

**CONDIÇÕES DE PRODUÇÃO E ATIVIDADE DA CELULASE
DO FUNGO *Aspergillus* sp E DE SEUS MUTANTES
ISOLADOS DE BAGAÇO DE CANA**

LINA SILBER SCHMIDT VITTI

Orientador: Prof. Dr. DARCY MARTINS DA SILVA

Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Agronomia. ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: Energia Nuclear na Agricultura.

**PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Dezembro - 1988**

Aos meus pais e irmãos,

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos os que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, e em especial às seguintes pessoas:

- Ao *Prof. Dr. Darcy Martins da Silva*, pelo incentivo e orientação na execução do trabalho;
- Ao *CNPq, CNEN e FAPESP*, pelo apoio financeiro;
- Aos colegas *Márcia Cristina da Silva* e *Mônica Lanzoni*, da Seção de Fitovirologia e Microscopia Eletrônica do CENA, pelo valioso auxílio na condução do experimento;
- À *Divisão de Ciências Animais* do CENA, pelo auxílio prestado;
- Ao *Prof. José Roberto Môro*, pelo auxílio nas análises estatísticas.

S U M Á R I O

	PÁGINA
RESUMO	xii
SUMMARY.	xiv
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.	4
2.1. Seleção de novos microrganismos celulolíti- cos.	4
2.2. Produção de enzimas celulolíticas	7
2.2.1. Influência do meio de cultura.	7
2.2.2. Influência do pH e da temperatura.	11
2.2.3. Influência do inóculo e período de incubação.	13
2.2.4. Influência do tipo e concentração do substrato.	16
2.3. Obtenção de mutantes.	22
2.4. Utilização de enzimas celulolíticas	25
3. MATERIAL E MÉTODOS.	29
3.1. Meio de cultivo para isolamento de micror- ganismos do bagaço de cana.	29
3.2. Meio básico para produção de enzimas celulo- líticas.	29
3.3. Bagaço de cana usado como substrato.	30

3.4.	Isolamento e manutenção das culturas.	31
3.5.	Preparo do inóculo.	32
3.6.	Preparo do caldo enzimático	32
3.7.	Determinação da atividade enzimática.	33
3.7.1.	Celulase total (FPA)	33
3.7.2.	β -glucosidase.	33
3.7.3.	Carboximetilcelulase (CMCase).	34
3.8.	Determinação de proteínas solúveis.	35
3.9.	Seleção para obtenção de cepa com maior capacidade celulolítica.	36
3.10.	Influência das condições experimentais na produção de enzimas celulolíticas	36
3.10.1.	Faixa de temperatura.	37
3.10.2.	Faixa de pH.	37
3.10.3.	Concentração de bagaço de cana tratado.	38
3.10.4.	Curva de incubação.	38
3.11.	Comparação do fungo isolado e <i>Trichoderma reesei</i> QM 9414.	38
3.12.	Curva de sobrevivência a radiação gama e obtenção de mutantes morfológicos celulolíticos.	39
4.	RESULTADOS.	42
4.1.	Seleção para obtenção de cepa com maior capacidade celulolítica.	42

4.2. Avaliação das condições experimentais para a produção de enzimas celulolíticas pelo fungo <i>Aspergillus</i> sp.	44
4.3. Produção de enzimas celulolíticas pelo fungo <i>Trichoderma reesei</i> QM 9414	58
4.4. Comparação entre o isolado <i>Aspergillus</i> sp e o padrão <i>Trichoderma reesei</i> QM 9414	61
4.5. Sobrevivência de conídios de <i>Aspergillus</i> sp expostos a radiação gama e obtenção de mutantes morfológicos.	67
4.6. Testes de atividade enzimática para os mutantes morfológicos obtidos por irradiação de conídios do fungo <i>Aspergillus</i> sp.	71
5. DISCUSSÃO.	81
5.1. Seleção para obtenção de cepa com maior capacidade celulolítica.	81
5.2. Avaliação das condições experimentais na produção de enzimas celulolíticas.	82
5.3. Produção de celulase pelo fungo <i>Trichoderma reesei</i> QM 9414	89
5.4. Comparação entre o isolado <i>Aspergillus</i> sp e o padrão <i>Trichoderma reesei</i> QM 9414	90
5.5. Obtenção de mutantes utilizando fonte de radiação gama (^{60}Co)	92
6. CONCLUSÕES.	95
7. LITERATURA CITADA.	97

