). O valor preditivo ótimo estimado foi 65,8 U/ml de atividade xilanásica. Este valor de atividade pode ser considerado simplesmente uma coincidência com aquele obtido (66,0 U/ml), até então, em hemicelulose "A" isolada de bagaço, em 96 horas de cultivo deste mesmo microrganismo.

O delineamento matemático mostrando o valor crítico para $x_1 = 2,06$ significa que a quantidade de bagaço de cana deveria ser aproximadamente o dobro do limite superior estudado, o qual foi 5,3 g %. Portanto, o dobro corresponderia a uma concentração de bagaço de cana que inviabilizaria o cultivo em condição de fermentação em fase submersa, transformando-a em fase sólida. O fato de ter sido estipulado 5,3 g % de bagaço como limite superior da variável x_1 , foi porque esta é uma concentração máxima experimental de bagaço, que ainda permite movimento em agitador rotatório. O valor crítico para a variável x_2 manteve a concentração de conídios dentro do intervalo estudado, e aproximadamente no limite superior: $5,5 \times 10^6$ conídios. Para a variável x_3 o valor crítico foi 1,63 significando que o tempo de cultivo deveria ser acima de 14 dias o qual foi o limite superior estudado. Um tempo de cultivo muito longo como o proposto pela resposta ótima, aproximadamente 22 dias, inviabilizaria o processo porque as células provavelmente

teriam sofrido lise e conseqüentemente uma ou mais gerações de células teriam acontecido, dependendo da fisiologia do *Trichoderma harzianum* em estudo. Estas ponderações biológicas não são levadas em consideração em um modelo estatístico, daí a necessidade de se utilizar um delineamento com o raciocínio biológico em paralelo.

4.4.2. Avaliação da produção de celulase através da Superfície de Resposta

A produção de celulase foi analisada nos cultivos desenvolvidos nos intervalos estabelecidos para o estudo do delineamento estatístico. As respostas obtidas estão apresentadas na TABELA XV .

TABELA XV : Produção de celulase pelo *T. harzianum* (n^o.20) em bagaço de cana .

Experimentos	Condições de Cultivos			Ativ. Celulásica (U/ml)	
	[BC] (%)	inóculo x 10 ⁶	tempo (dias)	CMCase (Y ₂)	FPase (Y ₃)
01	0,1	0,5	8	0,04	0,01
02	5,3	0,5	8	0,12	0,08
03	0,1	5,5	8	0,00	0,00
04	5,3	5,5	8	0,11	0,09
05	0,1	3,0	2	0,00	0,00
06	5,3	3,0	2	0,03	0,01
07	0,1	3,0	14	0,02	0,00
08	5,3	3,0	14	0,11	0,09
09	2,7	0,5	2	0,02	0,03
10	2,7	5,5	2	0,07	0,01
11	2,7	0,5	14	0,12	0,09
12	2,7	5,5	14	0,13	0,14
13	2,7	3,0	8	0,12	0,11
14	2,7	3,0	8	0,12	0,10
15	2,7	3,0	8	0,11	0,10

Conforme pode ser visto na TABELA XV, os valores da atividade celulásica foram baixos ou não foram detectados independentemente se medidos com carboximetilcelulose ou papel de filtro. Também foram desenvolvidas as análises de variância e de regressão para estes resultados; porém, os comentários efetuados para os resultados da produção de xilanase têm correspondência para os obtidos nesta tabela. De acordo com os resultados da TABELA XV, também se observa que as variáveis substrato (bagaço de cana) e tempo de cultivo foram mais significativas enquanto que o inóculo tem efeito menor.

Pelo modelo estatístico se observou que mantendo as concentrações de conídios dentro do intervalo de 3,0 a 4,0 x 10⁶ nos 10 ml de cultivos utilizados nos experimentos, em erlenmeyer com capacidade para 50 ml, são suficientes para manter em um intervalo de confiança na qual apenas as variáveis substrato e tempo pudessem ser significativas. Consequentemente esta informação foi útil para estudar microrganismos que não apresentam boa capacidade para produzir conídios.

4.4.3 Produção de xilanase em diferentes concentrações de bagaço de cana.

Para avaliar a produção de xilanase pelo *T. harzianum* em diferentes concentrações de bagaço de cana foram desenvolvidos os cultivos utilizando-se 4,0 x 10⁶ conídios, como inóculo, e o tempo foi fixado em 96 horas visto que alguns trabalhos em fase submersa com hemicelulose como fonte de carbono citam este período de tempo para a produção desta enzima (05, 108). As concentrações de bagaço estudadas foram : 0,5 ;

1,0 ; 2,0 ; 3,0 ; 4,0 e 5,0 % . Estes cultivos foram realizados também em duplicata, porém não em paralelo. Células de 24 horas foram obtidas em meio mínimo de Vogel com xilose 1 % . O preparo dos mesmos e a inoculação foram desenvolvidos conforme descrito no item 3.2.8. Os conídios utilizados nas repetições foram obtidos de cultivos do mesmo tipo de meio e igual concentração de fonte de carbono, porém contendo 2 % de agar e em 72 horas de crescimento. O perfil de produção de xilanase nas diferentes concentrações de bagaço estudadas, foi igual, independentemente da idade, e procedência das células.

As Figuras 14 e 15 mostram o perfil da atividade xilanásica e celulásica respectivamente, nas concentrações crescentes de bagaço de cana estudadas.

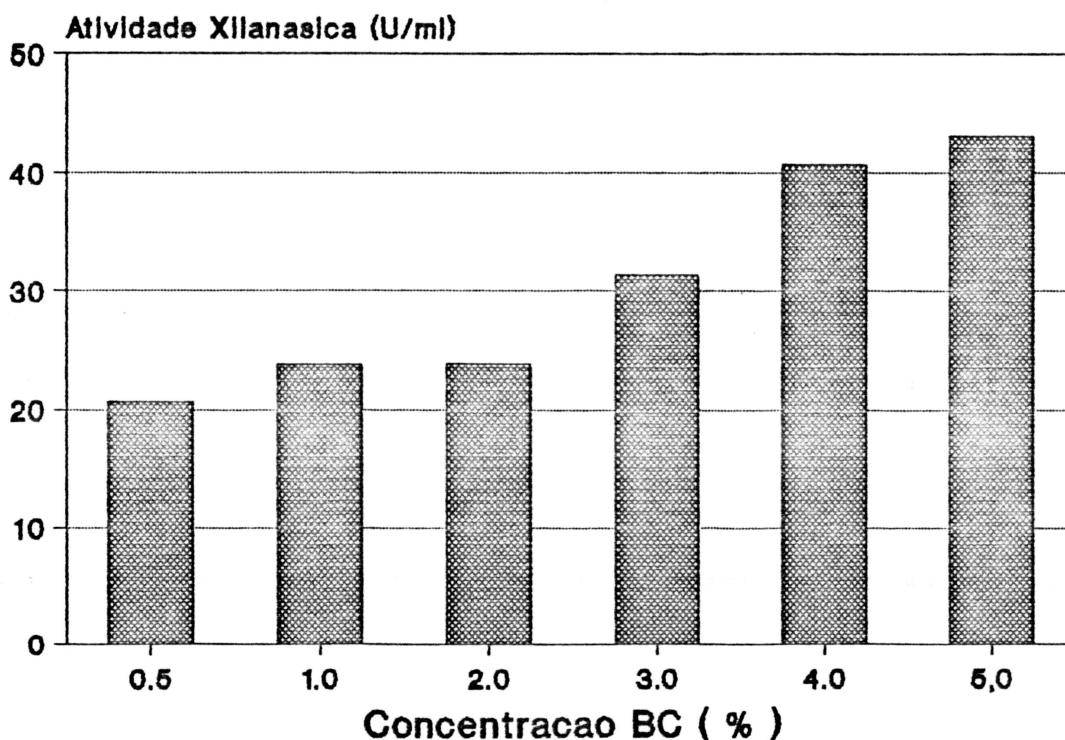


Figura 14 : Perfil da atividade xilanásica do *T. harzianum* crescido no meio mínimo de Vogel em diferentes concentrações de bagaço de cana.

Conforme pode ser verificado na Figura 14, a partir de 4,0 % (p/v) de bagaço de cana o aumento da atividade não é significativo aumentando apenas de 40,7 para 43,1 U/ml. Porém cabe salientar que 40 U/ml de atividade xilanásica foram atingidas em apenas 96 horas de cultivo em bagaço. Biswas e colaboradores em 1988 (13), embora estudando produção de xilanase em fase sólida, eles consideraram 36 U/ml viável para aplicação.

Stewart e colaboradores (127) estudaram o efeito da concentração de feno na produção de xilanase pelo *Aspergillus fumigatus* Fresenius. Concluíram que 4 % (p/v) é a concentração ótima apesar de formar uma suspensão espessa, que não movimenta livremente durante a agitação.

Na Figura 15 a atividade celulásica, medida com carboximetilcelulose atinge um platô de produção em torno de 2 % (p/v) de bagaço, enquanto que a atividade celulásica, detectada com papel de filtro, atinge em 4 % . Deve ser salientado que a atividade carboximetilcelulásica não alcançou 0,30 U/ml e a FPAsica foi inferior a 0,17 U/ml.

Nestes cultivos também foram avaliados os açúcares totais solúveis residuais bem como os redutores. Nos controles respectivos de cada concentração de bagaço, nos quais não foram inoculados o microrganismo, foi avaliada a quantidade de açúcares totais e redutores solúveis no tempo zero de cultivo como também os valores de pH inicial. Estes resultados estão mostrados nas Figuras 16, 17 e 18 .

Na Figura 16 verifica-se que à medida em que foi aumentada a concentração de bagaço de cana, a quantidade de açúcar total solúvel nos controles também foi aumentada,

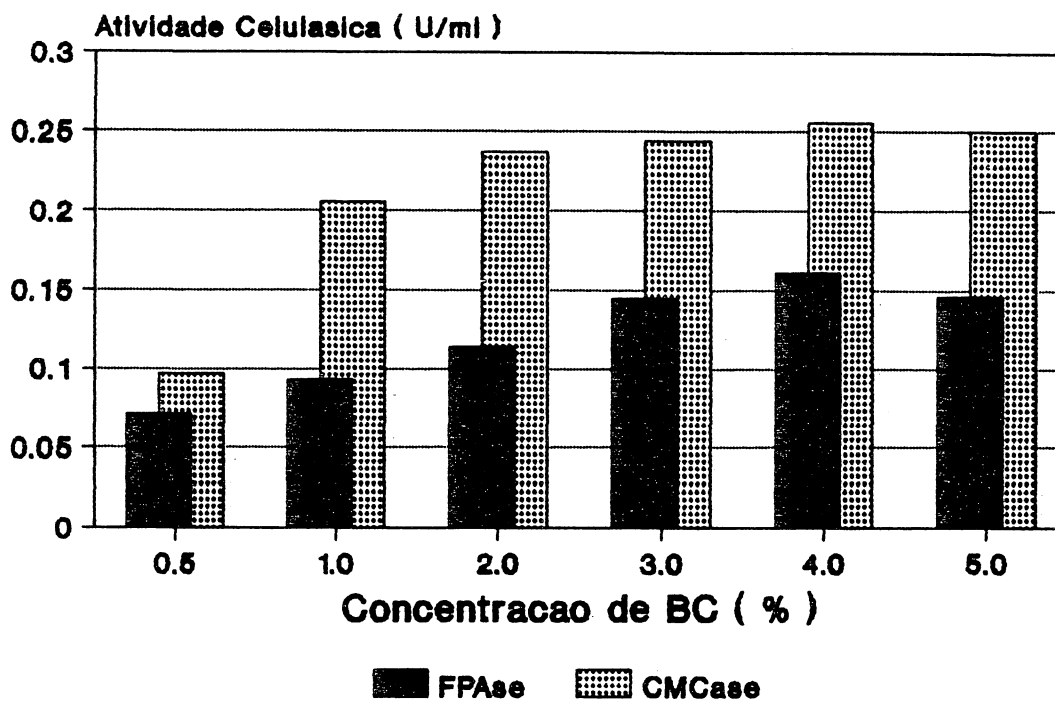


Figura 15 : Perfil da atividade celulásica do *T. harzianum* crescido no meio mínimo de Vogel em diferentes concentrações de bagaço de cana.

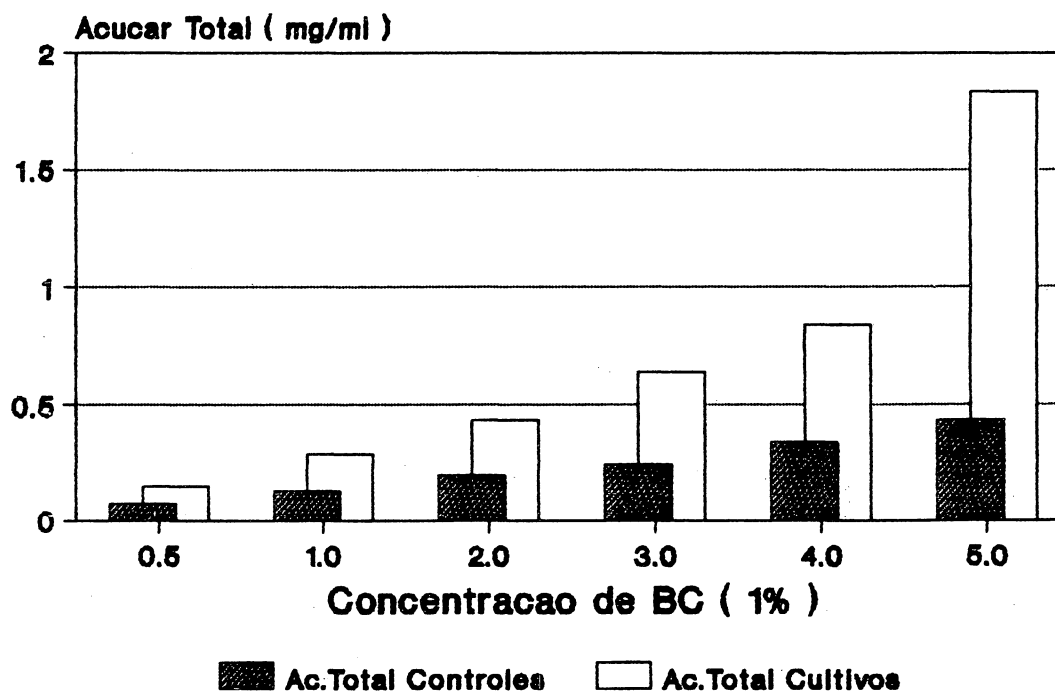


Figura 16 : Perfil da quantidade de açúcar total residual solúvel presente nos meios de cultivo do *T. harzianum* e nas diferentes concentrações de bagaço de cana.

mantendo uma diferença em torno de 0,09 mg/ml a partir da concentração de 3 g % até 5 g %. Os açúcares totais solúveis residuais nos respectivos cultivos cresceram aproximadamente 0,2 mg/ml em cada cultivo de 2,0 até 4,0 % , porém de 4,0 a 5,0 % a diferença foi de aproximadamente 1,0 mg/ml.

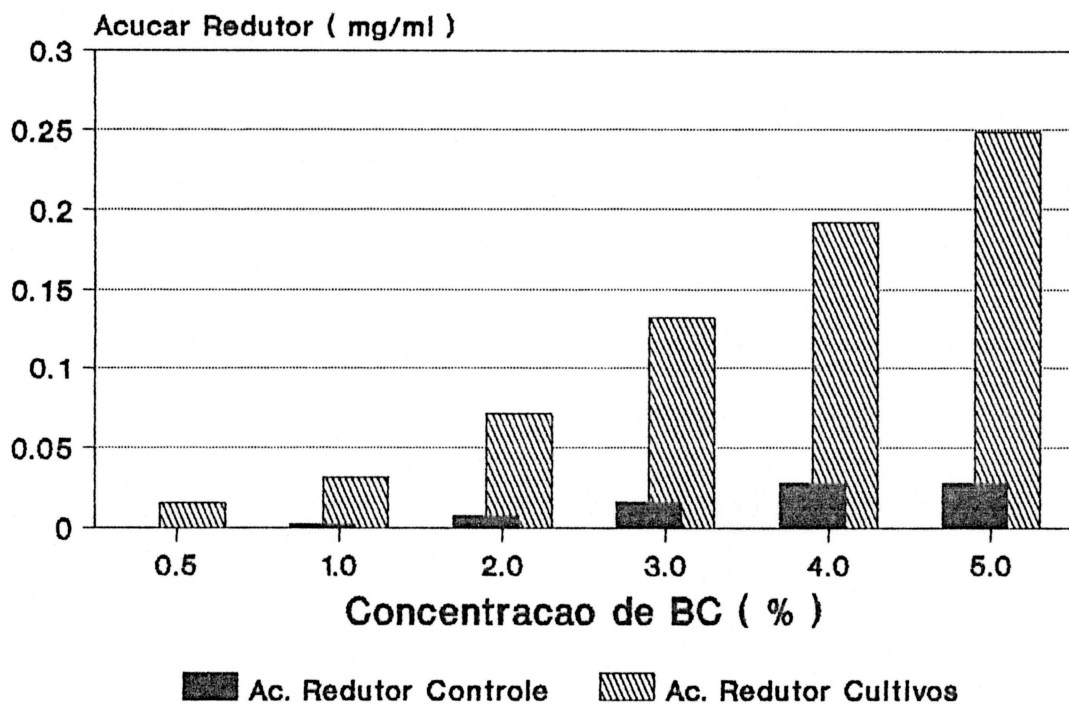


Figura 17: Perfil da quantidade de açúcar redutor residual presente nos meios de cultivo do *T.harzianum* nas diferentes concentrações de bagaço de cana.

Na Figura 17 observa-se que a quantidade de açúcar redutor não apresentou aumento proporcional nos controles

de acordo com o açúcar total residual. Apenas no cultivo com 3 % de bagaço é que foi detectado 0,016 mg/ml de açúcar redutor aumentando para 0,028 mg/ml nas concentrações de 4 a 5 %. Os açúcares redutores residuais mantiveram uma diferença de aproximadamente 0,06 mg/ml , a partir dos cultivos com 2 % de bagaço de cana. Porém apesar do aumento proporcional de açúcar redutor a partir de 3 % , a quantidade de açúcar redutor residual é muito baixa em relação ao total solúvel residual correspondendo aproximadamente 20, 23 e 13,6 % nas respectivas concentrações de 3, 4 e 5 % .

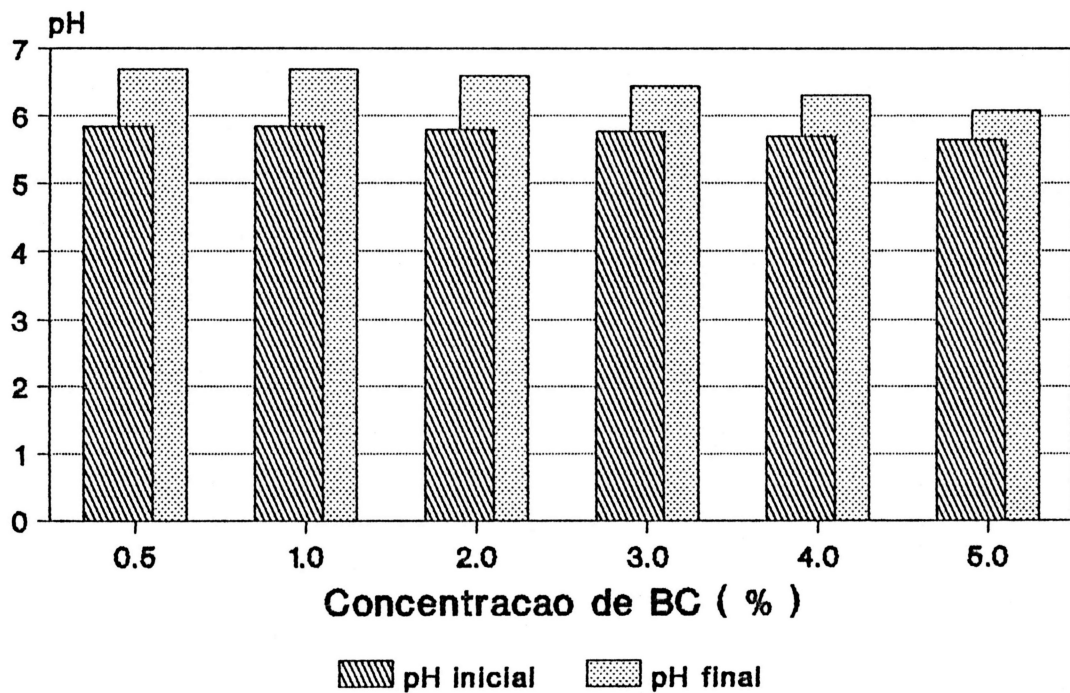


Figura 18 : Perfil da alteração do pH do cultivo do *T. harzianum* crescido nas diferentes concentrações de bagaço de cana.

Na Figura 18 constata-se que à medida em que foi acrescentado 0,5 % de bagaço de cana, o meio de Vogel cujo pH era 6,0 antes da autoclavação, caiu para 5,85. Em seguida, o pH foi diminuindo levemente até atingir 5,64 com 5 % de bagaço. Isto pode ser explicado pela auto-hidrólise ocorrida durante a autoclavação, onde os grupamentos acetil, pertencentes à hemicelulose nativa, são liberados convertendo-se em moléculas de ácido acético, catalisando a hidrólise da hemicelulose, o que foi comprovado pelo aumento do açúcar total solúvel, e, conseqüentemente, o abaixamento do pH. O pH final dos cultivos aumentou independentemente da concentração de bagaço utilizada. Porém o grau de aumento do pH variou dependendo da concentração. Para concentrações de 0,5, 1,0 e 2,0 % o aumento foi 0,85, 0,86 e 0,80 unidade respectivamente. Para as concentrações 3,0 e 4,0 % foi 0,69 e 0,61 unidade de pH. Somente para 5 % de bagaço é que o aumento do pH foi 0,45.

Através deste experimento decidiu-se por utilizar 4,5 % de bagaço de cana como concentração de substrato para o estudo da produção de xilanase, considerando que com 4 % de bagaço em 96 horas de cultivo, já é alcançado um platô de produção. Também foi considerado que abaixo de 5 % de bagaço o grau de entumescimento do mesmo, durante a autoclavação, mantém condições mais favoráveis de aeração para cultivos em fase submersa.

4.4.4 Produção de xilanase em hemiceluloses isoladas e outros resíduos lignocelulósicos.

Os resultados da produção de xilanase pelo *T.*

harzianum em 1 % de pulverizado de bagaço de cana, obtidos até o presente, são procedentes de cultivos interrompidos ao completarem 7 dias. Os dados obtidos e discutidos no item 4.4.3, indicaram 4,5 % uma concentração adequada de bagaço de cana para uma produção significativa destas enzimas. Para verificar a produção da xilanase em 96 horas, nas duas concentrações de bagaço comentadas acima, e também em hemiceluloses isoladas (hemicelulose "A" de bagaço; hemicelulose "A" de bracatinga (*Mimosa scabrella*); xilana de aveia (oat spelt); xilana de "Larch"), e outros resíduos lignocelulósicos (farelo de trigo e pulverizado de bracatinga), foram realizados os cultivos do *T. harzianum* cujos resultados estão apresentados na TABELA XVI.

O perfil da atividade xilanásica nas concentrações 4,5 % e 1,0 % pode ser observado nas Figuras 19 e 20, respectivamente.

Para o bagaço de cana como fonte indutora de xilanase, ficou evidente que 4,5 % de concentração é eficiente. A atividade β -xilosidásica (0,26 U/ml) foi a maior obtida entre todos os substratos estudados, concomitantemente com a FPase (0,13 U/ml) nesta mesma concentração de bagaço.

A hemicelulose "A" isolada de bagaço tem ação inibitória na produção de xilanase, em torno de 50 % , quando 4,5 % é utilizada como fonte indutora. Porém 1 % desta hemicelulose mostrou uma atividade de 64,0 U/ml, muito próxima daquela obtida anteriormente, citada na TABELA VIII, ou seja 66,0 U/ml.