LISTA DE TABELAS

TABELA		PÁGINA
1	- Estudo comparativo e análise de variância da atividade extracelular total da celulase (FPA) e β -glucosidase de fungos isolados de bagaço de cana crescidos a 40°C em meio básico líquido pH 5,0 durante 96 horas..	43
2	- Atividade extracelular total da celulase (FPA) e β -glucosidase do fungo <i>Aspergillus</i> sp crescido em meio básico líquido, pH 5,0, em diferentes temperaturas, após 96 horas de incubação e a análise de variância. . .	45
3	- Atividade extracelular total da celulase (FPA) e β -glucosidase do fungo <i>Aspergillus</i> sp crescido em meio básico líquido a 35°C e em diferentes pHs após 96 horas de incubação e a análise de variância. . .	49
4	- Atividade extracelular total da celulase (FPA) e β -glucosidase do fungo <i>Aspergillus</i> sp crescido em meio básico líquido a 35°C, pH 6,0, em diversas concentrações de bagaço de cana, após 96 horas de incubação e a análise de variância. . . .	52

TABELA

PÁGINA

5	-	Atividade extracelular total da celulase (FPA) e β -glucosidase durante um período de 10 dias de incubação do fungo <i>Aspergillus</i> sp em meio básico líquido, pH 6,0, 35 ^o C, concentração de bagaço de cana de 15 gramas/litro de meio de cultura e a análise de variância.	55
6	-	Atividade extracelular total da celulase (FPA) e β -glucosidase do fungo <i>Trichoderma reesei</i> QM 9414 crescido em meio básico líquido, pH 5,0, 28 ^o C e concentração de bagaço de cana de 15 gramas/litro de meio de cultura, em 10 dias de desenvolvimento e a análise de variância.	59
7	-	Número de colônias e porcentagem de sobrevivência do fungo <i>Aspergillus</i> sp quando esporos foram expostos a radiação gama (Co-60) com taxa de dose 1,5 kGy/hora, com doses de 0; 0,1; 0,2; 0,4; 0,8 e 1,0 kGy.	68
8	-	Atividade extracelular total da celulase (FPA) dos mutantes M0, M1 e M2 quando comparados com o selvagem (S) e a análise de variância.	72

TABELA

PÁGINA

9	-	Atividade específica extracelular total da celulase (FPA) dos mutantes M0, M1 e M2 quando comparados com o selvagem (S) e a análise de variância.	73
10	-	Atividade celulolítica β -glucosidase dos mutantes M0, M1 e M2 quando comparados com o selvagem (S) e a análise de variância..	74
11	-	Atividade específica β -glucosidase dos <u>mu</u> tantes M0, M1 e M2 quando comparados com o selvagem (S) e a análise de variância.	75

FIGURA

- | | | |
|---|---|----|
| 1 | - Atividade celulolítica total da celulase (FPA) e β -glucosidase do isolado <i>Aspergillus</i> sp, crescido em meio básico líquido, pH 5,0, em diferentes temperaturas após 96 horas de incubação. | 46 |
| 2 | - Atividade celulolítica total (FPA) e β -glucosidase do isolado <i>Aspergillus</i> sp, crescido em meio básico líquido, a 35°C, em diferentes pHs, após 96 horas de incubação. | 50 |
| 3 | - Atividade extracelular total da celulase (FPA) do fungo <i>Aspergillus</i> sp, crescido em meio básico líquido, a 35°C, pH 6,0 e em diversas concentrações de bagaço de cana tratado, após 96 horas de incubação. | 53 |
| 4 | - Atividade celulolítica total (FPA) e β -glucosidase em um período de 10 dias de incubação do fungo <i>Aspergillus</i> sp em meio básico líquido | 56 |
| 5 | - Atividade celulolítica total (FPA) e β -glucosidase durante um período de 10 dias de incubação do fungo <i>Trichoderma reesei</i> QM 9414, em meio básico líquido, pH 5,0; 28°C e 15 gramas de bagaço de cana/litro de meio de cultura. | 60 |

FIGURA

PÁGINA

- 6 - Comparação da atividade celulolítica total (FPA) entre o fungo *Aspergillus* sp cultivado a 35°C, pH 6,0 e o *Trichoderma reesei* QM 9414 cultivado a 28°C, pH 5,0, em uma concentração de bagaço de cana de 15 gramas/litro de meio básico líquido durante 10 dias de incubação. 62
- 7 - Comparação entre a atividade específica total (FPA) do fungo *Aspergillus* sp cultivado em meio básico líquido a 35°C, pH 6,0 e do fungo *T. reesei* QM 9414, cultivado a 28°C, pH 5,0, utilizando concentração de bagaço de cana de 15 gramas/litro de meio básico, durante um período de 10 dias. 63
- 8 - Comparação entre a atividade celulolítica β -glucosidase do fungo *Aspergillus* sp cultivado a 35°C, pH 6,0 e do fungo *T. reesei* QM 9414, cultivado a 28°C, pH 5,0 em meio básico líquido com concentração de bagaço de cana de 15 gramas/litro de meio de cultura por 10 dias. 64
- 9 - Comparação da atividade específica β -glucosidase entre o fungo *Aspergillus* sp cultivado a 35°C, pH 6,0, concentração de bagaço de cana 15 gramas/litro de meio básico líquido e o fungo *T. reesei* QM9414, cultivado a 28°C, pH 5,0, concentração de bagaço de cana de 15 gramas/litro de meio básico, durante 10 dias. 65

FIGURA

PÁGINA

10	-	Curva de sobrevivência do fungo <i>Aspergillus</i> sp exposto à radiação gama (Co-60), com uma taxa de dose de 1,5 kGy/hora e doses de 0; 0,1; 0,2; 0,4; 0,8; 1,0 kGy. . . .	69
11	-	Aspecto das colônias do selvagem e dos mutantes denominados de M0, M1, M2, M3 e M4, obtidos quando esporos do fungo <i>Aspergillus</i> sp foram irradiados a diversas doses de radiação em fonte de Co-60 (Taxa de dose = 1,5 kGy/h).	70
12	-	Atividade celulolítica total (FPA) para os fungos M0, M1, M2 e selvagem quando desenvolvidos em meio básico líquido pH 6,0, 35°C e concentração de bagaço de cana de 15 gramas/litro de meio de cultura..	79
13	-	Comparação entre a atividade β -glucosidase dos fungos M0, M1, M2 e selvagem, quando desenvolvidos em meio básico líquido, pH 6,0, 35°C e concentração de bagaço de cana de 15 gramas/litro de meio de cultura	80

CONDIÇÕES DE PRODUÇÃO E ATIVIDADE DA CELULASE DO FUNGO
Aspergillus sp E DE SEUS MUTANTES ISOLADOS DE BAGAÇO DE CANA

AUTORA: *Lina Silber Schmidt Vitti*

ORIENTADOR: Prof. Dr. Darcy Martins da Silva

RESUMO

Neste trabalho testou-se a capacidade de produção e atividade total da celulase (FPA), β -glucosidase e carboximetilcelulase (CMCase) em 5 fungos isolados de bagaço de cana.

Os fungos foram cultivados em meio básico líquido, utilizando-se bagaço de cana como substrato. Testou-se a seguir a atividade enzimática de seus filtrados. Entre os cinco fungos foi selecionada uma espécie de *Aspergillus* que se mostrou a mais promissora.

Essa espécie foi submetida a diferentes condições de pH, temperatura, concentração de substrato e período de incubação para melhor produção de celulase.

Os resultados obtidos permitiram identificar as seguintes condições como as melhores para a produção dos componentes enzimáticos:

- Faixa de pH: 7,0 para FPA e 6,0 para atividade β -glucosidase.

.xiii.

- Faixa de temperatura: 45^oC para FPA e 35^oC para β -glucosidase.
- Concentração de substrato: 15 gramas/litro de meio de cultura para FPA. Com relação à β -glucosidase não houve diferenças significativas quando se testou concentrações de substrato na faixa de 5 a 25 gramas/litro de meio de cultura.
- Período de incubação: no 10^o dia de desenvolvimento em meio básico líquido foram observadas as maiores atividades FPA e β -glucosidase.

Não foi detectada atividade carboximetilcelulase em nenhuma das condições experimentadas.