Stewart e colaboradores (127) utilizaram como fonte de carbono para o *Aspergillus fumigatus* Fresenius, feno a 1 % ou xilana de feno em igual concentração. Verificaram que a

TABELA XVI : Produção de xilanase em 4.5 % e em 1.0 % de hemiceluloses isoladas ou resíduos lignocelulósicos

<i>T. harzianum</i> Fontes de C (*)	[BC] (%)	Atividades Enzimáticas (U/ml)			
		Xlnase	β -Xlsase	CMCase	FPase
BC	4,5	43,80	0,26	0,67	0,13
	1,0	1,76	n.d.	0,03	0,01
H"A"BC	4,5	32,46	0,07	0,14	0,01
	1,0	64,07	0,15	0,12	0,05
FTO	4,5	51,00	0,21	1,31	0,05
	1,0	34,60	0,10	0,44	0,05
FTP	4,5	32,80	0,06	1,12	0,05
	1,0	43,00	0,08	0,51	0,03
FTSA	4,5	53,46	0,07	1,10	0,02
	1,0	31,50	0,03	0,11	0,02
PMs	4,5	6,70	0,05	0,01	0,02
	1,0	0,04	0,01	0,00	0,00
H"A"Ms	4,5	35,30	0,00	0,00	0,37
	1,0	43,90	0,17	0,02	0,02
XA	4,5	28,21	0,09	0,33	0,02
	1,0	69,90	0,13	0,14	0,02
XL	4,5	34,65	0,00	1,20	0,01
	1,0	45,00	0,00	0,03	0,01

(*) Ver índice de abreviatura

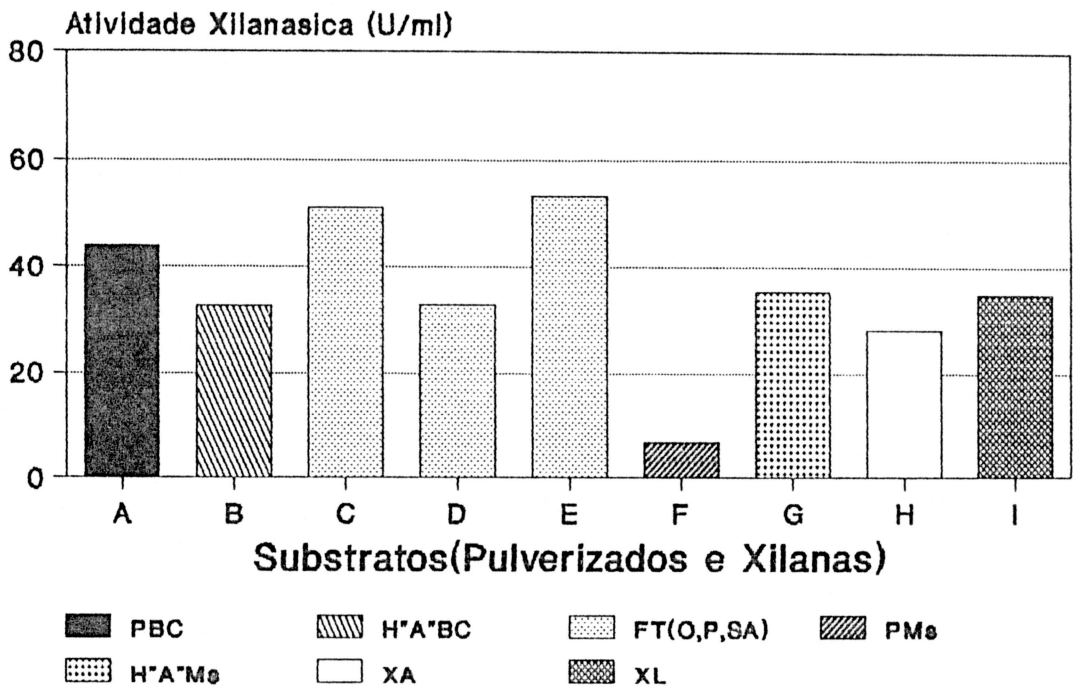


Figura 19 : Perfil da produção de xilanase pelo *T. harzianum* crescido em diferentes resíduos lignocelulósicos ou em xilanas 4,5 % (p/v).

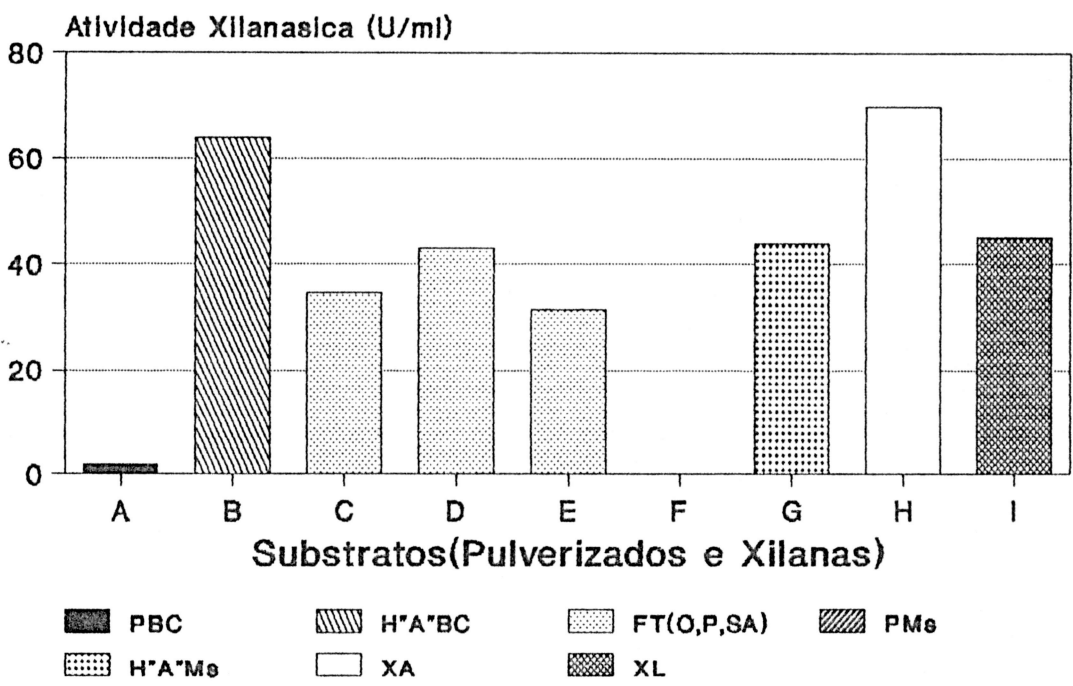


Figura 20: Perfil da produção de xilanase pelo *T. harzianum* crescido em diferentes resíduos lignocelulósicos ou em xilanas 1,0 % (p/v)

a atividade xilanásica foi quatro vezes superior quando feno foi o indutor em comparação com a xilana isolada de feno, e 1,3 vezes superior em relação à xilana de "Larch".

O farelo de trigo quando não pulverizado tem maior efeito indutor quando utilizado em concentração de 4,5 %, com atividade xilanásica de 51,0 U/ml, enquanto que com 1 % a atividade cai para 34,6 U/ml. A atividade β -xilosidásica de 0,21 U/ml foi também a maior com 4,5 %. Quando o farelo de trigo é submetido a pulverização, 1 % passa a ser a concentração mais adequada como fonte indutora em comparação com 4,5 %. Porém com 1 % de pulverizado obteve-se 43,0 U/ml, ou seja, 8 U/ml a menos do que aquela obtida com 4,5 % sem pulverização. Estes resultados indicam que o pré-tratamento físico que divide em partículas mais finas aumentam a superfície de contato favorecendo o acesso do microrganismo e conseqüentemente a indução de xilanase. Portanto com menor concentração de farelo de trigo pulverizado maior a atividade xilanásica. O efeito inibitório com 4,5 % de farelo pulverizado deve ser considerado, uma vez que foi de aproximadamente 24 %. Quando o farelo de trigo foi tratado previamente para retirar o amido, 4,5 % do pulverizado tem maior efeito indutor do que 1 %, atingindo o nível de atividade xilanásica (53,46 U/ml) próximo daquele obtido com 4,5 % do farelo sem pulverizar, ou seja, 51,0 U/ml. Contudo a produção de β -xilosidase foi inferior à obtida com o farelo original quando o mesmo foi submetido à pulverização ou tratado para retirar o amido.

Comparativamente o pulverizado de bracinga não foi um bom indutor para a produção de xilanase, independentemente se utilizado na concentração de 1 ou 4,5 %.

Embora apenas tenha confirmado que em se tratando de pulverizado nativo, 4,5 % é mais eficiente na produção de xilanase (6,7 U/ml) do que 1 % (0,04 U/ml).

A xilana de aveia se destacou como substrato para a produção de xilanase quando utilizada na concentração de 1 % . Porém o efeito inibitório é de 59,6 % quando 4,5 desta xilana é utilizada como fonte de carbono e energia para o microrganismo em estudo.

Nos cultivos com xilana de "Larch" ficou demonstrado que 1 % é a concentração mais adequada para a produção de xilanase, uma vez que 45,06 U/ml foram obtidas nesta concentração quando comparada com 34,65 U/ml obtidas em 4,5 % , apresentando um efeito inibitório de 23 % nesta última concentração.

Os valores de atividade carboximetilcelulásica mais elevados foram 1,31 , 1,12 e 1,10 U/ml em 4,5 % de farelo de trigo e 1,20 U/ml em 4,5 % de xilana de "Larch". Com exceção de 0,67 U/ml em 4,5 % de bagaço de cana, todos os outros resultados desta enzima foram inferiores a 0,4 U/ml, nas duas concentrações estudadas e fontes indutoras.

O teor de umidade de cada resíduo pulverizado e das hemiceluloses isoladas foi determinado objetivando verificar se a quantidade de água presente em cada resíduo, tinha interferido na conclusão dos resultados das concentrações mais adequadas para a indução de xilanase.

O teor de umidade de cada resíduo está especificado a seguir:

SUBSTRATOS	UMIDADE (%)
PBC	8,9
H"A"BC	15,6
FTO	13,0
FTP	12,2
FTSA	12,7
PMs	9,9
H"A"Ms	20,3
XA	15,3
XL	9,8

A ordem crescente de umidade foi: PBC < XL ~ PMs < FT < XA ~ H"A"BC.

A quantidade de água presente nos respectivos resíduos lignocelulósicos não demonstrou efeito significativo na concentração de cada um deles, conforme discutido anteriormente, uma vez que foram as concentrações elevadas de açúcares, liberados das hemiceluloses, que promoveram inibição, em diferentes graus, da produção da xilanase, apesar de o valor teórico de 4,5 % não apresentar correspondência com aqueles utilizados experimentalmente, uma vez que o teor de umidade não tinha sido descontado durante a pesagem dos respectivos substratos utilizados.

4.4.5 Comparação da produção de xilanase e celulase pelos *T. harzianum* n^o. 20 e n^o. 2333 nas fontes de carbono : glucose, xilose ou celulose.

A celulose microcristalina (Avicel) é um substrato insolúvel que quando autoclavado com o meio de cultivo

fica mais entumescida porém não é solubilizada. Para avaliar o comportamento das duas variedades de *T. harzianum* quanto a produção de xilanase e celulase, os cultivos foram desenvolvidos em 1 % de glucose ou xilose durante 96 horas ou 4,5 % de celulose microcristalina durante 7 dias. Os resultados estão apresentados na TABELA XVII.

TABELA XVII : Comparação da produção de xilanase pelos *T. harzianum* n^o. 20 e 2333 em xilose, glucose e celulose.

<i>T. harzianum</i>	n ^o . 20			n ^o . 2333		
	A. Enzimática (U/ml) Xlnase	CMCase	FPase	A. Enzimática (U/ml) Xlnase	CMCase	FPase
xilose(1%)	1,44	0,00	0,00	0,04	0,00	0,00
glucose(1%)	0,06	0,00	0,00	0,04	0,00	0,00
celulose(4.5%)	1,64	0,15	0,06	0,65	0,02	0,01

Atividade xilanásica de 1,44 U/ml foi detectada apenas para o *T. harzianum* n^o. 20 quando crescido em xilose. A atividade desta enzima foi insignificante quando o mesmo foi cultivado em glucose e de igual proporção para o *T. harzianum* n^o. 2333 cultivado em ambas as fontes de carbono. Atividade celulásica não foi detectada nos cultivos com glucose ou xilose das duas variedades estudadas.

A glucose e a xilose são citadas como fontes repressoras da produção de xilanase (09, 34). Leathers e colaboradores (80, 81)selecionaram linhagens de *Aureobasidium pullulans* que produziram xilanases quando crescidas em xilose.

Porém para todas as linhagens a produção de xilanases foi reprimida pela glucose.

Os resultados da TABELA XVII estão de acordo com os encontrados por Leathers e colaboradores (80).

Quando ambos os microrganismos foram cultivados em celulose, a atividade xilanásica do *T. harzianum* n^o. 20 foi 1,64 U/ml enquanto que a do n^o.2333 foi 0,65 U/ml. Atividade da CMCase e da FPAse foi 0,15 U/ml e 0,06 U/ml respectivamente para o *T. harzianum* n^o. 20 enquanto que para o n^o.2333 foi 0,02 e 0,01 U/ml respectivamente.

Embora os resultados tenham mostrado uma diferença acentuada de ambas as variedades de *T. harzianum* , a dúvida de ter sido detectada atividade xilanásica procedente do interior da célula, devido a possível ocorrência de lise celular em 96 horas de cultivo em xilose, foi evidenciada. Porém ao mesmo tempo foi levantada a hipótese de que a xilose poderia atuar como fonte de carbono indutora de xilanase para o *T. harzianum* n^o. 20 , enquanto que a glucose seria repressora. Para o *T. harzianum* n^o.2333 as fontes seriam indiferentes.

A celulose, confirmou a sua atuação como fonte indutora de xilanase demonstrando que para diferentes linhagens de um mesmo gênero e espécie a resposta pode ser diferente em uma única condição de cultivo. Estes resultados também estão de acordo com as afirmações de Biely (09) de que celulases são produzidas junto com xilanase. Porém a razão para a produção de xilanases específicas em celulose não está clara.

4.4.6 Comparação da Produção de Xilanase e β - Xilosidade em xilose 1 % entre o *T. harzianum* n^o. 20 e os outros nove microrganismos xilanolíticos.

Uma vez que foi detectada atividade xilanásica quando o *T. harzianum* foi crescido em xilose 1 % em 96 horas, optou-se por comparar a produção de xilanase e β -xilosidase durante 72 horas, por parte deste microrganismo e dos outros nove xilanolíticos selecionados previamente. Estes resultados estão apresentados na TABELA XVIII .

A TABELA XVIII mostra a média dos resultados obtidos quando os dez microrganismos xilanolíticos foram cultivados durante 72 horas.

TABELA XVIII: Comparação da produção de xilanase e β -xilosidase em xilose 1 % pelos 10 microrganismos xilanolíticos selecionados.

Microrg. n ^o .	Atd. Enzimática (U/ml)				Aç.Redutor (mg/ml)	pH [*] final
	Xlnase	β -xlsase	CMCase	FPase		
20	3,40	0,00	0,00	0,00	0,06	6,80
14	3,16	0,03	0,01	0,01	0,14	5,60
15	2,85	0,04	0,01	0,00	0,06	6,83
38	0,04	0,00	0,00	0,00	n.d.	4,40
53	1,16	0,20	0,01	0,00	0,05	5,92
49	0,65	0,15	0,02	0,01	0,10	5,66
54	0,27	0,01	0,01	0,00	0,03	6,13
16	0,34	0,00	0,02	0,00	0,02	6,93
58	0,21	0,03	0,00	0,00	0,03	6,42
05	0,62	0,00	0,00	0,00	0,04	7,05

*pH inicial = 6,0

O *T. harzianum* (n^o. 20) apresentou neste cultivo, 3,40 U/ml de atividade xilanásica. O *T. harzianum* n^o.14 também apresentou atividade de 3,16 U/ml seguido pelo *T. viride* n^o.15, 2,85 U/ml; *T.aureo-viride* n^o.53, 1,16 U/ml e o *T. aureo-viride* n^o.49 , 0,65 U/ml. As espécies *pseudokoningii*, os gêneros *Rhizopus* e *Aspergillus* apresentaram atividade xilanásica inferior a 0,5 U/ml. Neste experimento ficou evidente o potencial xilanolítico do *T. harzianum* seguido pelo *T. viride* conforme tinha sido observado anteriormente nos cultivos em hemicelulose "A" isolada de bagaço de cana, cujos resultados estão na TABELA VI. Por outro lado, estes resultados podem estar indicando que, para estes microrganismos, a xilose atua como indutora de xilanases . Por outro lado, as xilanases podem ser constitutivas para eles conforme citado por Leathers e colaboradores (79, 81)para a linhagem de *Aureobasidium pullulans* produtora de xilanase em xilose.

Atividade β -xilosidásica foi mais acentuada para o *Trichoderma aureo-viride* sendo 0,20 U/ml para o n^o.53 e 0,15 U/ml para o n^o.49.

Atividade Celulásica não foi detectada ou foi insignificante para os microrganismos estudados nestas condições, independentemente se determinada com carboximetilcelulose ou papel de filtro.

4.4.7 *Trichoderma harzianum* (n^o. 20) em bagaço de cana 4,5 % e os outros nove microrganismos selecionados.

4.4.7.1 No meio mínimo de Vogel

A TABELA XIX mostra a média dos resultados das atividades da xilanase, β -xilosidase, CMCase, FPase, amilase e pectinase dos dez microrganismos xilanolíticos em um meio de cultivo simples utilizado na grande maioria dos experimentos realizados neste trabalho.

TABELA XIX : Comparação da produção de xilanase e outras hidrolases em bagaço de cana 4,5 % no meio mínimo de Vogel.

Micrgrs. n ^o .	Atividade Enzimática (U/ml)					
	Xlnase	β -Xlsase	CMCase	FPase	Amilase	Pectinase
20	42,0	0,21	0,50	0,10	0,09	0,13
14	37,4	0,17	0,42	0,10	0,11	0,16
15	34,4	0,19	0,47	0,12	0,10	0,06
38	44,2	0,28	0,57	0,20	0,03	0,05
53	35,6	0,42	0,52	0,12	0,05	0,22
49	42,0	0,60	0,57	0,19	0,05	0,42
54	42,8	0,13	0,50	0,20	0,08	0,10
16	31,6	0,30	0,48	0,12	0,03	0,08
58	27,6	0,24	0,40	0,10	0,16	0,41
05	22,8	0,24	0,41	0,11	0,03	0,07

Estes resultados comprovam o potencial dos microrganismos xilanolíticos, previamente selecionados, mostrando o potencial dos mesmos na concentração de bagaço de cana otimizada anteriormente. O gênero *Trichoderma* demonstrou

significativamente nos cultivos de todos os microrganismos estudados, mostrando que a presença de extrato de levedura, extrato de malte e de peptona reprimiram a síntese de xilanase quando comparados com os níveis alcançados no meio de Vogel. Para as espécies do gênero *Trichoderma* a repressão média foi 99,2 % enquanto que para o *Aspergillus fumigatus* foi 60,57 % . Para o *Rhizopus oryzae* n^o. 58 a repressão ficou em 72,8 % enquanto que para o n^o. 05 ficou em 27,1 % , sendo este último o microrganismo mais indiferente à presença de fonte de nitrogênio. Porém todos os resultados obtidos revelam que a síntese de xilanase é reprimida na presença de quantidade significativa de nitrogênio, em graus variados dependendo do microrganismo em estudo. Embora as xilanases não tenham sido citadas por Priest (142) quando explica sobre regulação da síntese de enzima extracelular, os resultados obtidos podem ser explicados pela repressão catabólica de nitrogênio, exemplificada pelo referido autor para outras hidrolases.

A repressão da produção de xilanase no meio de YM confirmam os resultados obtidos por Simpson (123), quando testou diferentes fontes de nitrogênio para o *Trichoderma viride* e *Aspergillus niger*. Simpson constatou que o grau de repressão varia para ambos os microrganismos dependendo da fonte de nitrogênio estudada (extrato de levedura, extrato de malte, gelatina ou caldo de milho). Porém, generalizou que a fonte de nitrogênio, utilizada no meio basal, afeta mais a produção de pentosanases pelo *Trichoderma viride* do que pelo *Aspergillus niger*.

TABELA XX : Comparação da produção de xilanase e outras hidrolases em bagaço de cana 4,5 % no meio de YM.

Microorganismos		Atividade Enzimática (U/ml)			
n ^o .	Nome	Xlnase	β -Xlisdase	CMCase	FPase
20	<i>T. harzianum</i>	0,29	0,00	0,00	0,00
14	<i>T. harzianum</i>	0,12	0,00	0,01	0,04
15	<i>T. viride</i>	0,15	0,00	0,00	0,00
38	<i>T. pseudokoningii</i>	0,43	0,03	0,00	0,00
53	<i>T. aureo-viride</i>	0,40	0,00	0,00	0,03
49	<i>T. aureo-viride</i>	0,46	0,00	0,01	0,03
54	<i>T. pseudokoningii</i>	0,21	0,00	0,03	0,06
16	<i>A. fumigatus</i>	12,46	0,33	0,12	0,21
58	<i>R. oryzae</i>	7,50	0,08	0,05	0,31
05	<i>R. oryzae</i>	16,63	0,22	0,30	0,50

A β -xilosidase teve também sua síntese reprimida na grande maioria das espécies do gênero *Trichoderma* selecionados. Para o *Aspergillus fumigatus*, quando comparado com a atividade de 0,30 U/ml obtida no meio de Vogel, esta enzima não foi reprimida no meio de YM, cuja atividade foi 0,33 U/ml. A síntese de β -xilosidase pelo *Rhizopus oryzae* foi reprimida mais acentuadamente (66,6 %) para o n^o. 58 e praticamente não houve repressão para o n^o. 05 .

A síntese de celulase também foi inibida em níveis significativos para as diferentes espécies do gênero *Trichoderma* e em níveis menores para o *A. fumigatus*, *R. oryzae* n^o. 58 e parece não ter sido afetada para o *Rhizopus oryzae* n^o. 05.

4.4.8 Curva de crescimento do *T. harzianum* n^o. 20 em xilose 1 % durante 240 horas

Para acompanhar a produção de xilanase pelo *T. harzianum* em xilose, estes cultivos foram desenvolvidos em quadruplicata com quantidade conhecida e significativa de células para determinar o tempo em que ocorre a secreção da xilanase. Os resultados estão apresentados na TABELA XXI e nas Figuras 21 e 22.

A TABELA XXI e Figura 21 mostram que 1,67 U/ml de atividade xilanásica foi detectada em 48 horas de cultivo e após 72 horas foi mantido um platô até 44 horas. A partir de 168 horas houve um novo aumento desta atividade enzimática que atingiu 6,53 U/ml em 216 horas e novamente caiu para 3,16 U/ml em 240 horas, tendo sido comprovado através dos resultados da atividade específica.

Este experimento, uma vez desenvolvido em quadruplicata, comprovou a presença de xilanase extracelular indicando ser procedente de secreção fisiológica deste microrganismo.

O perfil da secreção de proteína solúvel no meio de cultivo (Figura 21) apresentou um aumento a partir de 24 horas até 72 horas e em seguida foi mantido constante até 240 horas.

O pH do meio de cultivo apresentou uma queda significativa em 48 horas coincidindo com o pico de produção de biomassa micelial e a detecção de 1,7 U/ml de atividade xilanásica. Em seguida o pH voltou a subir para 6,0 em 72 horas, atingiu 6,2 em 120 horas e permaneceu neste valor até 240 horas.

TABELA XXI : Produção de xilanase pelo *T. harzianum* n^o.20 em xilose 1 % durante 240 horas.

Tempo (h)	Xlnase		σ	At. específica		σ
	(U/ml)	Méd.		Méd.		
24	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	0,00					
	0,00					
	0,00					
48	1,80	1,67	0,11	20,00	17,10	1,98
	1,62					
	1,70					
	1,55					
72	2,19	2,24	0,12	8,40	8,80	0,67
	2,23					
	2,13					
	2,42					
96	2,10(*)	2,11	0,25	8,40(*)	8,30	0,38
	2,39					
	1,90					
	2,05					
120	2,12	2,19	0,12	8,10	7,90	0,53
	2,12					
	3,02(*)					
	2,33					
144	1,35(*)	2,51	0,26	5,40(*)	9,20	0,58
	2,38					
	2,34					
	2,81					
168	2,44	2,70	0,24	8,70	9,50	0,73
	3,13(*)					
	2,84					
	2,84					
192	3,20(*)	3,90	0,20	11,80(*)	15,20	1,79
	3,70					
	3,90					
	4,10					
216	4,20(*)	6,53	1,22	18,20(*)	26,30	3,23
	6,80					
	5,20					
	7,60					
240	3,10	3,16	0,21	11,50	11,50	0,50
	3,00					
	3,40					
	2,50(*)					

(*) Não computado na determinação da média.

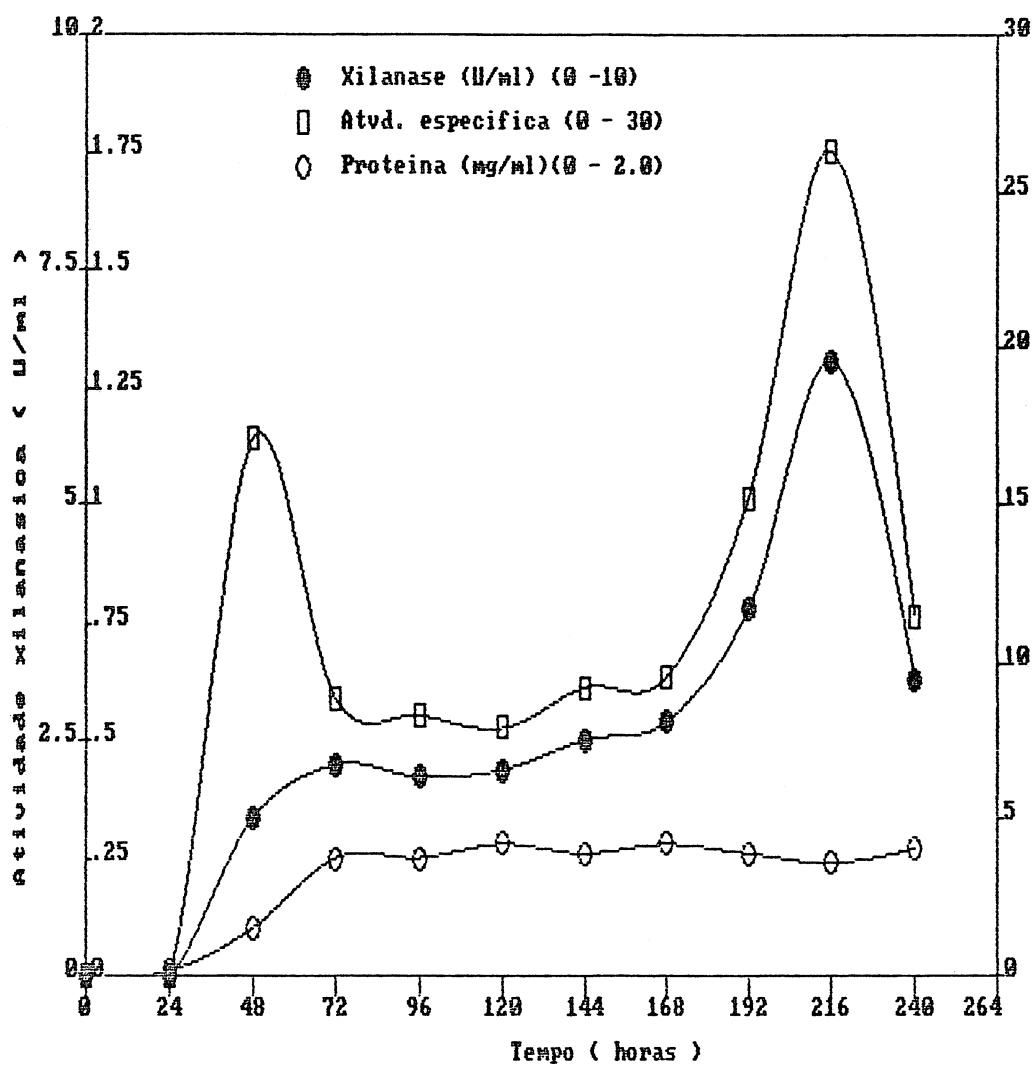


Figura 21 : Produção de xilanase pelo *T. harzianum* cultivado em xilose 1 % durante 240 horas

n^o. 20

TABELA XXII : Crescimento do *T.harzianum* n^o. 20 em xilose 1 % durante 240 horas.

Tempo (h)	Biomassa			Aç. Redutor		
	(mg)	Méd.	σ	(mg/ml)	Méd.	σ
24	4,50(*)			7,75(*)		
	7,90	10,30	2,20	6,56	7,54	1,00
	11,00			8,56		
	12,20			7,52		
48	211,20			0,01		
	205,10	208,57	2,57	0,01	0,01	0,00
	208,50			0,01		
	209,50			0,01		
72	119,00			0,02		
	108,80	114,26	5,14	0,01	0,01	0,00
	115,00			0,01		
	120,20			0,02		
96	120,20(*)			0,02		
	92,20	93,10	4,32	0,02	0,02	0,00
	89,30			0,01		
	97,80			0,02		
120	95,40			0,01		
	89,10	93,90	4,33	0,02	0,01	0,00
	97,40			0,01		
	n.d.			0,01		
144	89,60(*)			0,01(*)		
	91,40	92,26	0,75	0,01	0,01	0,00
	92,60			0,02		
	92,80			0,02		
168	85,20			0,02		
	96,40(*)	84,60	3,04	0,02(*)	0,02	0,00
	87,30			0,02		
	81,30			0,02		
192	83,60(*)			0,02(*)		
	84,50	90,16	5,37	0,02	0,02	0,00
	90,80			0,02		
	95,20			0,02		
216	96,60(*)			0,02(*)		
	100,40	94,20	5,37	0,02	0,02	0,00
	91,20			0,02		
	91,00			0,02		
240	92,20			0,01		
	121,70	87,06	4,50	0,01	0,01	0,00
	85,20			0,01		
	83,80(*)			0,01(*)		

(*) Não computado na determinação da média.
n.d. não determinado

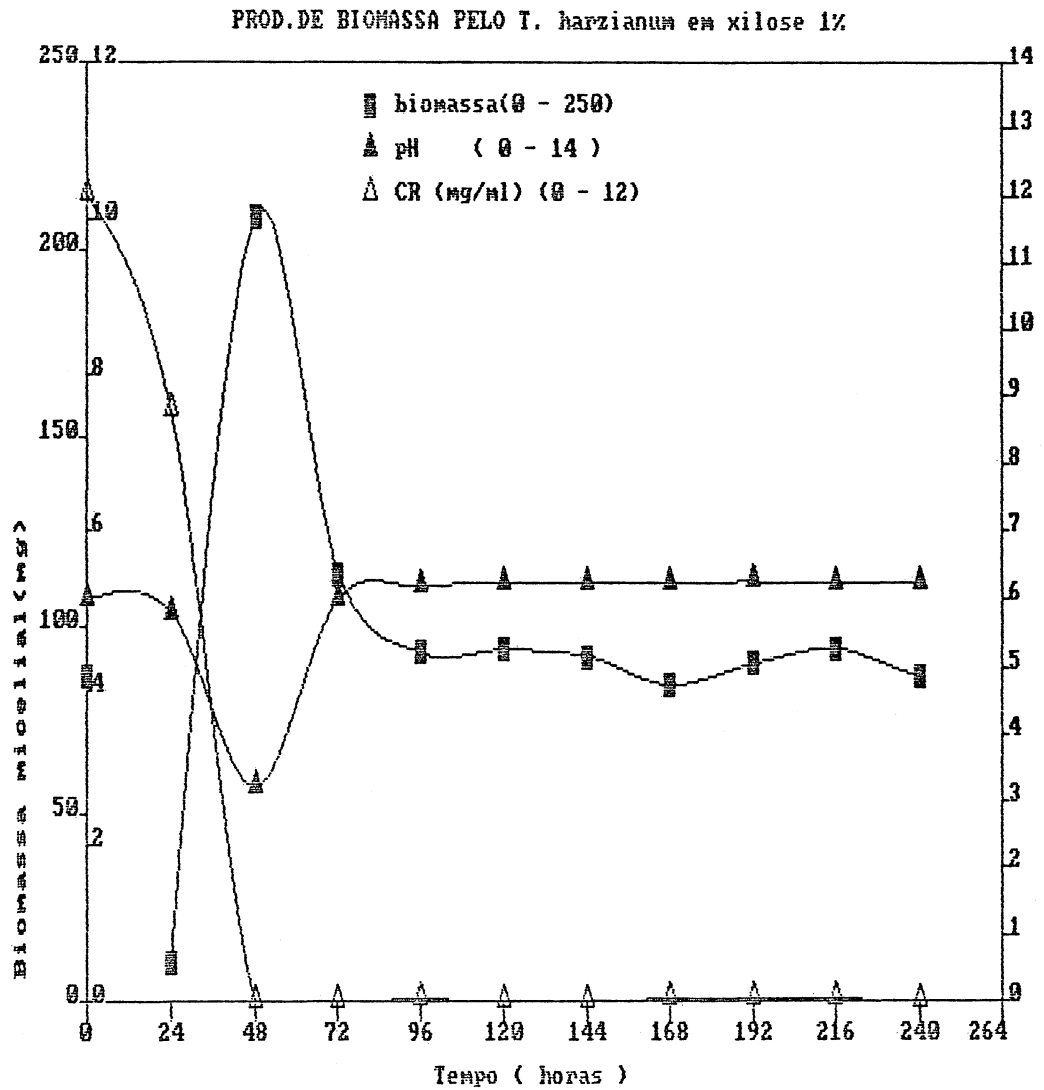


Figura 22 : Produção de biomassa pelo *T. harzianum* n°20 em xilose 1 % durante 240 h.

A queda do pH em 48 horas (Figura 22) pode ser explicada pelo consumo da fonte de nitrogênio do meio de cultivo, considerando que neste mesmo período de tempo está ocorrendo intensa síntese proteica, comprovada pelo resultado da biomassa microbiana e possivelmente pela secreção de xilanase detectada neste mesmo período.

Em 48 horas de cultivo a fonte de carbono tinha sido praticamente consumida, coincidindo com a maior produção de biomassa (208,6 mg). Em 72 horas a quantidade de biomassa diminuiu para 116 mg, possivelmente pelo metabolismo das reservas energéticas do microrganismo.

Van Zyl (136) estudando produção de celulases por três actinomicetos crescidos em bagaço de cana, constatou uma queda no pH durante as primeiras horas para os três microrganismos estudados (*Streptomyces albogriseolus*, *S. nitrosporeus* e *Micromonospora melanospora*). Considerou que a mudança do pH foi provavelmente pela utilização consecutiva de íons NH_4^+ e NO_3^- do meio de cultivo, uma vez que actinomicetos são altamente oxidativos e não liberam ácidos no meio de cultivo.

Buchert e colaboradores (18) relataram que a xilose pode ser convertida em ácidos orgânicos, como por exemplo o ácido xilônico, formado pela oxidação direta da xilose. Entre os gêneros citados estão os de algumas bactérias (*Acetobacter sp*, *Enterobacter cloacea*, etc), levedura (*Pichia quercuum*) e fungos (*Fusarium lini*, *Penicillium corylophilum*). Portanto, não pode ser descartada a possibilidade de o abaixamento do pH, nas 48 horas de cultivo do *T. harzianum*, ser decorrente da síntese de ácidos orgânicos.

TABELA XXIII : Produção de proteína extracelular e variação do pH durante 240 h. nos cultivos do *T.harzianum* em xilose 1 % .

Tempo (h)	Proteína			pH		
	(mg)	Méd.	σ		Média	σ
24	0,01	0,01	0,00	5,80	5,82	0,03
	0,01			5,80		
	0,01			5,85		
	0,01			5,85		
48	0,09	0,10	0,10	3,25	3,21	0,07
	0,10			3,25		
	0,10			3,25		
	0,10			3,10		
72	0,26	0,25	0,00	6,00	6,02	0,03
	0,25			6,05		
	0,26			6,00		
	0,25			6,05		
96	0,25(*)	0,25	0,01	6,20(*)	6,21	0,02
	0,27			6,25		
	0,24			6,20		
	0,25			6,20		
120	0,26	0,28	0,01	6,25	6,25	0,04
	0,29			6,30		
	0,28(*)			6,25(*)		
	0,28			6,20		
144	0,25	0,26	0,02	6,20	6,24	0,02
	0,25(*)			6,25(*)		
	0,27			6,25		
	0,29			6,25		
168	0,28	0,28	0,00	6,25	6,26	0,02
	0,29(*)			6,25(*)		
	0,29			6,25		
	0,28			6,30		
192	0,27(*)	0,26	0,02	6,30	6,28	0,02
	0,28			6,30		
	0,24			6,25		
	0,25			6,25		
216	0,23(*)	0,24	0,02	6,25	6,25	0,00
	0,24			6,25		
	0,23			6,25		
	0,27			6,25		
240	0,27	0,27	0,00	6,25	6,25	0,00
	0,27			6,25		
	0,28			6,25		
	0,28(*)			6,25		

(*) Não computado na determinação da média.

4.4.9 Mutagênese do *T. harzianum* (n^o. 20)

Uma vez comprovada a capacidade xilanolítica do *T. harzianum* (n^o. 20) nas diferentes fontes de carbono lignocelulósicas, como também no monômero constituinte da hemicelulose predominante na maioria destas fontes, ou seja, a xilose, optou-se por induzir uma modificação genética no referido microrganismo, utilizando como agente raios ultra-violeta, numa tentativa de melhorar a atividade xilanásica e β -xilosidásica e reprimir a celulásica. Os conídios irradiados temporariamente e diluídos foram transferidos para placas contendo bagaço de cana 1 % conforme descrito no item 3.2.10.

Cinqüenta e oito mutantes sobreviventes em uma das placas cujos esporos tinham sido irradiados durante três minutos e diluídos 1:1000, foram convenientemente isolados conforme descrito no item 3.2.10 . Cada um dos mutantes denominados pelos números correspondentes de 1 a 58 foram transferidos para placas contendo meio mínimo de Vogel e 0,2 % de hemicelulose "A" isolada de bagaço de cana. O diâmetro da colônia resultante de 48 horas de cultivo bem como o halo de atividade observado após a adição de lugol diluído em CaCl₂ saturado, estão apresentados na TABELA XXIV . Nesta TABELA também estão apresentados os resultados das atividades da xilanase e da celulase de cada meio de cultivo dos respectivos mutantes crescidos em 4,5 % de bagaço de cana durante 96 horas.

Os 58 mutantes estudados tiveram a morfologia significativamente alterada. Observou-se que a coloração de todos eles tornou-se cinza azulado quando comparada com a da linhagem selvagem que é verde intenso. Durante os repiques com a

alça de "platina" a aderência dos conídios dos mutantes também estava alterada, uma vez que eles fixavam-se com maior ou menor intensidade na alça, em comparação com a linhagem que lhes deu origem. A alteração morfológica ocorrida explica o porque da queda significativa da atividade das xilanases e celulasas. Porém não é possível explicar com precisão através destes resultados, a que nível, dentro da célula, a síntese foi afetada uma vez que houve variação desde 0,00 U/ml (Mu n^o. 05) à 4,08 (Mu n^o. 56). Portanto não pode ser respondido se houve síntese porém não a secreção de xilanases pelo mutante n^o. 05 ou se foi alterado o gene produtor de xilanase, causando diminuição da produção desta hidrolases como no caso do mutante n^o. 56.

O diâmetro da colônia medido em 48 horas, antes da adição de lugol com CaCl₂, mostrou a capacidade de crescimento do microrganismo na hemicelulose "A" isolada de bagaço. Ao mesmo tempo em que estes dados mostraram que estes mutantes podem ou não se desenvolver nesta hemicelulose, eles podem ou não produzir xilanase quando crescidos em bagaço de cana. Como por exemplo pode ser citado o Mu n^o. 05 que apresentou 2,1 cm de halo da colônia em 48 horas, porém não produziu xilanase em bagaço de cana em 96 horas de cultivo. Outro exemplo é o Mu n^o. 10 que não se proliferou (n.c.) em 48 horas, porém em bagaço de cana apresentou 0,54 U/ml de atividade xilanásica.

O halo de atividade enzimática pode ser expresso em termos de distância em centímetro entre os limites periféricos de descoloração da xilana (halo de hidrólise). Foi a proliferação do microrganismo e conseqüentemente secreção e ação da xilanase que promoveu o desaparecimento da interação do

TABELA XXIV :Atividade xilanásica e celulásica do *Trichoderma harzianum* n^o. 20 e dos 58 mutantes

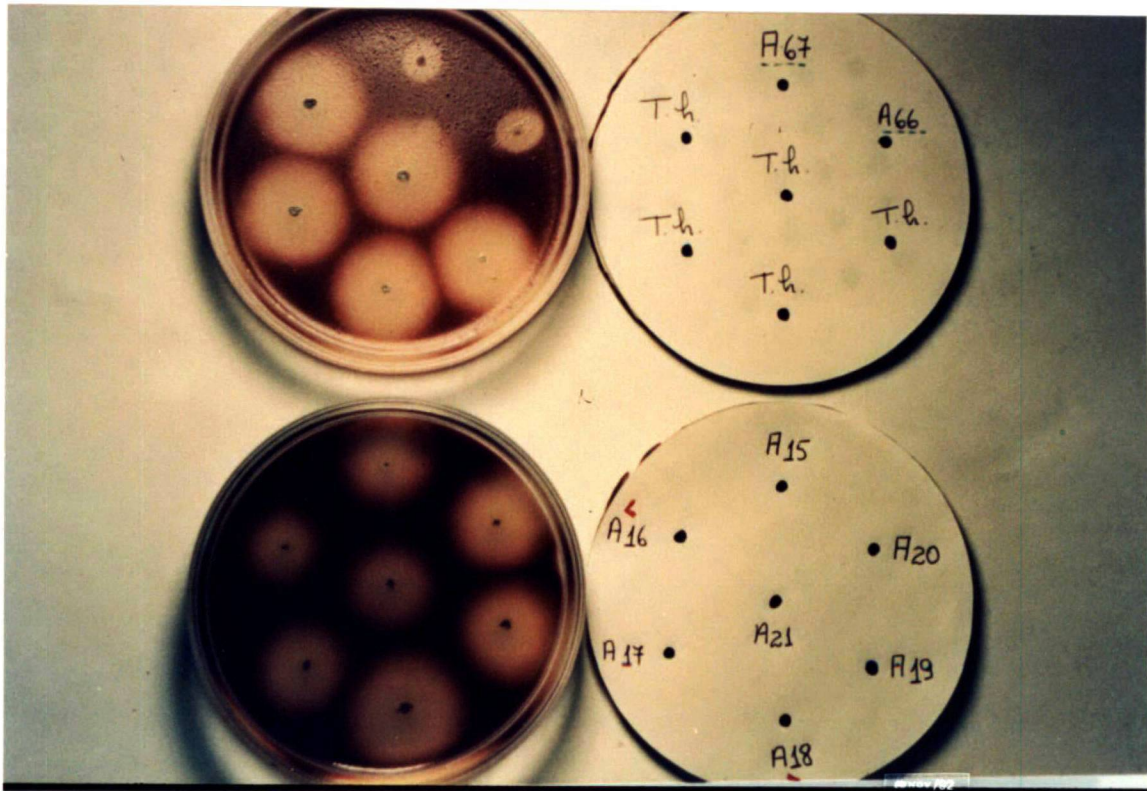
	Diâmetro da colônia(cm) 48 h.	Halo de ativid. enzimática(cm) 48 h.	Ativd. Enzimática Xlnase 96 h.	FPase 96 h.
<i>T.h.</i>	2,9	2,9	42,00	0,10
Mut.N^o.				
01	n.c.	n.c.	0,72	0,00
02	1,8	2,2	0,31	0,00
03	2,1	2,5	0,89	0,00
04	2,1	2,6	0,32	0,00
05	2,1	2,7	0,00	0,00
06	1,9	2,3	0,83	0,00
07	1,9	2,4	0,60	0,00
08	1,3	2,5	0,54	0,00
09	1,9	2,7	0,62	0,00
10	n.c.	0,5	0,54	0,00
11	1,8	2,5	1,56	0,00
12	1,6	2,2	1,29	0,00
13	1,6	2,5	0,54	0,00
14	1,8	2,4	2,44	0,00
15	0,9	2,2	2,50	0,00
16	n.c.	n.c.	2,34	0,00
17	2,0	2,8	0,33	0,00
18	2,0	3,0	2,36	0,00
19	2,0	3,1	2,40	0,00
20	1,8	3,0	2,41	0,00
21	1,8	2,5	0,51	0,00
22	1,5	2,0	0,41	0,00
23	2,3	3,1	0,27	0,00
24	1,9	2,3	0,49	0,00
25	2,1	1,9	0,17	0,00
26	2,3	3,2	0,40	0,00
27	1,8	2,0	1,70	0,00
28	n.c.	n.c.	0,20	0,00
29	2,1	2,6	1,05	0,00
30	1,9	2,5	0,61	0,00
31	2,1	3,0	1,09	0,00
32	n.c.	n.c.	0,46	0,00
33	n.c.	n.c.	1,10	0,00
34	1,8	2,4	0,39	0,00
35	1,8	2,1	1,50	0,00
36	1,3	2,0	0,29	0,00
37	1,4	2,2	0,41	0,00
38	1,6	2,1	1,20	0,00
39	n.c.	0,3	0,44	0,00
40	1,8	2,1	n.d.	n.d.
41	2,2	2,9	0,48	0,00
42	2,4	3,2	0,29	0,00
43	1,9	3,1	0,29	0,00
44	2,1	3,2	0,55	0,00
45	1,7	3,0	1,02	0,00

TABELA XXV : Continuação

46	1,7	2,7	0,59	0,00
47	n.c.	0,4	0,01	0,00
48	2,2	4,0	0,33	0,00
49	1,8	2,8	0,56	0,00
50	2,1	3,0	0,02	0,00
51	2,1	2,9	0,41	0,00
52	2,1	3,0	0,24	0,00
53	n.c.	0,3	0,22	0,00
54	2,7	4,0	0,19	0,01
55	2,9	3,6	3,27	0,10
56	1,8	2,7	4,10	0,15
57	1,8	2,7	0,26	0,00
58	1,6	2,5	1,22	0,01

iodo com a xilana, revelada pela adição de lugol em CaCl_2 , mostrando um halo claro, incolor, contrastando com a coloração "vinho", onde a xilana não foi hidrolisada, após a evaporação parcial do Iodo. Estes halos de atividade podem ser observados na Fotografia nº 04.

Os resultados referentes ao diâmetro do halo de atividade de cada mutante estudado, mostraram que estes valores são superiores ao diâmetro da colônia, evidenciando a difusão da enzima extracelular, a partir das hifas, para o agar. O fato de alguns mutantes não terem crescido porém terem apresentado halo de atividade xilanásica no agar, mostra que os microrganismos transferidos liberaram a enzima porém perderam a capacidade de proliferar. Outros mutantes como o nº. 1 e o nº. 16 não cresceram, não mostraram halo de atividade e apresentaram atividade xilanásica, embora baixa, quando cultivados em bagaço de cana 4,5 %. O que se observou durante os repiques sucessivos e a manutenção destes microrganismos, em placas e ou em tubos, foi a existência de reversão bem como a formação de setores. Esta observação foi possível devido os mesmos serem mutantes



Fotografia nº 04 : Teste cromogênico para avaliação do halo de atividade xilanásica secretada durante 96 horas de cultivo em hemicelulose "A" de bagaço de cana 0,2 % .

morfológicos com aspecto e cor diferentes da linhagem original.

Outros 67 mutantes foram obtidos dos diferentes tempos de irradiação nas outras placas com diluições de dez vezes a mil vezes, conforme descrito no item 3.2.10. Para estes mutantes foram apenas desenvolvidos os testes de cultivo em hemicelulose "A" isolada de bagaço de cana, determinado o diâmetro de cada colônia e do halo de atividade enzimática. Alguns exemplos estão apresentados na Fotografia nº 04 onde pode ser observado cinco halos de atividade xilanásica da linhagem selvagem do *Trichoderma harzianum* os quais podem ser comparados com o halo dos mutantes A66, A67 e outros.

A TABELA XXV mostra os valores determinados do diâmetro de 6 colônias da linhagem selvagem, para efeito de

controle, medidos em 24 e 48 horas de cultivo no meio mínimo de Vogel com 0,2 % de hemicelulose "A" de bagaço de cana e agar 2 % , bem como os valores dos respectivos halos de atividade enzimática obtidos nos mesmos tempos citados acima, após adição da solução reveladora.

TABELA XXV : Determinações do diâmetro da colônia e do halo de atividade xilanásica do *T. harzianum* n^o. 20 .

Micrg.	Diâmetro da colônia(cm)		Halo Ativ. Enzimática (cm)	
	24 h.	48 h.	24 h.	48 h.
<i>T.h.</i>	0,9	3,0	0,7	2,8
<i>T.h.</i>	0,9	2,8	0,6	2,8
<i>T.h.</i>	0,9	2,9	0,6	2,9
<i>T.h.</i>	0,9	2,9	0,6	2,9
<i>T.h.</i>	0,8	2,9	0,6	2,8
<i>T.h.</i>	0,9	2,9	0,6	2,9
média dos valores	0,9	2,9	0,6	2,85

Comparando-se os resultados das determinações do diâmetro das colônias e dos halos de atividade das xilanases das 6 colônias do *Trichoderma harzianum*, constata-se boa reprodutibilidade. Verifica-se que o crescimento da colônia foi significativo de 24 para 48 horas, uma vez que praticamente triplicou o diâmetro da colônia. O halo de atividade enzimática aumentou em média 4,75 vezes de 24 para 48 horas porém a diferença do diâmetro do halo de atividade com o diâmetro da colônia é praticamente inexistente na linhagem selvagem, em 48 horas. Esta evidência acentua a diferença comprovada pelos resultados citados na TABELA XXIV para a maioria dos mutantes

obtidos. Comprovando a modificação, ou seja a diminuição da capacidade de crescimento dos mutantes detectada em 48 horas.

Uma vez comprovado, pelas análises anteriores, que somente o teste em cultivo submerso contendo bagaço de cana é que poderia fornecer os resultados precisos da capacidade de produção de xilanase e celulase nesta fonte de carbono, optou-se por não cultivar os 67 mutantes devido as medidas do diâmetro das colônias e do halo de atividade enzimática não terem apresentado diferenças significativas em relação àquelas da linhagem selvagem e dos 58 mutantes. O tempo a ser dispendido foi um fator determinante.

Os mutantes 14, 16, 18, 27, 35, 55 e 56 apresentaram atividade xilanásica de 1,5 a 4,1 U/ml quando crescidos em bagaço de cana 4,5 % . Porém demonstraram maior estabilidade em placa quanto à capacidade de reversão e formação de setores. Para verificar a capacidade dos mesmos em produzir xilanase quando cultivados em xilose bem como a produção de biomassa microbiana nesta fonte de carbono, os referidos mutantes foram crescidos no meio mínimo de Vogel contendo 1 % de xilose.

4.4.9.1 Cultivo de alguns mutantes em xilose 1 %

O *T. harzianum* e os mutantes 14, 16, 18, 27, 35 e 55 foram cultivados conforme descrito em 3.2.7 . Os resultados estão apresentados na TABELA XXVI.

As Fotografias 05 e 06 mostram o aspecto destes cultivos em 48 horas enquanto que as Fotografias 07 e 08 mostram o aspecto destes cultivos em 96 horas de cultivo.



Fotografia 05: Biomassa microbiana da linhagem selvagem do *T. harzianum* e dos mutantes n^o. 16, 14 e 18 cultivados em xilose 1 % durante 48 horas.



Fotografia 06: Biomassa microbiana dos mutantes n^o. 27, 35, 55 e 56 cultivados em xilose 1 % durante 48 horas.

TABELA XXVI :Produção de xilanase e de biomassa microbiana pelo *T. harzianum* e alguns mutantes em xilose 1 % durante 48 e 96 horas.

micrqs.	xlnase (U/ml)		biomassa (mg)		C.R.Res.(mg/ml)	
	48 h.	96 h.	48 h.	96 h.	48 h.	96 h.
<i>T. h.</i>	1,80	2,10	211,2	95,2	0,01	0,02
Mu 14	0,00	0,02	55,0	172,0	6,2	0,02
Mu 16	0,00	0,04	76,3	162,0	6,4	0,75
Mu 18	0,00	0,01	79,2	184,1	7,1	0,01
Mu 27	0,02	0,02	107,6	181,0	5,7	0,00
Mu 35	0,00	0,01	100,6	185,0	2,9	0,00
Mu 55	0,02	0,00	84,7	175,0	6,5	0,14
Mu 56	0,00	0,56	153,4	134,2	1,2	0,02

Nenhum dos mutantes neste cultivo secretou xilanase em níveis significativos em 48 horas salientando a diferença em relação a linhagem que lhes deu origem. Com exceção do mutante n^o. 56, a atividade xilanásica detectada para os outros mutantes foi insignificante. Atividade xilanásica (0,56 U/ml) do mutante n^o. 56 foi 3,8 vezes menor do que à da linhagem selvagem em 96 horas, ou seja, 2,1 U/ml.

Em 48 horas de cultivo a produção de biomassa foi maior do que em 96 horas para a linhagem selvagem e para o mutante n^o. 56, apesar da modificação morfológica e da pigmentação apresentada por este último microrganismo, conforme pode ser comparado nas Fotografias 06 e 07. Os outros mutantes apresentaram maior produção de biomassa em 96 horas quando comparada com a mesma obtida em 48 horas de cultivo.

A quantidade de açúcar redutor residual em 48 horas mostra que os microrganismos que mais consumiram xilose foi o *Trichoderma harzianum*, o qual consumiu praticamente todo o açúcar enquanto que o mutante n^o. 56 consumiu cerca de 88 % .

Estes dados estão de acordo com os resultados de produção de biomassa para estes dois microrganismos, em 48 horas. A diferença morfológica de ambos está caracterizada nas fotografias 06, 07, 08 e 09 e também pela pigmentação amarela apresentada tanto em 48 como em 96 horas de cultivo pelo mutante n^o. 56 .



Fotografia n^o.07: Biomassa microbiana da linhagem selvagem do *T. harzianum* e dos mutantes n^o. 16, 14, e 18 cultivados em xilose 1 % durante 96 horas.



Fotografia 08: Biomassa microbiana dos mutantes n^o. 27, 35, 55 e 56 cultivados em xilose 1 % durante 96 horas.

4.4.10 *Trichoderma harzianum* n^o 20 e o Mutante 55

Considerando-se que: a) o mutante n^o.55 e o n^o. 56 foram, entre os mutantes estudados, aqueles que mostraram atividade xilanásica superior a 3,0 U/ml, quando crescidos em bagaço de cana (TABELA XXIV). b) O mutante n^o.55 perdeu a capacidade de secretar xilanase em 48 horas e 96 horas de cultivo 96 horas de cultivo em xilose 1 % . c) O mutante n^o 56 demonstrou um comportamento metabólico mais próximo da linhagem

original em relação aos outros mutantes cultivados em xilose 1 % , porém uma morfologia distante da original, decidiu-se comparar a atividade da β -xilosidade dos dois mutantes acima referidos com a da linhagem selvagem.

Comparando-se o resultado da atividade β -xilosidásica do *T.harzianum* n^o. 20, mostrado na TABELA XIX , ou seja, 0,21 U/ml, com a atividade desta enzima detectada nos cultivos do mutante n^o.55 (0,48 U/ml) e n^o. 56 (0,19 U/ml) quando crescidos em 4,5 % , optou-se por estudar a produção da xilanase, β -xilosidase e celulase pelo mutante n^o.55 em bagaço de cana 4,5 % durante 240 horas e comparar com a produção das mesmas pelo *T. harzianum* durante o mesmo período de tempo.

Os cultivos do *T. harzianum* e do mutante 55 foram desenvolvidos em quadruplicata nos quais foram inoculados $1. 10^7$ conídios conforme descrito no item 3.2.8.

4.4.10.1 *Trichoderma harzianum* n^o 20

Os resultados referentes ao *T. harzianum* estão apresentados nas TABELAS XXVII, XXVIII, XXIX e XXX e nas Figuras 23, 24 e 25..

A atividade da xilanase do *T. harzianum* foi detectada em 24 horas de cultivo a qual aumentou significativamente de 0,61 U/ml para aproximadamente 25,0 U/ml em 48 horas. Em 72 horas o valor desta atividade subiu para 52,0 U/ml conferindo uma produtividade de 17,40 U/dia. Embora em 96 horas a atividade tenha atingido 65,0 U/ml, a produtividade foi 16,25 U/dia mostrando que a produção de xilanase atingiu o platô entre 72 e 96 horas. A partir de 120 horas a atividade

média da xilanase foi em torno de 70 U/ml porém a produtividade da enzima foi diminuindo gradativamente de 13,6 U/dia em 120 horas para 10,7 U/dia em 168 horas até 7,0 U/dia em 240 horas.

TABELA XXVII : Produção de xilanase pelo *T. harzianum* n^o.20 em bagaço de cana 4,5 % .

Tempo (h)	U/ml	Xlnase Méd.	σ	U/ml	β - Xlsase Méd.	σ
24	0,65	0,61	0,10	0,05	0,05	0,01
	0,64			0,04		
	0,68			0,05		
	0,46			0,06		
48	25,20	24,72	0,41	0,14	0,15	0,01
	24,20			0,16		
	24,80			0,16		
	24,70			0,14		
72	54,00	52,22	2,85	0,19	0,19	0,00
	55,30			0,19		
	50,00			0,19		
	49,60			0,19		
96	68,60	64,85	4,11	0,24	0,27	0,02
	66,40			0,28		
	59,02			0,26		
	65,40			0,29		
120	60,90(*)	70,93	3,18	0,30(*)	0,31	0,04
	68,90			0,33		
	69,30			0,34		
	74,60			0,27		
144	53,50(*)	62,40	4,55	0,31(*)	0,24	0,05
	65,50			0,26		
	64,54			0,29		
	57,17			0,19		
168	71,10	72,47	1,45	0,27	0,27	0,00
	74,00			0,27		
	72,32			n.d.		
	83,44(*)			0,29(*)		
192	83,20(*)	75,46	2,20	0,26	0,27	0,02
	78,00			0,24		
	74,30			0,29		
	74,10			0,28		

TABELA XXVII : Continuação

216	70,50			n.d.		
	72,70	71,60	1,10	n.d.	n.d.	n.d.
	71,60			n.d.		
	63,40(*)			n.d.		
240	62,50(*)			0,31(*)		
	67,60	73,40	5,12	0,28	0,27	0,01
	77,34			n.d.		
	75,20			0,26		

(*) não computado na determinação da média

n.d. não determinado

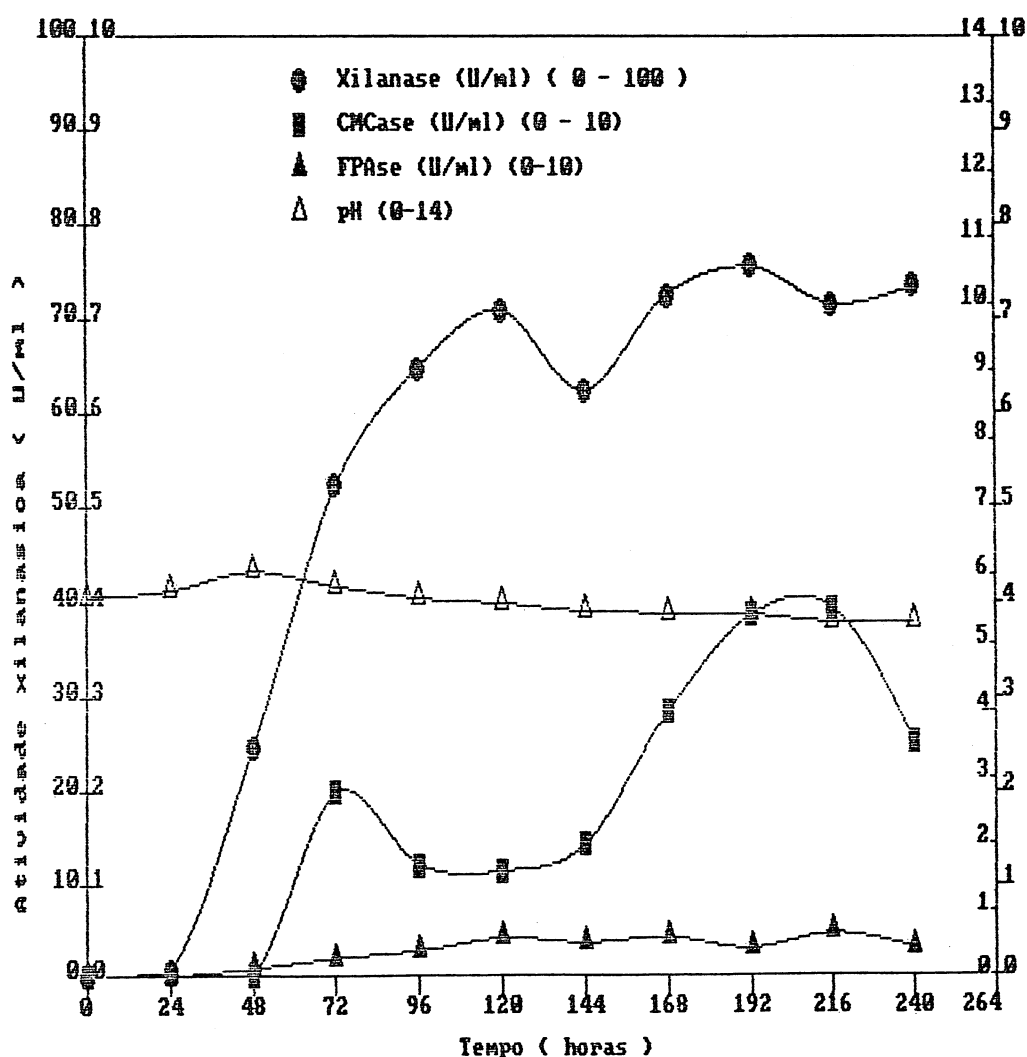


Figura 23: Produção de xilanase e celulase pelo *T. harzianum* n.º 20 crescido no meio mínimo de Vogel em bagaço de cana 4,5 % durante 240 horas.

TABELA XXVIII: Produção de celulase pelo *T. harzianum* n^o. 20 em bagaço de cana 4,5 % durante 240 horas.

Tempo (h)	FPase			CMCase		
	U/ml	Méd.	σ	U/ml	Méd.	σ
24	0,00	0,00	0,00	0,02	0,02	0,00
	0,00			0,02		
	0,00			0,02		
	0,00			0,01		
48	0,08	0,08	0,01	1,08	1,01	0,09
	0,08			1,10		
	0,10			0,98		
	0,07			0,90		
72	0,19	0,19	0,02	2,10	1,99	0,07
	0,21			1,94		
	0,20			1,94		
	0,17			1,99		
96	0,25	0,27	0,02	1,46	1,22	0,25
	0,25			1,13		
	0,29			0,92		
	0,29			1,26		
120	0,40(*)	0,41	0,01	1,26(*)	1,15	0,07
	0,40			1,13		
	0,41			1,23		
	0,43			1,10		
144	0,36(*)	0,36	0,02	1,50(*)	1,43	0,23
	0,36			1,30		
	0,38			1,70		
	0,34			1,30		
168	0,46	0,42	0,03	2,89	2,84	0,31
	0,41			2,51		
	0,40			3,12		
	0,45(*)			2,80(*)		
192	0,41(*)	0,30	0,06	4,30(*)	3,87	0,05
	0,35			3,85		
	0,23			3,94		
	0,34			3,84		
216	0,47	0,46	0,04	3,43	3,95	0,51
	0,44			3,96		
	0,52			4,46		
	0,42			3,51(*)		
240	0,31(*)	0,30	0,01	1,94(*)	2,53	0,30
	0,29			2,30		
	0,31			2,87		
	0,30			2,42		

(*) não computado na determinação da média.

TABELA XXIX: Açúcares solúveis residuais dos cultivos do *T. harzianum* n^o.20 durante 240 horas.

Tempo (h)	Açúcares Totais		Solúveis Residuais (mg/ml)			
	Méd.	σ	Redutores		Méd.	σ
24	0,30	0,33	0,05	0,07	0,07	0,00
	0,37			0,07		
	0,29			0,07		
	0,39			0,06		
48	0,56	0,60	0,05	0,01	0,01	0,00
	0,56			0,01		
	0,60			0,01		
	0,68			0,01		
72	0,93	0,84	0,16	0,17	0,18	0,01
	0,91			0,19		
	0,86			0,18		
	0,93			0,19		
96	0,86	0,86	0,02	0,15	0,14	0,00
	0,90			0,15		
	0,85			0,14		
	0,85			0,14		
120	0,58(*)	0,56	0,02	0,14(*)	0,14	0,00
	0,58			0,14		
	0,55			0,14		
	0,53			0,14		
144	0,96(*)	0,87	0,01	0,12(*)	0,12	0,00
	0,88			0,12		
	0,86			0,12		
	0,88			0,12		
168	0,82	0,74	0,08	0,14	0,14	0,00
	0,64			0,14		
	0,81			0,14		
	0,72			0,14		
192	1,00(*)	0,86	0,01	0,12(*)	0,12	0,00
	0,86			0,12		
	0,86			0,13		
	0,88			0,13		
216	0,91	0,92	0,04	0,13	0,13	0,00
	0,97			0,13		
	0,90			0,13		
	0,93(*)			0,13(*)		

TABELA XXIX : Continuação

240	0,91 0,84 1,02 1,05	0,97	0,11	0,13 0,12 0,13 0,12	0,12	0,00
Cont.	0,29 0,35 0,41 0,37	0,35	0,05	0,06 0,04 0,03 0,04	0,04	0,01

(*) não computado na determinação da média.

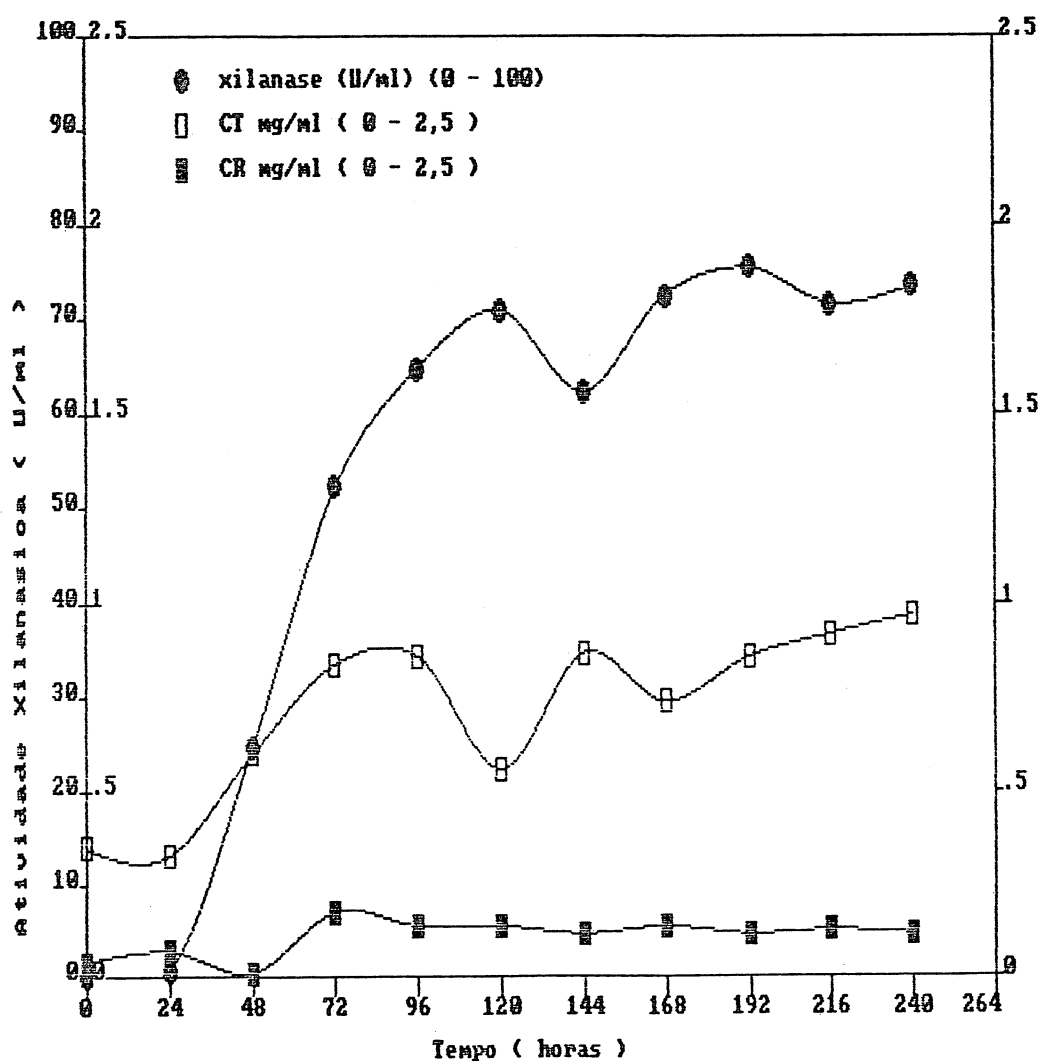


Figura 24: Produção de xilanase e liberação de CT e CR no meio de cultivo do *T.harzianum* em BC 4,5 % durante 240 horas.

TABELA XXX : Variação do pH e produção de proteína extracelular nos cultivos do *T. harzianum* n^o. 20 em bagaço de cana 4,5 % .

Tempo (h)	pH			proteína (mg/ml)		
		Méd.	σ	Méd.	σ	
24	5,75	5,80	0,03	0,79	0,77	0,03
	5,80			0,80		
	5,80			0,73		
	5,75			0,76		
48	6,05	6,08	0,03	1,29	1,16	0,10
	6,10			1,05		
	6,10			1,21		
	6,05			1,11		
72	5,85	5,86	0,02	1,43	1,49	0,04
	5,85			1,53		
	5,90			1,47		
	5,85			1,52		
96	5,70	5,68	0,03	1,80	1,78	0,06
	5,65			1,85		
	5,65			1,70		
	5,70			1,77		
120	5,55(*)	5,60	0,05	2,57(*)	2,44	0,32
	5,55			2,80		
	5,65			2,34		
	5,60			2,18		
144	5,50	5,48	0,03	2,36	2,27	0,01
	5,45			2,26		
	5,50			2,28		
	5,50			2,29		
168	5,45	5,45	0,00	2,23	2,14	0,08
	5,45			2,20		
	5,45			2,10		
	5,45(*)			2,05		
192	5,45(*)	5,43	0,03	2,00(*)	2,54	0,06
	5,40			2,49		
	5,45			2,61		
	5,45			2,54		
216	5,35	5,32	0,08	2,22	2,66	0,18
	5,35			2,09		
	5,40			1,74		
	5,20(*)			2,03(*)		
240	5,35(*)	5,33	0,03	2,90	2,66	0,18
	5,35			2,86		
	5,30			2,50		
	5,35			2,64		

TABELA XXX : Continuação

	5,70			0,62		
Controle	5,75	5,70	0,04	0,83	0,72	0,09
	5,75			0,75		
	5,65			0,69		

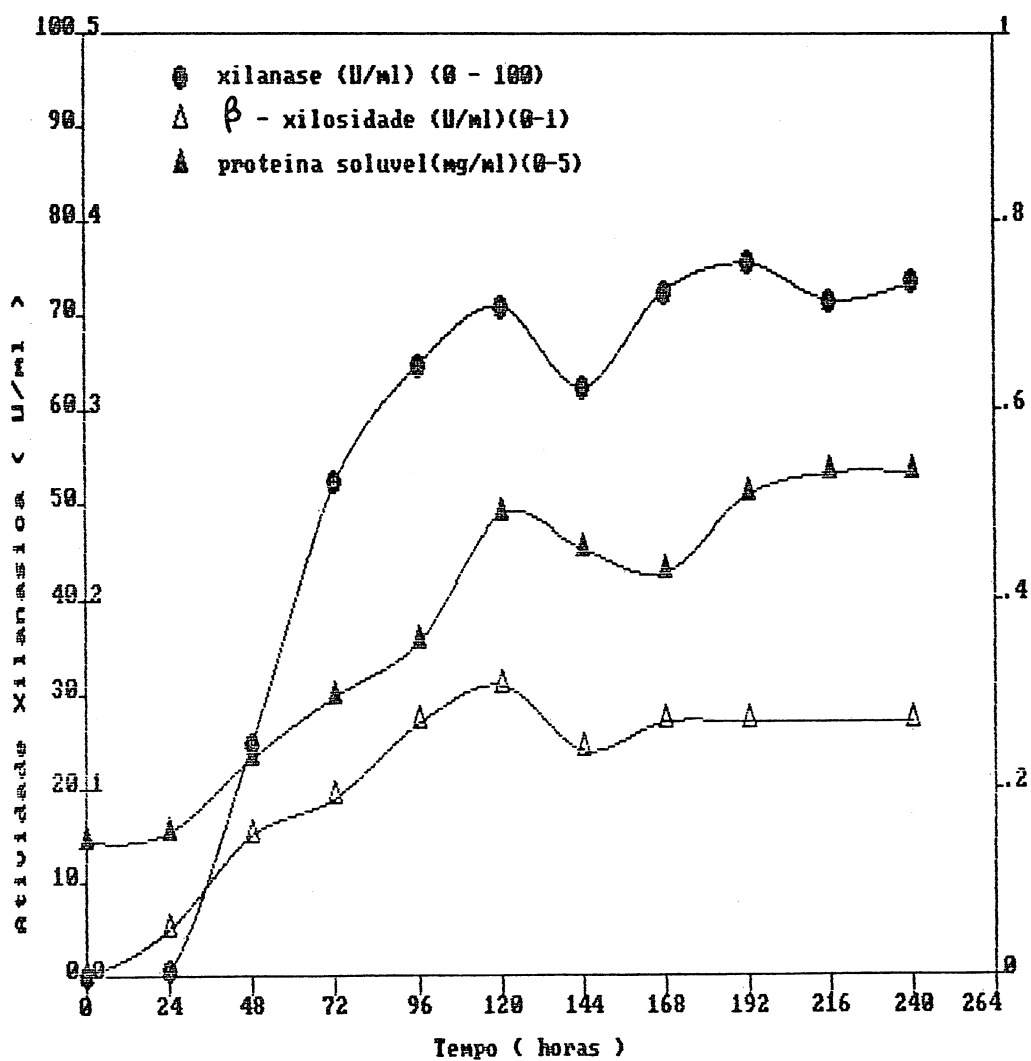


Figura 25: Produção de xilanase, β -xilosidase e proteína solúvel presentes no meio de cultivo do *T.harzianum* em BC 4,5 % durante 240 horas.

A atividade da celulase, medida com papel de filtro como substrato (FPase), foi detectada em 48 horas (0,08 U/ml). A partir deste tempo de cultivo esta atividade foi aumentando até 0,41 U/ml em 120 horas mostrando que o platô de produção ficou entre 96 a 120 horas. A atividade da FPase foi inferior a 0,50 U/ml nos tempos de cultivos estudados. A CMCase foi significativa em 48 horas de cultivo (1,0 U/ml) evidenciando o platô de produção entre 48 (0,50 U/dia) e 96 horas (0,66 U/dia). O valor da CMCase subiu para 4,0 U/ml em 192 e 216 horas concomitantemente com a produtividade que, depois de uma diminuição para 0,24 U/dia em 120 e 144 horas, aumentou novamente para 0,50 U/dia em 192 horas e 0,77 U/dia em 216 horas de cultivo. Estes resultados sugerem a formação de uma segunda geração de células a partir de 120 ou 144 horas, porém esta sugestão somente poderia ter sido comprovada com a determinação da biomassa microbiana, dispersa no bagaço de cana residual, de cada frasco de cultivo. O aspecto do cultivo, em bagaço é levemente esverdeado quando comparado com o controle. Portanto, a forma de proliferação que constitui a biomassa microbiana predominante é representada por conídios. A técnica que determina a biomassa pela diferença de peso foi inadequada, considerando, em primeiro lugar, que o consumo de substrato pelos microrganismos não acontece nos controles e a biomassa acrescida no resíduo não foi suficiente para conferir diferença de peso em níveis que não deixassem margem de dúvida. Em segundo lugar, as lavagens sucessivas preliminares para a eliminação de sais e de metabólitos presentes no meio de cultivo, promovem perdas que alteram ainda mais a confiabilidade dos resultados. Uma técnica confiável e precisa, neste caso, seria a

determinação de nitrogênio total apesar do tempo a ser dispendido para a obtenção destes dados.

A atividade da β -xilosidase (Figura 24) também atingiu um platô de produtividade entre 48 e 96 horas muito embora o nível de produção desta enzima tenha sido baixo apresentando maior valor de atividade (0,31 U/ml) em 120 horas de cultivo.

O valor médio da quantidade de CT solúvel e CR no tempo zero de cultivo foram 0,35 mg/ml e 0,04 mg/ml respectivamente. Em 48 horas o CT solúvel aumentou para 0,60 mg/ml enquanto que o CR diminuiu para 0,01 mg/ml. A partir de 72 horas a média da quantidade de CT solúvel residual foi 0,85 mg/ml enquanto que a de CR foi 0,14 mg/ml até 240 horas de cultivo, evidenciando que à medida em que as hidrolases foram secretadas uma sacarificação em paralelo ocorria.

O pH inicial foi 5,7 , aumentou para 6,1 em 48 horas e a partir de 72 horas foi diminuindo, cerca de 0,1 unidade, até chegar em 5,3 em 216 e 240 horas de cultivo, mostrando comparativamente, um resultado contrário daquele obtido quando o *T.harzianum* cresceu em xilose 1 % (item 4.4.8.).

Os resultados obtidos nesta curva de produção de xilanase mostraram que o valor médio da atividade desta enzima entre 96 e 120 horas de cultivo foi 66,5 U/ml. Valores próximos deste tinham sido obtidos em 1 % de hemicelulose "A" isolada de bagaço de cana (TABELA VIII e XVI) e em 1 % de xilana de aveia (69,9 U/ml), citado na TABELA XVI . Este aumento da atividade xilanásica em bagaço pode ser explicado pela quantidade de conídios inoculados, ou seja , $1 \cdot 10^7$. Este fato também evidencia que embora a metodologia de superfície de resposta,

tenha mostrado que o número de conídios era menos relevante em comparação com a concentração de bagaço de cana e o tempo de cultivo, o número de conídios também é relevante dependendo das características específicas do substrato utilizado como fonte indutora de xilanase. O intervalo de concentração de conídios estudado na metodologia da superfície de resposta ficou aquém daquela que promove com que o *Trichoderma harzianum* expresse o seu potencial xilanolítico. Por outro lado, ficou demonstrado que este microrganismo, quando crescido em 4,5 % de bagaço de cana, durante 96 horas, produz níveis de atividades semelhantes àqueles produzidos em 1 % de xilanas isoladas, às quais requerem técnicas adequadas, reagentes específicos e tempo para serem obtidas.

Dekker (30) acompanhou a produção de xilanase e celulase pelo *T. reesei* C-30 em hidrolisados explodidos de angiosperma (*Eucalyptus regnans*), gimnosperma (*Pinus radiata*) pré-tratados e "solka floc". O platô de produção de xilanase também foi atingido entre 72 a 96 horas (1,3 - 1,4 U/ml) em "solka floc" enquanto que o platô de celululase (FPase e CMCase) foi entre 96 a 120 horas em todos os substratos estudados. O maior índice de produção destas enzimas foi também quando "solka floc" foi utilizado como substrato. A atividade FPase ficou entre 1,0 a 1,2 U/ml enquanto que a CMCase, 24 U/ml, ambas detectadas pelo método do DNS.

4.4.10.2 Mutante 55

Os resultados referentes ao mutante 55 estão apresentados nas TABELAS XXXI, XXXII, XXXIII e Figuras 26, 27 e 28.

TABELA XXXI : Produção de xilanase pelo mutante 55 em bagaço de cana 4,5 % .

Tempo (h)	Xlnase			β -Xlsase		
	U/ml	Méd.	σ	U/ml	Méd.	σ
24	0,00	0,00	$\pm 0,00$	0,00	0,00	$\pm 0,00$
	0,00			0,00		
	0,00			0,00		
	0,00			0,00		
48	0,46(*)	0,67	$\pm 0,05$	0,01(*)	0,02	$\pm 0,00$
	0,65			0,02		
	0,64			0,02		
	0,74			0,02		
72	2,30	2,20	$\pm 0,17$	0,06	0,08	$\pm 0,02$
	2,30			0,07		
	2,00			0,10		
	1,80(*)			0,07(*)		
96	4,00	3,90	$\pm 0,30$	0,10	0,13	$\pm 0,02$
	4,20			0,15		
	3,70			0,15		
	3,70			0,12		
120	3,10	3,33	$\pm 0,20$	0,22	0,23	$\pm 0,02$
	3,50			0,23		
	4,10(*)			0,23		
	3,40			0,26		
144	4,20	3,83	$\pm 0,72$	0,29	0,30	$\pm 0,02$
	3,00			0,29		
	2,70(*)			0,32		
	4,30			0,32		
168	23,70(*)	18,14	$\pm 1,38$	0,50	0,46	$\pm 0,03$
	18,23			0,45		
	19,48			0,45		
	16,72			0,43		
192	26,70	21,00	$\pm 4,97$	0,55	0,53	$\pm 0,03$
	17,50			0,49		
	30,27(*)			0,56		
	18,80			0,53		
216	25,60	23,60	$\pm 2,17$	0,56	0,55	$\pm 0,01$
	21,00			0,55		
	25,16			0,56		
	22,60			0,54		
240	30,11(*)	25,84	$\pm 0,54$	0,56(*)	0,55	$\pm 0,00$
	25,32			0,55		
	26,40			0,55		
	25,80			0,55		

(*) não computado na determinação da média.

A produção de xilanase e celulase para este microrganismo foi menor em relação a linhagem selvagem. A partir de 144 horas ocorreu um aumento da produção destas hidrolases porém não atingiu os valores de atividade da linhagem selvagem. Em 240 horas, por exemplo, a atividade xilanásica foi aproximadamente 26 U/ml, a FPAse 0,16 U/ml e a CMCase 0,66 U/ml. Quando comparadas às atividades da linhagem selvagem : 73,4 U/ml, 0,30 U/ml e 2,53 U/ml, respectivamente, constatou-se que houve uma diminuição significativa na produção de todas as hidrolases detectadas.

TABELA XXXII : Produção de celulase pelo mutante 55 em bagaço de cana 4,5 %.

Tempo (h)	FPAse			CMCase		
	U/ml	Méd.	σ	U/ml	Méd.	σ
24	0,00	0,00	$\pm 0,00$	0,00	0,00	$\pm 0,00$
	0,00			0,00		
	0,00			0,00		
	0,00			0,00		
48	0,00	0,00	$\pm 0,00$	0,00	0,01	$\pm 0,00$
	0,01			0,01		
	0,01			0,01		
	0,01			0,01		
72	0,01	0,01	$\pm 0,00$	0,01	0,01	$\pm 0,00$
	0,01			0,01		
	0,01			0,01		
	0,02			0,02		
96	0,00	0,01	$\pm 0,00$	0,07	0,05	$\pm 0,01$
	0,01			0,06		
	0,01			0,03		
	0,01			0,06		
120	0,01	0,01	$\pm 0,00$	0,08	0,08	$\pm 0,00$
	0,02			0,08		
	0,01(*)			0,06(*)		
	0,01			0,09		

TABELA XXXII : Continuação

144	0,01 0,01 0,05(*) 0,07	0,03	$\pm 0,03$	0,06 0,10 0,18(*) 0,21	0,12	$\pm 0,07$
168	0,13(*) 0,13 0,14 0,12	0,13	$\pm 0,01$	0,60(*) 0,34 0,55 0,45	0,44	$\pm 0,10$
192	0,18 0,19 0,18(*) 0,14	0,17	$\pm 0,02$	0,59 0,63 0,57(*) 0,53	0,58	$\pm 0,05$
216	0,15 0,15 0,19 0,16	0,16	$\pm 0,02$	0,57 0,59 0,66 0,67	0,62	$\pm 0,05$
240	0,20(*) 0,18 0,18 0,14	0,16	$\pm 0,02$	0,65(*) 0,63 0,66 0,70	0,66	$\pm 0,03$

(*) não computado na determinação da média.

O platô de produção de celulase foi alcançado entre 192 a 216 horas. Não se pode afirmar o mesmo para xilanases (Figura 26), uma vez que houve duas etapas de produção. Na primeira etapa houve um platô em 96 horas com 0,97 U/dia de produtividade. Na segunda, a produtividade aumentou para 2,62 U/dia em 192 horas (8 dias).

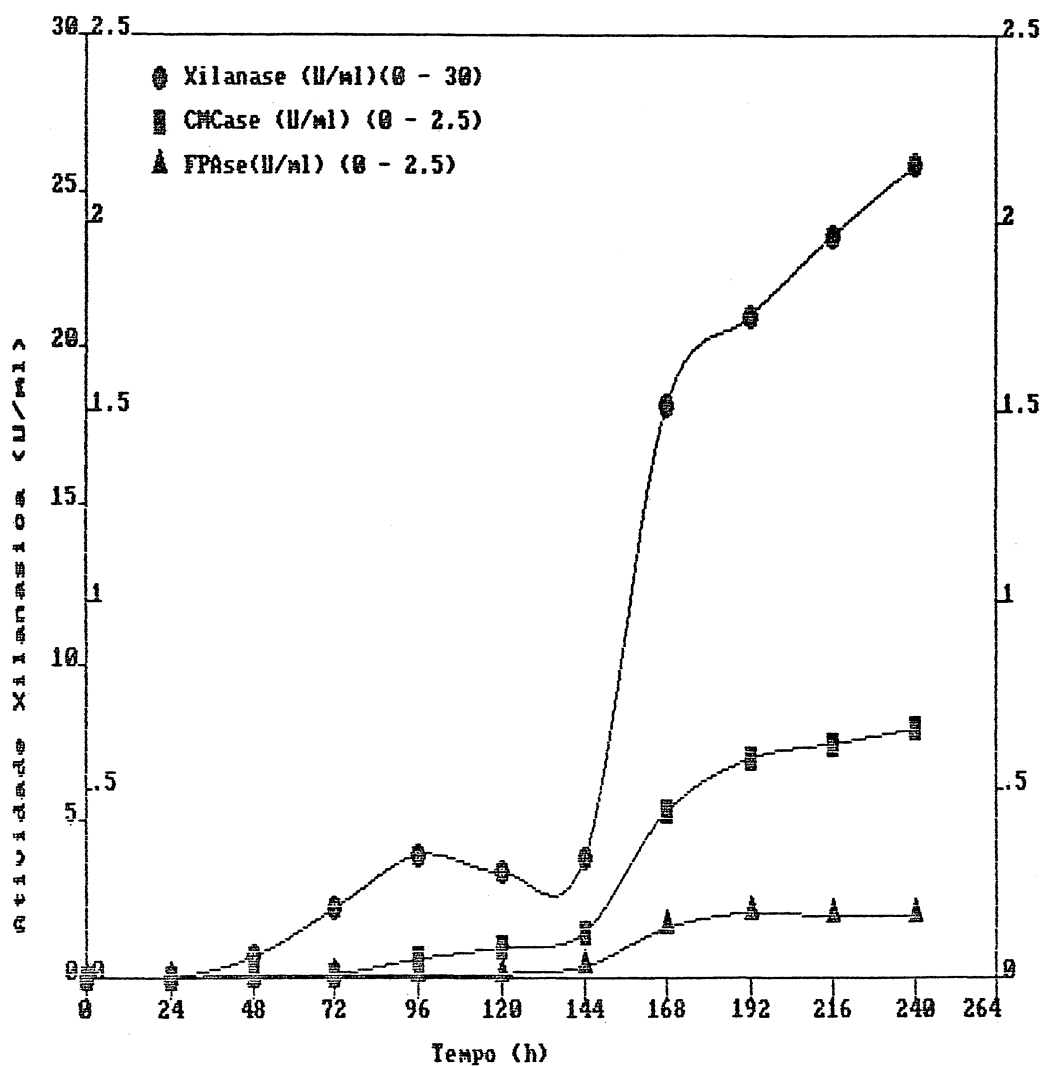


Figura 26 : Produção de hidrolases pelo mutante 55 em BC 4,5 %.

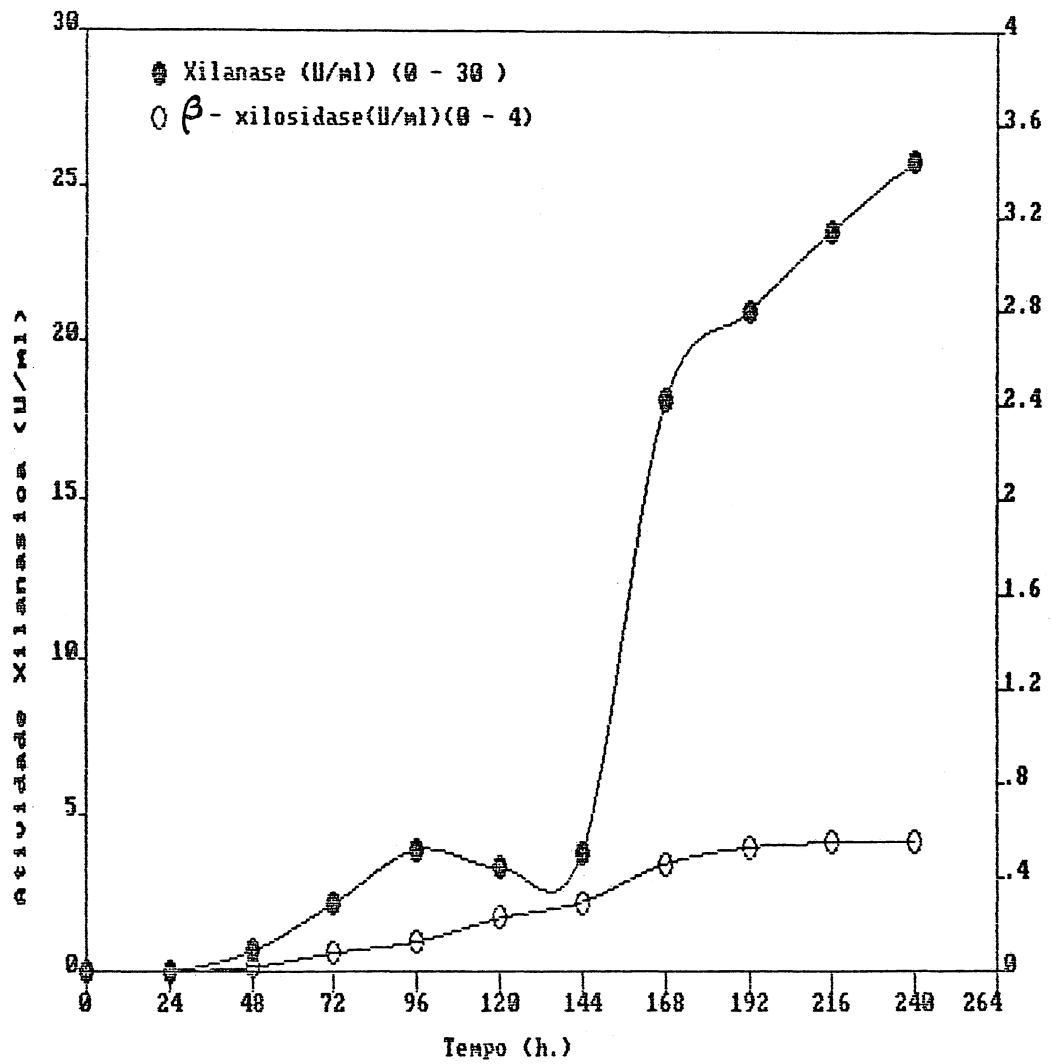


Figura 27 : Produção de xilanasase e β -xilósídase pelo mutante 55 em BC 4,5 % durante 240 horas.

Na Figura 27 pode ser observada a produção de β -xilósídase. Quando comparada com a atividade da linhagem

selvagem, constata-se que em 240 horas de cultivo a atividade do mutante foi 0,55 U/ml enquanto que a do selvagem foi 0,27 U/ml. Portanto apesar de ter ocorrido diminuição da produção de xilanases pelo mutante 55, a atividade β -xilosidásica dobrou em relação à original a partir de 192 horas de cultivo.

Biswas e colaboradores (13) em 1988 estudaram a produção de xilanase pelo *Aspergillus ochraceus* em diferentes fontes de substratos lignocelulósicos (palha de trigo, farelo de trigo, palha de arroz, bagaço de cana) acrescidos de 0,6 % de xilana. Nos cultivos em bagaço de cana, sob fermentação submersa, em 7 dias, detectaram 8,5 U/ml de atividade xilanásica e 2,4 U/ml de atividade β -xilosidásica. Em 1990, os mesmos autores, estudando um mutante deste fungo, obtido com nitroso guanidina, detectaram 46 U/ml de atividade xilanásica e 4,2 U/ml de atividade β -xilosidásica, nas mesmas condições de cultivo.

TABELA XXXIII : Carboidratos totais solúveis e redutores nos cultivos do mutante 55 em bagaço de cana 4,5 % durante 240 horas.

Tempo (h)	mg/ml	Açúcares solúveis residuais				
		Totais Méd.	σ	mg/ml	Redutores Méd.	σ
24	0,34	0,33	$\pm 0,02$	0,03	0,04	$\pm 0,01$
	0,36			0,03		
	0,32			0,04		
	0,32			0,05		
48	0,45	0,41	$\pm 0,03$	0,04	0,04	$\pm 0,00$
	0,40			0,04		
	0,40			0,05		
	0,39			0,04		
72	0,51	0,50	$\pm 0,01$	0,07	0,07	$\pm 0,00$
	0,51			0,08		
	0,50			0,07		
	0,48(*)			0,07		

TABELA XXXIII : Continuação

96	0,44 0,45 0,40 0,45	0,43	$\pm 0,02$	0,04 0,04 0,04 0,03	0,04	$\pm 0,00$
120	0,54 0,57 0,43(*) 0,53	0,51	$\pm 0,02$	0,08 0,08 0,06(*) 0,08	0,07	$\pm 0,01$
144	0,45 0,49 0,61(*) 0,65	0,55	$\pm 0,09$	0,05 0,07 0,14 0,16	0,10	$\pm 0,05$
168	0,80(*) 0,78 0,81 0,80	0,80	$\pm 0,01$	0,20(*) 0,19 0,22 0,21	0,20	$\pm 0,01$
192	0,84 0,82 0,88(*) 0,85	0,83	$\pm 0,01$	0,20 0,17 0,20(*) 0,19	0,18	$\pm 0,01$
216	0,80 0,85 0,81 0,97	0,86	$\pm 0,08$	0,18 0,17 0,19 0,18	0,18	$\pm 0,01$
240	0,84(*) 0,89 0,87 0,90	0,88	$\pm 0,01$	0,18(*) 0,17 0,18 0,18	0,17	$\pm 0,00$
Cont.	0,39 0,43 0,50 0,49	0,45	$\pm 0,05$	0,05 0,03 0,04 0,04	0,04	$\pm 0,01$

(*) não computado na determinação da média

A Figura 28 mostra o perfil dos CT solúveis e CR durante o crescimento do mutante 55. A partir de 144 horas de cultivo, concomitantemente com o aumento da produção das hidrolases, há também um aumento dos carboidratos totais e redutores comprovando a sacarificação enzimática "in vivo".

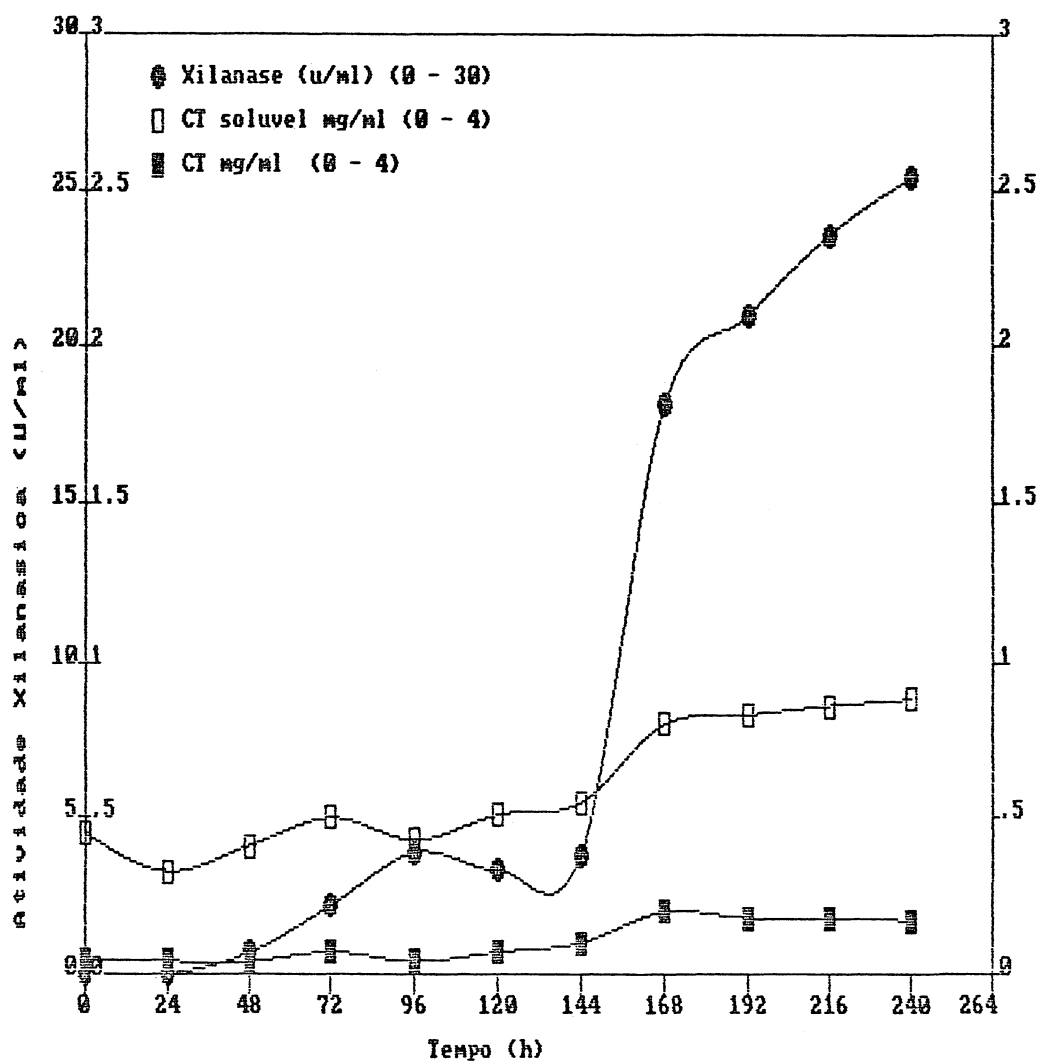


Figura 28 : Carboidratos totais solúveis e redutores residuais presentes nos cultivos do mutante 55 em bagaço de cana 4,5 % durante 240 horas.

4.4.11 *Trichoderma harzianum* nº 20 e *Trichoderma aureo-viride* nº 49.

As Figuras 11 e 12 apresentadas anteriormente mostram um comportamento diferente das espécies de *Trichoderma* citadas acima.

Pelos resultados apresentados na TABELA XIX, constatou-se que estes microrganismos, quando cultivados em xilose 1%, produzem xilanase em níveis significativamente distintos. O *T. harzianum* produziu 3,4 U/ml em 72 horas e o *T. aureo-viride* 0,65 U/ml.

Os resultados da TABELA XX mostram que ambos os microrganismo cultivados em bagaço de cana 4,5% produzem níveis de atividade xilanásica iguais ou seja 42 U/ml.

Para avaliar o comportamento metabólico destes dois microrganismos, que se destacaram como fungos xilanolíticos na etapa de seleção, os mesmos foram cultivados em diferentes concentrações de xilose durante 48 e 96 horas. Estes resultados estão apresentados nas Figuras 29, 30 e 31.

Na Figura 29 pode ser observado que o aumento da concentração de xilose promoveu um aumento da produção de xilanase pelo *T. harzianum* e que o mesmo não aconteceu para o *T. aureo-viride*. A produção de xilanase pelo *T. harzianum* aumentou de 0,62 U/ml (0,5% xilose) para 2,07 U/ml (1% de xilose) em 48 horas. O mesmo não aconteceu quando a concentração foi 2%, uma vez que a atividade xilanásica foi 2,2 U/ml, neste mesmo período de tempo. Em 96 horas as atividades xilanásicas do *T. harzianum* foram 1,35 U/ml, 2,40 U/ml e 3,80 U/ml nas concentrações de 0,5%; 1,0 e 2,0% respectivamente. Portanto, a concentração de xilose interfere na

produção de xilanase para o *T. harzianum*. Porém é indiferente para o *T. aureo-viride*, visto que a atividade xilanásica foi inferior a 0,25 U/ml em 48 ou 96 horas em qualquer uma das concentrações estudadas.

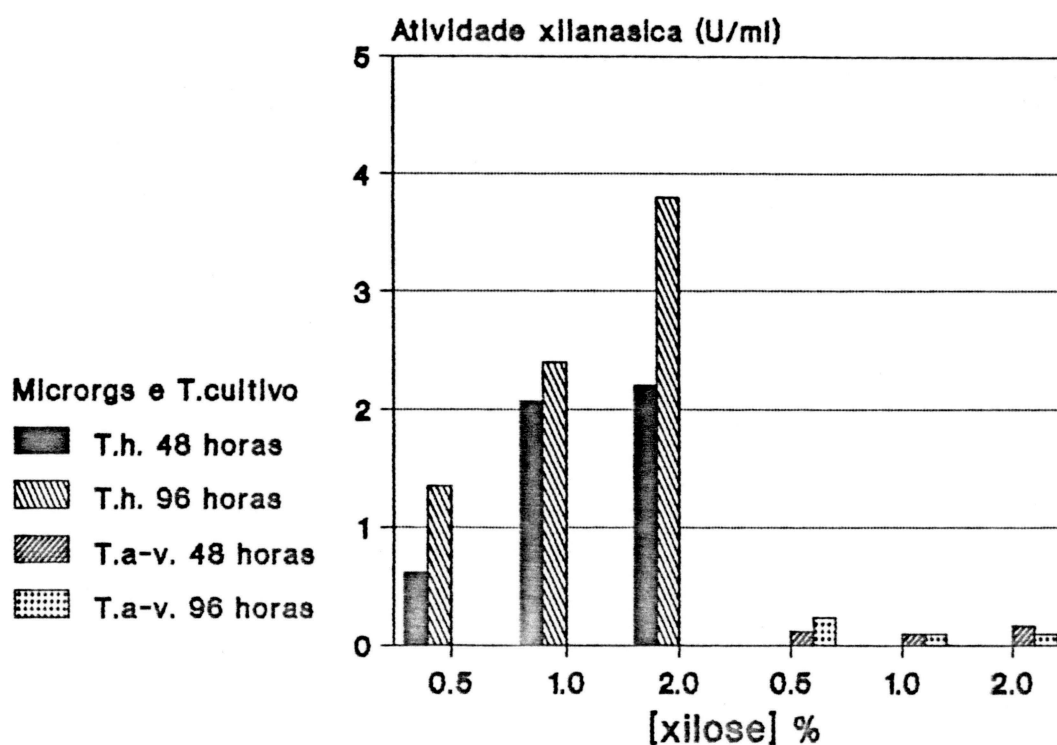


Figura 29 : Produção de xilanase pelo *T. harzianum* e *T. aureo-viride* em diferentes concentrações de xilose.

A Figura 30 apresenta a produção de biomassa micelial produzida por estes microrganismos. A concentração crescente de xilose promoveu um aumento proporcional na produção de biomassa em 48 horas e 96 horas para o *T. harzianum*. Porém a quantidade de biomassa produzida foi maior em 48 do que 96 horas de cultivo, confirmando os resultados obtidos anteriormente na

curva de crescimento em xilose a 1 %. O mesmo não aconteceu para o *T. aureo-viride* que se mostrou indiferente à concentração de xilose. Muito embora pode-se observar que a quantidade de biomassa produzida em 96 horas foi maior em relação à produzida em 48 horas. A biomassa micelial duplicou, em 96 horas, quando a concentração de xilose dobrou de 0,5 para 1,0 %. Porém o mesmo efeito não ocorreu em xilose 2 % para o *T. aureo-viride*.

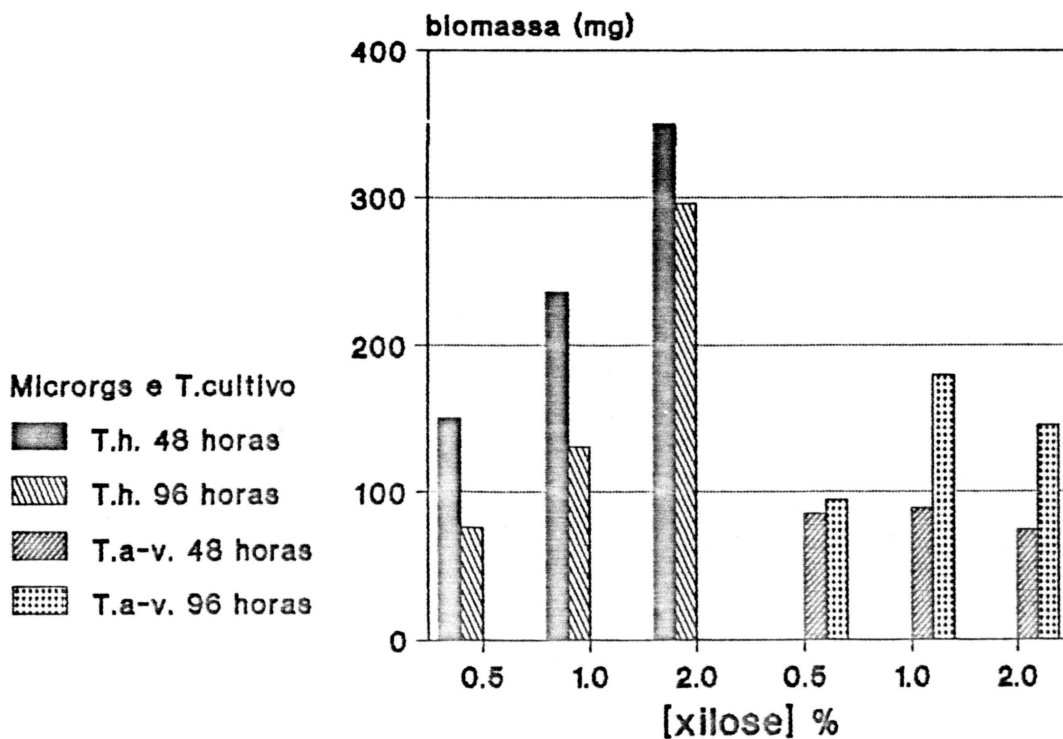


Figura 30 : Produção de biomassa microbiana pelos fungos *T. harzianum* e *T. aureo-viride* em diferentes concentrações de xilose.

A Figura 31 apresenta as variações de pH nos cultivos destes fungos nas três concentrações de xilose estudadas.

Conforme constatado anteriormente, na Figura 21, em 48 horas, houve uma diminuição do pH do meio de cultivo. Na Figura 30, pode se verificar que o pH diminuiu gradativamente, em 48 horas, à medida em que a concentração de xilose foi aumentada cultivos do *T. harzianum*. Os valores de pH foram 6,25 (0,5%), 4,85 (1,0%) e 3,65 (2,0%). Estes resultados indicam uma correlação com o nível de produção de biomassa microbiana, isto é, quanto maior a produção de biomassa em 48 horas, menor o pH do meio de cultivo. Em 96 horas, os valores de pH aumentaram para 6,6; 6,25 e 6,6 respectivamente, quando houve uma queda na quantidade de biomassa.

Nos cultivos do *T. aureo-viride*, também houve uma diminuição do pH, porém não foi proporcional com o aumento da concentração de xilose; e sim, com a produção de biomassa microbiana.

Portanto, os resultados indicam que a síntese proteica evidenciada através da produção de biomassa microbiana, levou a uma diminuição do pH do meio de cultivo.

A Figura 32 apresenta o consumo de xilose pelos dois microrganismos nos dois tempos de cultivo e concentrações estudados. Pode-se constatar que o consumo de xilose foi em torno de 100% pelo *T. harzianum*, tanto em 48 como em 96 horas. Ficando evidente que maior concentração desta fonte de carbono deve ser utilizada para cultivar este microrganismo. O consumo de xilose pelo *T. aureo-viride* foi maior em 96 horas, porém em 48 horas o consumo foi decrescente à medida em que a concentração de xilose foi aumentada, ressaltando que nos cultivos com xilose

a 2 % cerca de 90 % foi consumida.

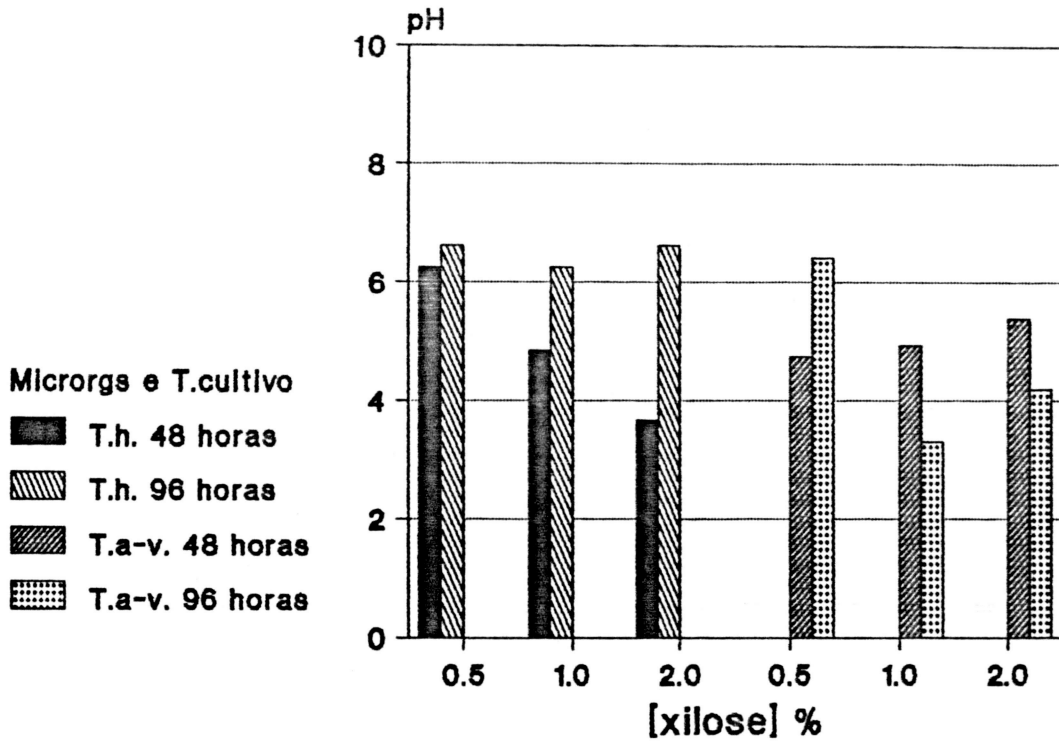


Figura 31 : Variação do pH nos cultivos do *T. harzianum* e *T.aureo* em diferentes concentrações de xilose.

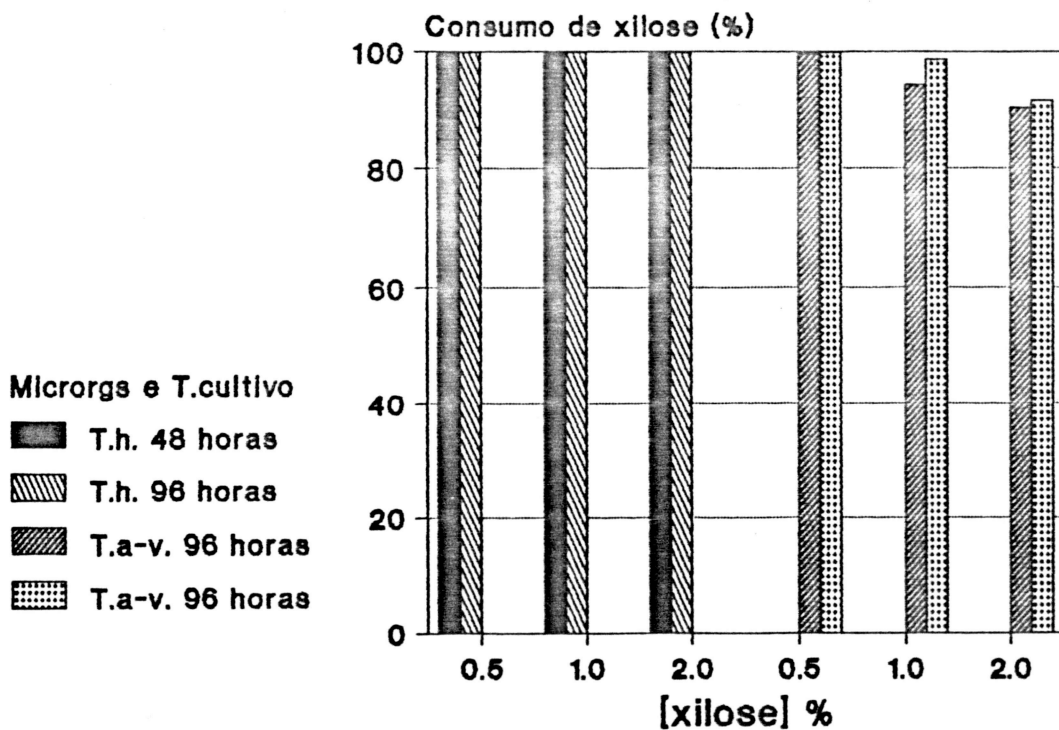
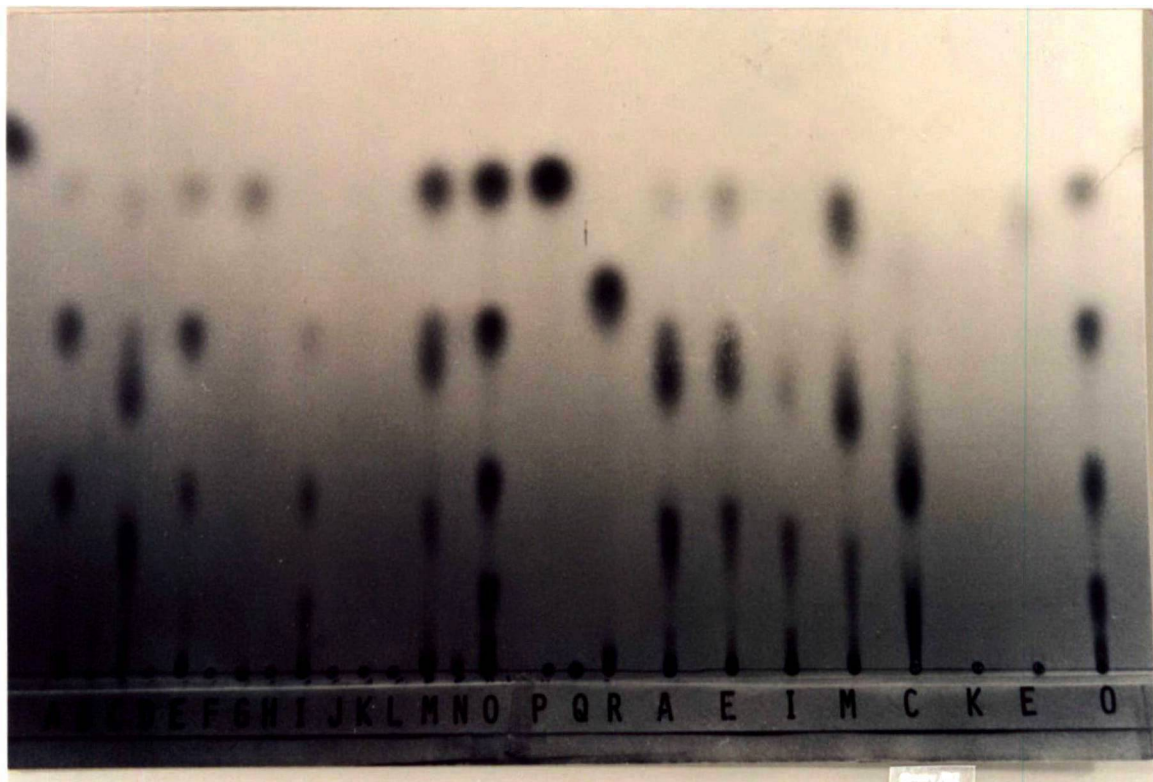


Figura 32 : Consumo de xilose pelos fungos *T. harzianum* e *T. aureo-viride* crescidos em diferentes concentrações.

4.4.12 Cromatografia dos produtos de hidrólise da xilana de "larch" pelas xilanases obtidas nos cultivos do *T. harzianum* n° 20 e n° 2333, do mutante n° 55 e do *T. aureo-viride* n° 49 cultivados em xilose 1 % (72 h) ou bagaço de cana 4,5 % (96 h)

Na fotografia n° 09 estão apresentados os produtos de hidrólise da xilana de "larch" pelas xilanases obtidas nos cultivos dos referidos microrganismos. Os hidrolisados estão representados por letras conforme a legenda.



Fotografia 09 :Cromatografia em camada delgada dos produtos de hidrólise da xilana de "larch" pelas xilanases do *T.harzianum* n° 20 e n°2333, *T.aureo-viride* n° 49 e do mutante 55 (sílica-gel, solvente : isopropanol, acetato de etila e água).

Legenda

- | | |
|---|----------------------------|
| A: <i>T.h.</i> n° 20 (BC 4,5 %) | B: controle da enzima de A |
| C: <i>T.h.</i> n° 20 (xil 1 %) | D: controle da enzima de C |
| E: <i>T.a-v</i> n° 49 (BC 4,5 %) | F: controle da enzima de E |
| G: <i>T.a-v</i> n° 49 (xil 1 %) | H: controle da enzima de G |
| I: <i>T.h.</i> n° 2333 (BC 4,5 %) | J: controle da enzima de I |
| K: <i>T.h.</i> n° 2333 (xil 1 %) | L: controle da enzima de K |
| M: mutante n° 55 | N: controle da enzima de M |
| O: padrão de xilooligossacarídeos. | P: padrão de xilose |
| R: padrão de arabinose e ác. alucurônico. | |

Na Fotografia 09 pode ser observado que a xilanase do *T. harzianum* nº 20 hidroliza a xilana de "Larch" produzindo mais xilobiose, xilotriose e outros xilooligossacarídeos do que xilose. Isto pode ser explicado pelos baixos índices de atividade β -xilosidásica deste microrganismo.

A xilanase do *T. aureo-viride* promoveu a formação de maior quantidade de xilose além dos outros xilooligossacarídeos. No hidrolisado (G) a atividade β -xilosidásica ficou demonstrada quando este microrganismo cresceu em xilose 1 %, considerando-se que estas enzimas foram dialisadas antes do ensaio.

O *T. harzianum* 2333 produziu xilanase somente quando crescido em bagaço de cana 4,5 %. Os hidrolisados da xilanase apresentaram mais xilotriose e outros oligossacarídeos do que xilobiose. Xilose não foi detectada pela cromatografia em camada delgada.

A xilanase do mutante 55 obtidas em 4,5 % de bagaço de cana, hidrolisou a xilana de "Larch" em xilose, xilobiose, xilotriose e outros xilooligossacarídeos. A quantidade de xilose produzida foi maior quando comparada com os hidrolisados das linhagens selvagens.

O padrão de xilooligossacarídeos neutros (O), foi obtido de hemicelulose "A" isolada de *Mimosa scabrella* (05).

4.4.13. Comparação das atividades xilanásica, β -xilosidásica e celulásica entre as preparações 1 % (p/v) obtidas do *T. harzianum* nº 20 e do *T. aureo-viride* nº 49 crescidos em bagaço de cana 1 % ou 4,5 %

As preparações enzimáticas foram obtidas conforme descrito no item 3.2.13. As características quanto as atividades das hidrolases e os CT residuais e CR residuais nas respectivas soluções 1 % (p/v) estão apresentadas na TABELA XXXIV .

TABELA XXXIV :Comparação das preparações de xilanase 1 % (p/v) do *T.harzianum* nº 20 e do *T.aureo-viride* nº 49

Microrganismos	<i>T. harzianum</i>		<i>T. aureo-viride</i>		
	1 %	4,5 %	1 %	4,5 %	
Fonte carbono		BC		BC	
Conc. cultivo	1 %	4,5 %	1 %	4,5 %	
xilanase (nkat/ml)	83	1900	116	1116	
β -xilosidase (nkat/ml)	0,0	5,0	0,0	12,0	
celulase FPA (U/ml)	0,04	0,39	0,0	0,38	
CT (mg/ml)	0,18	2,20	0,20	2,10	
CR (mg/ml)	0,05	0,80	0,05	0,65	
Proteína (mg/ml)	Hartree	0,50	4,10	0,50	3,5
	μ Kjeldahl	0,80	1,60	1,20	n.d.

n.d. = não determinado

Através da TABELA XXXIV pode se verificar que as preparações enzimáticas de ambos os microrganismos obtidas quando os mesmos foram crescidos em 4,5 % (p/v) de BC, apresentaram atividade xilanásica e β -xilosidásica muito mais elevadas em relação às obtidas em 1 % deste substrato. A

tividade xilanásica da preparação enzimática do *T. harzianum* foi aproximadamente vinte e três vezes superior em relação à obtida em 1 % enquanto que a do *T. aureo-viride* foi em torno de nove vezes e meia superior.

Estas diferenças confirmam as características demonstradas por ambos os microrganismos quanto ao potencial em produzir xilanase indutivamente.

As atividades da β -xilosidase também confirmam os resultados apresentados na cromatografia, explicando a maior quantidade de xilose presente nos hidrolisados das enzimas do *T. aureo-viride*. A atividade da β -xilosidase dos dois microrganismos quando crescidos em BC 1 %, não foi detectada. Porém a atividade desta enzima foi aproximadamente duas vezes e meia superior na preparação enzimática do *T. aureo-viride* crescido em BC 4,5 % em comparação com a do *T. harzianum*.

Neste trabalho as atividades enzimáticas não estão apresentadas em atividade específica devido a presença de lignina proveniente do bagaço de cana durante a autoclavação. O meio de cultivo adquire uma coloração castanho claro pela presença de hemicelulose e lignina solúveis. A lignina interfere no método de dosagem de proteína pelo método de Hartree como também absorve em 280 nm. Para avaliar o grau de interferência pode ser observada a diferença dos resultados na análise de proteína medida pelos métodos de Hartree e pelo de Kjeldall. A quantidade de proteína, por exemplo, na preparação de xilanase do *T. harzianum* em BC 4,5 % foi duas vezes e meia superior à quantidade detectada pelo Kjeldahl. O inconveniente deste último método é o volume de enzima utilizado na dosagem, o que impossibilitou a comparação da preparação do *T. aureo-viride* em BC 4,5 %

Uma das dificuldades encontradas quando se estuda o aproveitamento de resíduos lignocelulósicos é a interferência que os mesmos podem causar em algumas técnicas colorimétricas.

4.4.14. Análise eletroforética em acetato de celulose das preparações enzimáticas 1 % (p/v) do *T. harzianum* n° 20, do mutante 55 e do *T. aureo-viride* n° 49 cultivados em BC 4,5 % .

A Figura 33 apresenta os resultados das análises da atividade xilanásica eluída das tiras de acetato-celulose após eletroforese, conforme descrito no item 3.2.14.

O comportamento eletroforético da xilanase das linhagens selvagens e do mutante 55 é distinto. Isto pode ser evidenciado pelo perfil da atividades eluídas das secções de cada fita.

A xilanase do *T. harzianum* apresentou atividade mais elevada na secção 8 e menor na 10 enquanto que as do mutante 55 foi maior na secção 12 . A preparação do *T. aureo-viride* apresentou maior atividade na secção 10 cuja atividade foi mais elevada em relação à do *T. harzianum* e de seu mutante.

Várias tentativas foram feitas para corar a duplicata das tiras de acetato, porém todas foram frustradas porque a quantidade de proteína foi insuficiente.

Os resultados obtidos até o presente induzem a continuidade da pesquisa para o estudo da produção de xilanase e um melhor entendimento da degradação de xilana. Algumas sugestões como:

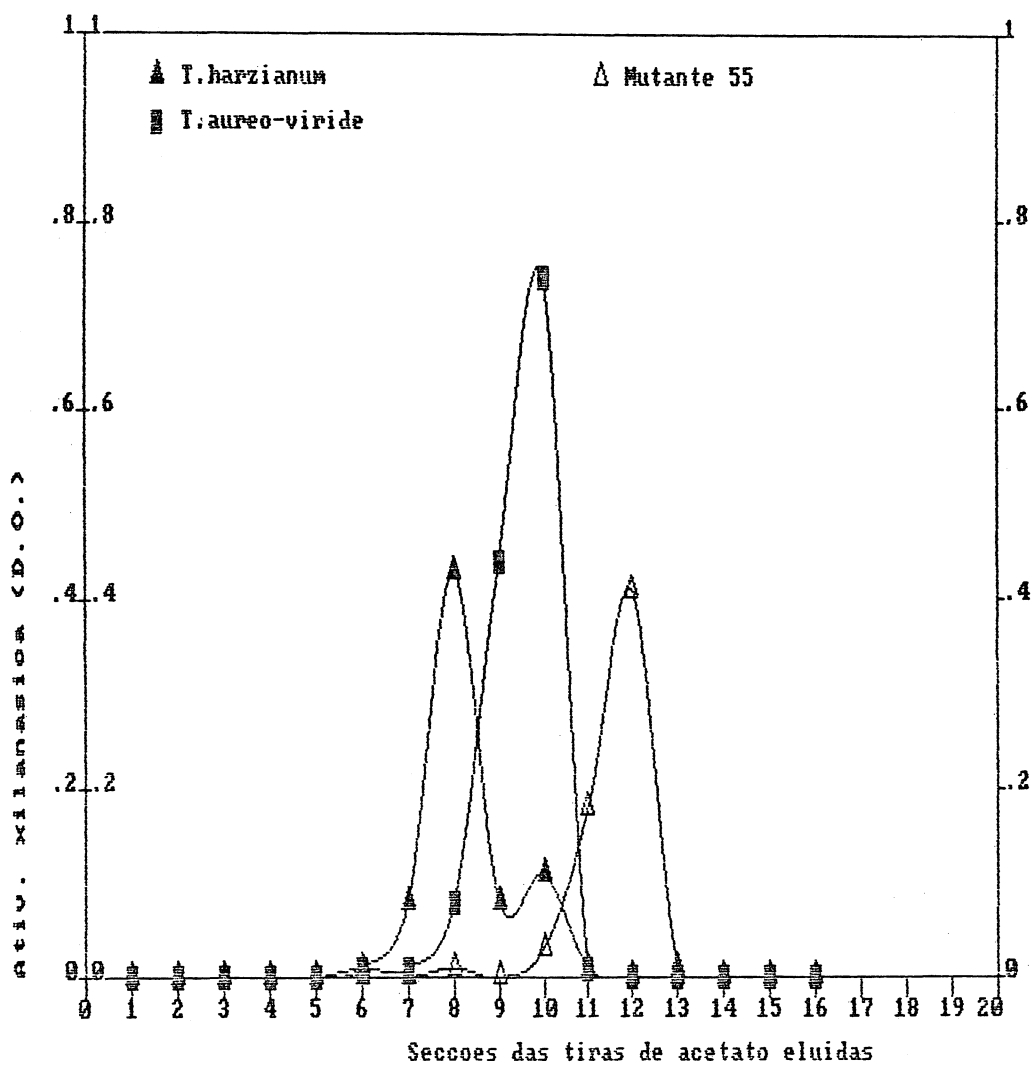


Figura 33 : Análise da atividade xilanásica eluída das tiras de acetato-celulose após eletroforese das preparações enzimáticas do *T. harzianum* n^o. 20, do *T. aureo-viride* n^o. 49 e do mutante 55.

- a) Purificar as enzimas do *T. harzianum* n^o. 20 e n^o. 2333, do mutante 55 e do *T. aureo-viride* crescidos em BC 4,5 % (p/v) para avaliar o mecanismo de ação das mesmas.
- b) Otimizar a concentração de xilose para a produção de xilanase pelo *T. harzianum*.
- c) Purificar a xilanase do *T. harzianum* obtida em xilose e comparar com as citadas em a).
- d) Analisar a composição em aminoácidos da biomassa do *T. harzianum* crescido em xilose e em bagaço de cana para verificar a sua utilização em ração animal.
- e) Comparar a produção de xilanase pelo *T. harzianum* e pelo *T. aureo-viride* em fermentador, otimizando o pH e a taxa de oxigênio.
- f) Cultivar o *Rhizopus oryzae* e o *Aspergillus fumigatus* nas condições otimizadas para a produção de xilanase, purificar e comparar o mecanismo de ação.
- g) Imobilizar endoxilanase, β -xilosidase e testar em diferentes aplicações, na presença e na ausência de outras hidrolases.

Não somente estas sugestões como outras idéias poderão ser desenvolvidas futuramente para colaborar para um melhor entendimento da biodegradação e biodeterioração da biomassa lignocelulósica.

5. CONCLUSÕES

5.01 Dentre os oitenta e cinco microrganismos estudados, dez foram selecionados como xilanolíticos em bagaço de cana, sendo classificados como : *Rhizopus oryzae* Went & Prinsen Geerl (isolado de Hemiptera), duas linhagens *Trichoderma harzianum* Rifai e uma *Trichoderma viride* Pers & S.F.Gray (isolados de *Aspidosperma* sp.), *Aspergillus fumigatus* Fresenius (isolado de termite), *Trichoderma pseudokoningii* Rifai (isolado de madeira), duas linhagens *Trichoderma aureo-viride* (isoladas de *Gynandrobrotica* sp.), *Trichoderma pseudokoningii* Rifai (isolada de *Gynandrobrotica* sp.), *Rhizopus oryzae* Went & Prinsen Geerl (isolado de *Artocarpus* sp.).

5.02 Dentre as classes de microrganismos estudadas a dos fungos destacou-se como produtora de xilanase , quando cultivados em bagaço de cana como única fonte de carbono. Entre os gêneros, o *Trichoderma* demonstrou maior potencial para produzir xilanase do que o *Aspergillus* e *Rhizopus*.

5.03 As linhagens de *T. harzianum* nº 20 (isolado objeto deste estudo) e NRC 2333 (referencial de coleção internacional) estudadas, mostraram diferente potencial xilanolítico em xilose ou bagaço de cana, demonstrando que linhagens diferentes de mesmo gênero e espécie são distintos quanto a capacidade de produzir xilanase em igual condição de cultivo.

- 5.04 A metodologia estatística da superfície de resposta pode ser utilizada para otimizar parâmetros da produção de xilanase, porém a sua aplicação depende do intervalo das variáveis estabelecidas (substrato, tempo de cultivo, inóculo, pH, aeração, etc) para se obter a resposta ótima.
- 5.05 A concentração de bagaço de cana e o tempo de cultivo foram fatores que exerceram maior influência na produção de xilanase para os microrganismos xilanolíticos estudados.
- 5.06 A quantidade de carboidratos totais e redutores solubilizados durante a autoclavação do meio de cultivo, aumenta gradativamente com o aumento da concentração do bagaço de cana, induzindo maior produção de xilanase nas concentrações entre 4 e 5 % (p/v).
- 5.07 A produção de xilanase em cultivos submersos foi muito maior em relação a de celulase, quando o bagaço de cana foi utilizado como única fonte de carbono. Quando o bagaço foi substituído por xilana, a atividade celulásica diminuiu significativamente ou não foi detectável, demonstrando que a produção de xilanase depende da concentração do indutor utilizado.
- 5.08 Pulverizados de diferentes angiospermas como *Saccharum officinarum* (bagaço de cana) e *Mimosa scabrella* (bracatinga) a 4,5 % (p/v), induziram quantidades

diferentes de xilanase para o *T. harzianum* n° 20, ou seja, 42 U/ml em bagaço e 6,7 U/ml respectivamente.

5.09 Xilanas a 1 % (p/v) induzem positivamente a produção de xilanase por um microrganismo xilanolítico, enquanto que a 4,5 % promovem inibição da produção, em diferentes proporções, dependendo das suas fontes de obtenção.

5.10 O pré-tratamento físico do resíduo lignocelulósico pode influenciar na produção de xilanase. Quanto maior o tamanho da partícula, maior a concentração de fonte de carbono necessária para aumentar a produção destas enzimas.

5.11 Resíduos lignocelulósicos pré-tratados para retirar o amido, induzem xilanasas mais eficientemente a 4,5 % (p/v) do que a 1 % (p/v).

5.12 O *T. harzianum* n° 20 produziu xilanase quando cultivado em celulose microcristalina 4,5 % (p/v) e em xilose 1 % (p/v). Porém a produção destas enzimas foi reprimida em glucose 1 % (p/v).

5.13 Entre os dez microrganismos xilanolíticos estudados, apenas as duas linhagens de *T. harzianum* n° 20 e n° 14, *T. viride* n° 15, isolados de *Aspidosperma* sp., e o *T. aureo-viride* n° 53, isolado de *Gynandrobrotica* sp., produziram níveis de atividade xilanásica acima de 1 U/ml,

quando foram cultivados em xilose 1 % durante 72 horas.

5.14 Os dez microrganismos xilanolíticos selecionados produziram essencialmente xilanase em bagaço de cana 4,5 % (p/v) uma vez que foram detectados baixos níveis de atividade celulásica, amilásica e pectinásica.

5.15 O meio de YM, devido a concentração de fonte de nitrogênio presente, não foi adequado para a produção de xilanase pelos dez microrganismos xilanolíticos selecionados. O gênero *Trichoderma* foi mais negativamente afetado pela fonte de nitrogênio do que os gêneros *Aspergillus* e *Rhizopus*, nas condições de cultivo estudadas.

5.16 O *T. harzianum* nº 20 produziu xilanase em xilose 1 % (p/v) e a produção de biomassa micelial foi maior em 48 horas de cultivo, levando a um abaixamento do pH do meio no mesmo período de tempo.

5.17 O teste cromogênio para visualizar o halo de hidrólise da atividade xilanásica foi eficiente e reprodutivo porém não apresentou correlação com os níveis de atividade xilanásica produzidos e medidos em meio líquido agitado.

5.18 A radiação UV levou a obtenção de mutantes morfológicos, que diminuíram a produção de biomassa microbiana em relação a linhagem selvagem em xilose 1 %, além de ter promovido a perda da capacidade de produzir

xilanase nesta fonte de carbono.

5.19 O aumento de conídios de $3 \cdot 10^6$ para $1 \cdot 10^7$, como inóculo, promoveu um aumento da produção de xilanase de 42 U/ml para 65 U/ml em bagaço de cana 4,5 % (p/v) em 96 horas de cultivo.

5.20 A produção de xilanase no decorrer do tempo de cultivo, aumentou a liberação de açúcares totais solúveis e redutores do bagaço de cana para o meio de cultivo independentemente do consumo pelo microrganismo.

5.21 O pH do meio de cultivo variou dependendo do gênero do microrganismo xilanolítico e da fonte de carbono utilizada como indutora de xilanase.

5.22 A concentração de xilose livre pode aumentar a indução de xilanase, porém a produção desta enzima não tem correlação direta com a produção de biomassa microbiana para o *T. harzianum* n° 20.

5.23 O *T. aureo-viride* n° 49 foi indiferente à concentração de xilose, não aumentou o nível basal de produção de xilanase e produziu maior quantidade de biomassa em 96 horas de cultivo nas concentrações de 1 a 2 % (p/v) de xilose.

5.24 O *T. aureo-viride* n° 49 produziu maior quantidade de β -xilosidase do que o *T. harzianum* n° 20 quando crescidos

em bagaço de cana a 4,5 %.

5.25 As xilanases produzidas pelo *T. aureo-viride* nº 49, *T. harzianum* nº 20 e o mutante 55 apresentaram comportamentos eletroforéticos distintos.

5.26 A preparação enzimática a 1 % (p/v) obtidas a partir do cultivo do *T. harzianum* nº. 20 em 4,5 % (p/v) de bagaço de cana apresentou maior atividade endoxilanásica quando comparada com a do *T. aureo-viride* nº. 49. Porém a atividade β -xilosidásica da preparação deste último foi duas vezes e meia superior em relação à do primeiro.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AGOSIN, E.; TOLLIER, M. T.; BRILLOUET, J. M. et al. Fungal Pretreatment of wheat straw: effects on the biodegradability of cell walls, structural polysaccharides, lignin and phenolic acids by rumen microorganisms. *J. Sci. Food Agric., Barking*, v. 37, p. 97-106, 1986.
2. ALBERSHEIM, P. The walls of growing plant cells. *Sci. Am., New York*, v.232, p. 80-94, 1975.
3. ASPINALL, G. O. Structural chemistry of the hemicelluloses. *Adv. Carbohydr. Chem., New York*, v. 14, p. 429-468, 1959.
4. BAILEY, M. J.; POUTANEN, K. Production of xylanolytic enzymes by strains of *Aspergillus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol., Heidelberg*, v. 30, p. 5-10, 1989.
5. BARBOSA, A. M. Atividade xilanolítica dos fungos *Dactylium dendroides* e *Fusarium oxysporum*. Curitiba : UFPR, 1984 Dissertação(mestrado em bioquímica). Departamento de Bioquímica , UFPr, 1984.
6. BELDMAN, G.; VORAGE, A. G. J.; ROMBOUTS, F. M. et al. Specific and nonspecific glucanases from *Trichoderma viride*. *Biotechnol. Bioeng., New York*, v. 31, p. 160-167, 1988.
7. BENDER, F. E.; KRAMER, A.; KARAN, E. *Systems Analysis for the Food Industry*. Westport: AVI, 1976. p. 121-193.
8. BERTRAND, J. L.; MOROSOLI, R.; SHARECK, F. et al. Expression of the xylanase gene of *Streptomyces lividans* and production of the enzyme on natural substrates. *Biotechnol. Bioeng., New York*, v. 33, p. 791-794, 1989.
9. BIELY, P. Microbial xylanolytic systems. *Trends Biotechnol., Cambridge*, v. 3, n. 11, p. 286-290, 1985.
10. BIELY, P.; MARKOVIC, O.; MISLOVICOVÁ, D. Sensitive detection of endo-1,4- β -glucanases and endo-1,4- β -xylanases in gels. *Anal. Biochem., Duluth*, v. 144, p. 147-151, 1985.

11. BIELY, P.; MISLOVICOVÁ, D.; TOMAN, R. Soluble chromogenic substrates for the assay of endo-1,4- β -xylanases and endo-1,4- β -glucanases. *Anal. Biochem.*, Duluth, v. 144, p. 142-146, 1985.
12. BISWAS, S. R.; JANA, S. C.; MISHRA, A. K. et al. Production, purification, and characterization of xylanase from a hyperxylanolytic mutant of *Aspergillus ochraceus*. *Biotechnol. Bioeng.*, New York, v. 35, p. 244-251, 1990.
13. BISWAS, S. R.; MISHRA, A. K.; NANDA, G. Xylanase and β -xylosidase production by *Aspergillus ochraceus* during growth on lignocelluloses. *Biotechnol. Bioeng.*, New York, v. 31, p. 613-616, 1988.
14. BLAIN, J. A. Industrial enzyme production. In: SMITH, J. E.; BERRY, D. R. (ed.). *The filamentous fungi*. Great Britain: Edward Arnold, 1974. v. 3, cap 10, p. 193-211.
15. BREUIL, C.; WOJTCZAK, G.; SADDLER, J. N. Production and localization of cellulases and β -glucosidase from the thermophilic fungus *Thielavia terrestris*. *Biotechnol. Lett.*, Kew, v. 8, n. 9, p. 673-676, 1986.
16. BREUIL, C. and SADDLER, J. N. Comparison of the 3,5-dinitrosalicylic acid and Nelson-Somogyi methods of assaying for reducing sugars and determining cellulase activity. *Enzyme Microb. Technol.*, Stoneham, v. 7, p. 327-332, 1985.
17. BROWNELL, H. H.; YU, E. K. C.; SADDLER, J. N. Steam-explosion pretreatment of wood: effect of chip size, acid, moisture content and pressure drop. *Biotechnol. Bioeng.*, New York, v. 28, p. 792-801, 1986.
18. BUCHERT, J.; VIKARI, L.; LINKO, M. et al. Production of xylonic acid by *Pseudomonas fragi*. *Biotechnol. Lett.*, Kew, v. 8, n. 8, p. 541-546, 1986.
19. BUCHERT, J.; NIEMELA, K.; PULS, J. et al. Improvement in the fermentability of steamed hemicellulose hydrolysate by ion exclusion. *Process Biochem.*, Rickmansworth, p. 176-180, 1990.
20. CAMINAL, G.; LÓPEZ-SANTIN, J.; SOLA, C. Kinetic modeling of the enzymatic hydrolysis of pretreated cellulose. *Biotechnol. Bioeng.*, New York, v. 27, p. 1282-1290, 1985.

21. CAUCHON, N.; LEDUY, A. Novel process for the production of cellulolytic enzymes. *Biotechnol. Bioeng.*, New York, v. 27, p. 456-462, 1985.
22. CHEETHAM, P. S. J. The applications of enzymes in industry. In: WISEMAN, A. (ed.). *Handbook of enzyme biotechnology*. 2. ed. New York: Ellis Harwood limited, 1985. p. 274 - 379.
23. CHEN, L-F.; GONG, C-S. Fermentation of sugarcane bagasse hemicellulose hydrolysate to xilitol by a hydrolysate-acclimatized yeast. *J. Food Sci.*, Chicago, v. 50, p. 226-228, 1985.
24. CHEREMISINOFF, N. P.; CHEREMISINOFF, P. N.; ELLERBUSCH, F. Biomass: applications, technology and production. In: POWERS, P. N. (ed.). *Energy, power, and environment*. New York: Marcel Dekker, 1980, v. 5, p.
25. CHOCIAI, M. B. Pré-tratamento fosfórico de fitobiomassa residual e bioconversão de pentoses. Curitiba : UFPR, 1987 Tese (doutorado em bioquímica). Departamento de Bioquímica, UFPR, 1987.
26. CORRÊA, J. B. C.; ROMANOWSKI, S. M. M.; SIERAKOWSKI, M. R. et al. Ester-type lignin-xylan linkages in cell wall of stems of *Mimosa scabrella*. *An. Acad. bras. Cienc.*, Rio de Janeiro, v.59, p. 179-184, 1987.
27. COWLING, E.B.; KIRK, T. K. Properties of cellulose and lignocellulosic materials as substrates for enzymatic conversion processes. *Biotechnol. Bioeng. Symp.*, New York, v. 6, p. 95-123, 1976.
28. CRAWFORD, D. L.; PETTEY, T. M.; THEDE, B. M. et al. Genetic manipulation of lignolytic *Streptomyces* and generation of improved lignin-to-chemical bioconversion strains. *Biotechnol. Bioeng. Symp.*, New York, n. 14, p. 241-256, 1984.
29. DABBAH, R. Unconventional sources of nutrition may become necessary alternative solutions. If there is not enough land to feed the world's population : protein from microorganisms. *Food Technol.*, Chicago, v. 24, p. 659-666, 1970.

30. DEKKER, R. F. H. The utilization of autohydrolysis-exploded hardwood (*Eucalyptus regnans*) and softwood (*Pinus radiata*) sawdust for the production of cellulolytic enzymes and fermentable substrates. *Biocatalysis*, [s.l.], v. 1, p.63-75, 1987.
31. _____. Bioconversion of hemicellulose : aspects of hemicellulase production by *Trichoderma reesei* QM 9414 and enzymic saccharification of hemicellulose. *Biotechnol. Bioeng.*, New York, v. 25, p. 1127-1146, 1983.
32. _____. Enzymatic hydrolysis of biomass. In: SEMINARIO DE HIDROLISE ENZIMATICA DE BIOMASSAS, 2, Maringá, 1985. *Anais... Maringá* :[s.n.] , 1985. v.1, p. 55-82.
33. _____. Ethanol production from D-xylose and other sugars by the yeast *Pachysolen tannophilus*. *Biotechnol. Lett.*, Kew, v. 4, p. 411-416, 1982.
34. _____. A set of lectures. In: SEMINARIO DE HIDROLISE ENZIMATICA DE BIOMASSAS, 2, Maringá, 1985. *Anais... Maringá*: [s.n.], 1985.
35. _____. Bioconversion of hemicellulose into ethanol. In : INTERNATIONAL UNION OF BIOCHEMISTRY CONGRESS, 12, Perth, 1985. *Anais... Perth*, 1985.
36. _____. The hemicellulase group of enzymes. In : Polysaccharides in Food. London: Butterworths, 1979. p. 93-108.
37. _____. Steam explosion: an effective pretreatment method for use in the bioconversion of lignocellulosic materials In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON : STEAM EXPLOSION TECHNIQUES, Milano, 1988, p. 20-21. Conferência "in press".
38. _____. Biodegradation of the hemicelluloses. In: HIGUCHI, T. (ed.). *Biosynthesis and biodegradation of wood components*. New York: Academic Press; 1985. cap. 18, p. 505-533.
39. DEKKER, R. F. H.; KARAGEORGE, H.; WALLIS, A. F. A. Pre - treatment of hardwood (*Eucalyptus regnans*) sawdust by autohydrolysis explosion and its saccharification by *Trichoderma* cellulases. *Biocatalysis*, [s.l.], v. 1, p. 47-61, 1987.

40. DEKKER, R. F. H.; RICHARDS, G. N. Structures of the oligosaccharides from the enzymic hydrolysis of hemicellulose by a hemicellulase of *Ceratocystis paradoxa*. *Carbohydr. Res.*, Amsterdam, v. 43, p. 335-344, 1975.
41. _____. Production of hemicellulases by three fungi pathogenic to sugar cane. *Carbohydr. Res.*, Amsterdam, v. 38, 257-265, 1974.
42. _____. Purification, properties, and mode of action of hemicellulase I produced by *Ceratocystis paradoxa*. *Carbohydr. Res.*, Amsterdam, v. 39, p. 97-114, 1975.
43. _____. Purification, properties, and mode of action of hemicellulase II produced by *Ceratocystis paradoxa*. *Carbohydr. Res.*, Amsterdam, v. 42, p. 107-123, 1975.
44. DEKKER, R. F. H.; RICHARDS, G. N. Hemicellulases: their occurrence, purification, properties, and mode of action. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, San Diego, v. 32, p. 277-352, 1976.
45. DEKKER, R. F. H.; RICHARDS, G. N.; SHAMBE, T. Comparative properties and action patterns of the hemicellulases from the phytopathogens *Ceratocystis paradoxa* and *Cephalosporium sacchari*. *Biochem. Soc. Trans.*, Colchester, v. 3, p. 1081-1082, 1975.
46. DEKKER, R. F. H.; WALLIS, A. F. A. Autohydrolysis-explosion as pretreatment for the enzymic saccharification of sunflower seed hulls. *Biotechnol. Lett.*, Kew, v. 5, n. 5, p. 311-316, 1983.
47. _____. Enzymic saccharification of sugarcane bagasse pretreated by autohydrolysis-steam explosion. *Biotechnol. Bioeng.*, New York, v. 25, p. 3027-3048, 1983.
48. DESHPANDE, V.; LACHKE, A.; MISHRA, C. et al. Mode of action and properties of xylanase and β -xylosidase from *Neurospora crassa*. *Biotechnol. Bioeng.*, New York, v. 28, p. 1832-1837, 1986.
49. DONNELLY, B. J.; HELM, J. L.; LEE, H. A. The carbohydrate composition of corn cob hemicelluloses. In : ANNUAL MEETING CHEMIST, GENETICIST, AND ENZYMOLOGIST, CORN PRODUCTS, Miami, 1972. Meeting... Minesota, 1973. p.548-552

50. DUBEAU, H.; CHAHAL, D. S.; ISHAQUE, M. Production of xylanases by *Chaetomium cellulolyticum* during growth on lignocelluloses. *Biotechnol. Lett.*, Kew. v. 8, n. 6, p. 445-448, 1986.
51. DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K. et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.*, Washington, v. 28, p. 350-356, 1956.
52. DUNLAP, C. E.; CALLIHAN, C. D. Microbial protein production from sugar cane bagasse. *Sugar J.*, New Orleans, v. 32, n. 2, p. 13-16, 1969.
53. DURAN, N.; RODRIGUEZ, J.; FERRAZ, A. et al. *Chrysonila sitophita* (TFB-27441): a hyperlignolytic strain. *Biotechnol. Lett.*, Kew, v. 9, n. 5, p. 357-360, 1987.
54. EGGINS, H. O. W.; ALLSOPP, D. Biodeterioration and biodegradation by fungi. In: SMITH, J. E.; BERRY, D. R. (ed.). *The Filamentous Fungi*. Great Britain: Edward Arnold, 1974. V. 3, cap. 15, p. 301-319.
55. FAN, L. T.; GHARPURAY, M. M.; LEE, Y. H. The nature of lignocellulosics and their pretreatments for enzymatic hydrolysis. *Adv. Biochem. Eng.*, Berlin, v. 23, p. 157 - 187, 1982.
56. FARKAS, V.; LISKOVA, M.; BIELY, P. Novel media for detection of microbial producers of cellulase and xylanase. *FEMS. Microbiol. Lett.*, Amsterdam, v. 28, p. 137-140, 1985.
57. FLICKINGER, M. C.; TSAO, G. T. Fermentation substrates from cellulosic Materials. In: ANNUAL Reports on Fermentation Processes. New York: Academic Press, 1978. v. 2, p. 23-42.
58. FONTANA, J. D.; CORREA, J. B. C.; DUARTE, J. H. et al. Aqueous phosphoric acid hydrolysis of hemicelluloses from sugarcane and sorghum bagasses. *Biotechnol. Bioeng. Symp.*, New York, n.14, p. 177-186, 1984.
59. FONTANA, J. D.; BARBOSA, A. M.; GEBARA, M. et al. Xylan spectroscopy and spectrophotometry. *Biotechnol. Techn.*, Kew, v. 4, n. 1, p. 35-38, 1990.

60. FOURNIER, A. R.; FREDERICK, M. M.; FREDERICK, J. R. et al. Purification and characterization of endo-xylanases from *Aspergillus niger*. III. An enzyme of pl 3.65. *Biotechnol. Bioeng.*, New York, v. 27, p. 539-546, 1985.
61. GHOSH, V. K.; DEB, J. K. Production and characterization of xylanase from *Thielaviopsis basicola*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, Heidelberg, v. 29, p. 44-47, 1988.
62. GODDEN, B.; LEGON, T.; HELVESNSTEIN, P. et al. Regulation of the production of hemicellulolytic and cellulolytic enzymes by a *Streptomyces* sp. growing on lignocellulose. *J. Gen. Microbiol.*, Reading, v. 135, p. 285-292, 1989.
63. GOKHALE, D.V.; PUNTAMBEKAR, U. S.; DEOBAGKAR, D. N. Xylanase and β -xylosidase production by *Aspergillus niger* NCIM 1207. *Biotechnol. Lett.*, Kew, v. 8, p. 137-138, 1986.
64. GOLDSTEIN, I. S. Chemicals from cellulose. In: GOLDSTEIN, I. S. *Organic Chemicals from Biomass*. Boca Raton: CRC Press, 1981. P. 102-124.
65. GOLDSTEIN, I. S. *Organic Chemicals from Biomass*. Boca Raton : CRC Press, 1981, p. 10-18: Composition of biomass.
66. GONG, C. S.; CHEN, L. F.; FLICKINGER, M. C. et al. Conversion of hemicellulose carbohydrates. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, Berlin, v. 20, p. 93-118, 1981.
67. HARTREE, E. F. Determination of protein : a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Anal. Biochem.*, Duluth, v. 48, p. 422-427, 1972.
68. HENIKA, R. G. ; PALMER, G. M. Response surface methodology: revised. In: ANNUAL MEETINGS AMERICAN ASSOCIATION OF CEREAL CHEMISTS, 1976. New Orleans. 14 p.
69. HESPELL, R. B.; WOLF, R.; BOTHAST, R. J. Fermentation of xylans by *Butyrivibrio fibrisolvens* and other ruminal bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, Washington. v. 53, n.12, p.2849-2853, 1987.
70. HOFFMAN, R. M.; WOOD, T. M. Isolation and partial characterization of a mutant of *Penicillium funiculosum* for the saccharification of straw. *Biotechnol. Bioeng.*, New York, v. 27, p. 81-85, 1985.

71. HRMOVÁ, M.; BIELY, P.; VRSANSKÁ, M. Specificity of cellulase and β -xylanase induction in *Trichoderma reesei* QM 9414. Arch. Microbiol., Heidelberg, v. 144, p. 307-311, 1986.
72. ISHIHARA, M.; SHIMIZU, K.; ISHIHARA, T. Hemicellulases of brown rotting fungus, *Tyromyces palustris*. III. Mokuzai Gakkaishi, Bunkyo-ku, v. 24, n. 2, p. 108-115, 1978.
73. JOHNSON, K. G.; HARRISON, B. A; SCHNEIDER, H. et al. Xylan-hydrolysing enzymes from *Streptomyces spp.* Enzyme Microb. Technol., Stonehan, v. 10. p. 403-409, 1988.
74. KABAT, E. A. ; MAYER, M. M. Kjeldahl nitrogen determination. In : Experimental Imunochemistry. Illinois: Bannertone house, 1964. p. 476-483.
75. KIRK, T. K.; HIGUCHI, T.; CHANG, H. Lignin biodegradation: Microbiology, chemistry, and potencial applications. 2. ed. Boca Raton: CRC Press, 1981. 2 v.
76. KITPREECHAVANICH, V.; HAYASHI, M.; NAGAI, S. Purification and characterization of extracellular β -xylosidase and β -glucosidase from *Aspergillus fumigatus*. Agric. Biol. Chem., Bunkyo-ku, v. 50, n. 7, p. 1703-1711, 1986.
77. KLING, S. H. Pré-tratamento de materiais lignocelulósicos e seu efeito sobre a sacarificação enzimática. In : SEMINARIO DE HIDROLISE ENZIMATICA DE BIOMASSAS, 2, Maringá, 1985. Anais... Maringá: [s.n.], 1985. v. 1, p. 214 .
78. KLING, S. H.; BARBOSA, M. F. S.; OLIVEIRA, W. Aproveitamento integral dos resíduos lignocelulósicos, em particular do bagaço de cana-de-açúcar. In : SEMANA DE FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA "Jaime Rocha de Almeida", 4, Piracicaba , 1985. Anais... Piracicaba : ESALQ, 1985.
79. KOSARIC, N.; WIECZOREK, A.; COSENTINO, G. P. et al. Ethanol In: REHM, H.J.; REED, G. (ed.). Biotechnology. London , 1987. v.3, p. 257-385.
80. LEATHERS, T. D. Purification and properties of xylanase from *Aureobasidium*, J. Ind. Microbiol., Amsterdam, v. 4, p. 341-348, 1989.

81. LEATHERS, T.D.; KURTZMAN, C. P.; DETROY, R. W. Overproduction and regulation of xylanase in *Aureobasidium pullulans* and *Cryptococcus albidus*. *Biotechnol. Bioeng., Symp.*, New York, n. 14, p. 225-239, 1984.
82. LLANOS, B. R. H.; CUÉ, L. L. Hidrólisis enzimática de las hemicelulosas del bagazo de la caña de azúcar. *Rev. Cién. Biol.*, Marianao, v. 14, n. 1, p. 1-9, 1983.
83. LOWRY, O.; ROSENBROUGH, N. J.; FARR, L. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, Baltimore, v. 193, p. 265-275, 1961.
84. MACKENZIE, C. R.; BILOUS, D. Ferulic acid esterase activity from *Schizophyllum commune*. *Appl. Environ. Microbiol.*, Washington, v. 54, n. 5, p. 000-000, 1988.
85. MACKENZIE, C. R.; BILOUS, D.; SCHNEIDER, H. et al. Induction of cellulolytic and xylanolytic enzyme systems in *Streptomyces* spp. *Appl. Environ. Microbiol.*, Washington, v. 53, n.12, p. 2835-2839, 1987.
86. MAGEE, R. J.; KOSARIC, N. Bioconversion of hemicellulosics. In: *AGRICULTURAL FEEDSTOCK AND WASTE TREATMENT AND ENGINEERING*. Berlin: Springer-Verlag, 1985. P. 61-93.
87. MAMERS, H.; MENZ, D. N. J. Explosion pretreatment of *Pinus radiata* woodchips for the production of fermentation substrates. *Appita*, Parkville, v. 37, n. 8, p. 644-649, 1984.
88. MAMERS, H.; MENZ, D.; YURITTA, J. P. Explosion pulping of bagasse. *Proc. Aust. Soc. Sugar Cane Technol.*, Brisbane, p. 225-232, 1981.
89. MANDELS, M.; ANDREOTTI, R.; ROCHE, C. Measurement of Saccharifying cellulase, *Biotechnol. Bioeng., Symp.*, New York, n.6, p. 21-33, 1976.
90. MANDELS, M. Enzymatic conversion of cellulosic biomass : a viable alternative to ethanol from grain. *Amer. Soc. Microbiol.*, [s.l.], v. 47, n. 4, p. 174-178, 1981.
91. MANDELS, M.; STEMBERG, D. Recent advances in cellulases technology. *Ferment. Technol.*, Suita-chi, v. 54, p. 267-286, 1976.

92. MARGARITIS, A.; BAJPAI, P. Direct fermentation of D-xylose to ethanol by *Kluyveromyces marxianus* strains. *Appl. Environ. Microbiol.*, Washington, v. 44, n. 5, p. 1039-1041, 1982.
93. _____. Production and thermal stability characteristics of cellulase and xylanase enzymes from *Thielavia terrestris*. *Biotechnol. Bioeng., Symp.*, New York, v. 13, p. 299-314, 1983.
94. MCCARTHY, A. J. Lignocellulose-degrading Actinomycetes. *FEMS Microbiol. Reviews*, Amsterdam, v. 46, n. 2, p. 145-163, 1987.
95. MCCRAE, S. I.; FALCONER, D. J.; WOOD, T. M. Hydrolysis of the polysaccharides of straw by enzymes produced by a mutant strain of the fungus *Penicillium pinophilum*. *Biotechnol. Bioeng.*, New York, v. 33, p. 422-427, 1989.
96. MILAGRES, A. M. F. Alguns aspectos da regulação de beta-xilanases extracelulares de *Penicillium janthinellum*. Viçosa: UFV, 1988. Dissertação (mestrado). Departamento de Biologia Geral da Universidade Federal de Viçosa, 1988.
97. MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.*, Washington, v.31, p.426-428, 1958.
98. MOHAGHEGHI, A.; GROHMANN, K.; WYMAN, C. E. Production of cellulase on mixtures of xylose and cellulose in a fed-batch process. *Biotechnol. Bioeng.*, New York, v. 35, p. 211-216, 1990.
99. MOO-YOUNG, M.; CHAHAL, D. S.; VLACH, D. Single cell protein from various chemically pretreated wood substrates using *Chaetomium cellulolyticum*. *Biotechnol. Bioeng.*, New York, v. 20, p. 107-118, 1978.
100. NELSON, N. A Photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *J. Biol. Chem.*, Baltimore, v.153, p. 375-380, 1944.
101. NUMMI, M.; PERRIN, J-M.; NIKU-PAAVOLA, M-L. et al. Measurement of xylanase activity with insoluble xylan substrate. *Biochem. J.*, London, v. 226, p. 617- 620, 1985.

102. OBARA, S. M. Determinação das condições de crescimento micelial e de frutificação do *Pleurotus ostreatus* (Jac. ex. Fr.) Kummer em bagaço de cana de açúcar. Londrina UEL, 1991. Dissertação (mestrado) Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Estadual de Londrina, 1991.
103. O'DWYER, M. H. The hemicelluloses. Part IV. The hemicelluloses of beech wood. *Biochem. J.*, London, v.20, p. 656 - 664, 1926.
104. PARK, T. K. Produção de enzimas. In: LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. *Biotechnologia: Tecnologia das Fermentações*. 2.ed. São Paulo: Edgard Blücher, 1985. 285 p., v. 1, cap. 9. p. 182-211.
105. PERSSON, I.; TJERNELD, F.; HAHN-HAGERDAL, B. Fungal cellulolytic enzyme production: A review. *Process Biochem.*, Rickmansworth, v. 26, p. 65-74, 1991.
106. PORTER, R. *Microbial processes: promising technologies for developing countries*. Washington: National Academy of Sciences, 1979. 311 p.
107. POURQUI, J.; VANDECASTEELE, J. P. Conversão dos compostos lignocelulósicos por hidrólise enzimática e fermentação acetona-butanol. In: SCRIBAN, R. (coord.) *Biotechnologia*. São Paulo: Manole, 1984. 489 p. p. 427-440.
108. POUTANEN, K.; RATTO, M.; PULS, J. et al. Evaluation of different microbial xylanolytic systems. *J. Biotechnol.*, Amsterdam, v. 6, p. 49-60, 1987.
109. PRIEST, F. G. *Extracellular enzymes*. Washington : American Society for Microbiology, 1984. V. 9, 79 p.
110. PURI, V. P.; PEARCE, G. R. Alkali-explosion pretreatment of straw bagasse for enzymic hydrolysis. *Biotechnol. Bioeng.*, New York, v. 28, p. 480-485, 1986.
111. RAJARATHNAM, S ; BANO, Z. *Pleurotus mushrooms*. Part III Biotransformations of natural lignocellulosic wastes: commercial applications and implications. *CRC. Crit. Rev. Food Sci. and Nutr.*, Boca Raton, v. 28, n. 1, p. 31-113, 1989.
112. RATLEDGE, C. Fermentation substrates. In: *ANNUAL Reports on Fermentation Processes..* New York : Academic Press, 1978, v. 2 , p. 49-71.

113. REID, J. S. G.; WILKIE, K. C. B. Polysaccharides of the oat plant in relationship to plant growth. *Phytochemistry*, Oxford, v. 8, p. 2045-2051, 1969.
114. REZENDE, M. I.; SATAQUE, E. Y.; BARBOSA, A. M. et al. Avaliação da extração de xilanase produzida pelo *T. harzianum* em bagaço de cana através de fermentação em fase sólida. *Rev. Microbiol.*, São Paulo, v. 22, n. 3, Supl. 1, p. 24, 1991.
115. ROBERTO, I. C.; LACIS, L. S.; BARBOSA, M. F. S. et al. Utilization of sugar cane bagasse hemicellulosic hydrolysate by *Pichia stipitis* for the production of ethanol. *Process Biochem.*, Rickmansworth, v. 26, p. 15-21, 1991.
116. RODRÍGUEZ J.; DURÁN, N. Some new aspects of enzymatic lignin biodegradation. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, Ribeirão Preto, v. 21, p. 411-422, 1988.
117. ROSNAY, J. O futuro: aspectos científicos, tecnológicos e econômicos. In: SCRIBAN, R. (coord.). *Biotecnologia*. São Paulo: Manole, 1984, 489 p. p. 453-471.
118. SADLLER, J. N.; BROWNELL, H. H.; CLERMONT, L. P. et al. - Enzymatic hydrolysis of cellulose and various pretreated wood fractions. *Biotechnol. Bioeng.*, São Paulo, v. 24, p. 1389--1402, 1982.
119. SANDHU, D. K.; KAUR, B.; SIDHU, M. S. et al. Association of *Aspergillus fumigatus* with sugar-cane bagasse, biochemical and physiological studies. *Trans. Br. Mycol Soc.*; Cambridge, v. 81, n. 2, p. 213-219, 1983.
120. SASSON, A. *Biotechnologies: challenges and promises*, UNESCO. Paris: Imprimerie des Presses Universitaires de France, 1984. 315 p.
121. SENIOR, D. J.; SADDLER, J. N. Production and application of xylanases from *Trichoderma harzianum*. In: TRICEL SYMPOSIUM, 89, Vienna, 1989. *Proceedings...* Cambridge, 1990 p. 47-59.
122. SHARMA, A.; MILSTEIN, O.; VERED, Y. et al. Effects of aromatic compounds on hemicellulose-degrading enzymes in *Aspergillus japonicus*. *Biotechnol. Bioeng.*, New York, v. 27, p. 1095-1101, 1985.

123. SIMPSON, F. J. Microbial pentosanases. III Some factor affecting the production of pentosanases by *Aspergillus niger* and *Trichoderma viride*. *Can. J. Microbiol.*, Ottawa, v. 5, p. 99-107, 1959.
124. SIOUMIS, A. A. *Technology Research Reviews*. Melbourne, 1984. p. 55-62: Recovery of alcohols - a novel approach.
125. SOMOGYI, M. A new reagent for the determination of sugars. *J. Biol. Chem.*, Baltimore, v. 160, p. 61-68, 1945.
126. STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM. *User's Guide; Statistic* 5 ed., Cary, 1985, p. 956.
127. STEWART, J. C.; LESTER, A.; MILBURN, B. et al. Xylanase and cellulase production by *Aspergillus fumigatus* Fresenius. *Biotechnol. Bioeng.*, New York, v. 5, p. 543-548, 1983.
128. SUIHKO, M-L. The fermentation of different carbon sources by *Fusarium oxysporum*. *Biotechnol. Lett.*, Kew, v. 5, n. 11, p. 721-724, 1983.
129. SZCZODRAK, J. The use of cellulases from a β -glucosidase-hyperproducing mutant of *Trichoderma reesei* in simultaneous saccharification and fermentation of wheat straw. *Biotechnol. Bioeng.*, New York, v. 33, p. 1112-1116, 1989.
130. THOMAS, K. N. G.; ZEIKUS, J. G. Comparison of extracellular cellulase activities of *Clostridium thermocellum* LQRI and *Trichoderma reesei* QM 9414. *Appl. Environ. Microbiol.*, Washington, v. 42, n. 2, p. 231-240, 1981.
131. TIEN, M.; KIRK, T. K. Lignin-degrading enzyme from *Phanerochaete chrysosporium*: purification, characterization, and catalytic properties of a unique H_2O_2 -requiring oxygenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Washington, v. 81, p. 2280-2284, 1984.
132. TIMELL, T. E. Wood hemicelluloses: Part I. *Adv. Carbohydr. Chem.*, New York, v. 19, p. 247-302, 1964.
133. TIMELL, T. E. Wood hemicelluloses: Part II. *Adv. Carbohydr. Chem.*, New York, v. 20, p. 410-483, 1965.
134. TREVELYAN, W. E.; PROCTER, D. P.; HARRISON, J. S. Detection of sugars on paper chromatograms. *Nature*, London, v. 166, p. 444-445, 1950.

135. URIETA, A. B.; TOMA, M.; PARK, Y. K. Estudo Comparativo da produção de celulase fúngica por fermentação submersa e por cultura semi-sólida, *Rev. Bras. Tecnol.*, v. 6, p. 181-188, 1975.
136. VAN ZYL, W. H. A study of the cellulases produced by three mesophilic actinomycetes grown on bagasse as substrate. *Biotechnol. Bioeng.*, New York, v. 27, p. 1367-1373, 1985.
137. VIDAURRE, T. J. C. Otimização do processo de pré-tratamento do bagaço de cana-de-acucar com peróxido de hidrogênio alcalino e sua hidrólise por enzimas celulolíticas. Dissertação (mestrado) Departamento de Tecnologia de Alimentos e Medicamentos da Universidade Estadual de Londrina, 1991.
138. VOGEL, H. J. A convenient growth medium for *Neurospora crassa*. *Genet. Bull.*, [s.l.], v. 13, p. 42-43, 1956.
139. WANKHEDE, D. B.; VIJAYALAKSHMI, K. R.; RAO, M. R. R. R. Isolation, purification, and some of the properties of hemicellulase from *Fusarium sp.* *Carbohydr. Res.*, Amsterdam, v. 96, p. 249-257, 1981.
140. WATSON, T. G.; NELLIGAN, I. Pilot scale production of cellulase by *Trichoderma reesei* (RUT C-30). *Biotechnol. Lett.*, Kew, v. 5, n. 1, p. 25-28, 1983.
141. WATSON, T. G.; NELLIGAN, I.; LESSING, L. Cellulase production by *Trichoderma reesei* (RUT-C30) in fed-batch culture. *Biotechnol. Lett.*, Kew, v. 6, n. 10, p. 667-672, 1984.
142. WILKIE, K.C B. New perspectives on non-cellulosic cell-wall polisaccharides of land plants. In: *Biochemistry of Plant Cell*. Cambridge : Cambridge University Press, 1985, p. 1-37.
143. _____. The hemicelluloses of grasses and cereals. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, San Diego, v. 36, p. 215-264, 1979.
144. WONG, K. K. Y.; DEVERELL, K. F.; MACKIE, K. L. et al. The relationship between fiber porosity and cellulose digestibility in steam-exploded *Pinus radiata*. *Biotechnol. Bioeng.*, New York, v.31, p. 447-456, 1988.

145. WOOD, B. J. B.; MIN, Y. F. Oriental food fermentations. In: SITH, J. E.; BERRY, D. R. (ed.). The Filam. Fungi. Great Britain: Edward Arnold, 1974. V. 3, cap. 13, p. 265-280.

146. WOODWARD, J. Xylanases: functions, properties and applications. In: Top. Enzyme Ferment. Biotechnol., Chichester, v.8, n. 2, p. 9-30, 1984.