O *Aspergillus* sp selecionado foi a seguir comparado com o fungo *Trichoderma reesei* QM 9414, padrão para esse tipo de ensaio, constatando-se que o primeiro superou o padrão apenas na atividade específica β -glucosidase.

Posteriormente os esporos do fungo *Aspergillus* sp foram expostos a diversas doses de radiação gama de uma fonte de cobalto-60, sendo que com as doses 0,3 e 1,0 kGy foram obtidos mutantes morfológicos.

Testou-se a capacidade de produção de atividade enzimática dos mutantes, a qual não superou o selvagem em nenhum tipo de atividade.

PRODUCTION CONDITIONS AND CELLULASE ACTIVITY OF *Aspergillus* sp
FUNGUS AND ITS MUTANTS ISOLATED FROM SUGARCANE BAGASSE

AUTHOR: *Lina Silber Schmidt Vitti*

ADVISER: Prof. Dr. Darcy Martins da Silva

SUMMARY

In the present experiment the total cellulase (FPA), β -glucosidase and carboximethyl cellulase activities of five kinds of **fungus** isolated from sugarcane bagasse were tested.

The fungi isolated were cultivated in liquid growth medium, using sugarcane bagasse as substrate. The enzymatic activity in filtrate was measured and among them one strain classified as *Aspergillus* sp showed higher enzymatic activity.

This fungus was submitted to different conditions of pH, temperature, substrate concentration and incubation period for cellulase production.

With the results obtained, it was possible to identify the best conditions for the production of the cellulase system as show below:

- pH range: 7,0 for FPA and 6,0 for β -glucosidase activity.

- Temperature range: 45°C for FPA and 35°C for β -glucosidase activity.
- Substrate concentration: 15 grams per liter of growth medium for FPA. β -glucosidase activity didn't show significant differences when substrate concentration varied from 5 to 25 grams per liter of growth medium.
- Incubation period: highest activity values for FPA and β -glucosidase activity were observed at the 10th day of incubation.

On the test conditions it was not observed carboximetyl cellulase activity.

Aspergillus sp selected in this study was compared against, *Trichoderma reesei* and it was observed that *Aspergillus* sp showed a higher β -glucosidase activity.

Aspergillus sp was irradiated with different doses in a gamma-source (Co-60) and morphological mutants were obtained with 0.8 and 1.0 kGy.

However the enzymatic activity of the mutants was always lower than that of the wild strain.

1. INTRODUÇÃO

No Brasil são obtidos diversos subprodutos e resíduos celulósicos que poderiam ser melhor explorados, sendo utilizados para hidrólise e posterior fermentação. Entre esse material celulósico é de grande importância a fração excedente de bagaço de cana usado para a produção de álcool etílico, que na maioria dos casos não é aproveitada como outro produto industrial.

Além do bagaço de cana outros materiais como polpa de madeira, algodão, palha, papel, sabugo, poderiam ser explorados em grande escala através da hidrólise enzimática da celulose.

A sacarificação da celulose permitiria o uso da glucose, obtida pelo processo hidrolítico, na alimentação e em produtos químicos.

Vários tratamentos ácidos ou alcalinos têm sido usados para hidrolisar celulose, porém ocorrem reações indesejáveis e destruição de parte dos açúcares. Esses problemas poderiam ser solucionados pelo emprego de um processo hidrolítico enzimático, utilizando enzimas provenientes

de microrganismos.

Enzimas do complexo celulolítico são sintetizadas por um grande número de microrganismos que incluem fungos, actinomicetos e bactérias. Entretanto, somente os fungos excretam uma grande quantidade de enzimas na forma ativa no meio de cultura.

Entre os microrganismos produtores do complexo celulolítico, alguns possuem capacidade para hidrolisar a celulose nativa, enquanto outros só degradam derivados solúveis da celulose.

Entre os principais gêneros de fungos relacionados com a decomposição da celulose estão incluídos: *Alternaria*, *Aspergillus*, *Chaetomium*, *Coprinus*, *Fomes*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Polyporus*, *Rhizoctonia*, *Sporotrichum*, *Stachylotrix*, *Trichoderma*, *Trichothecium*, *Verticillium*, *Zigorhynchus*.

Pesquisas visando obtenção de enzimas celulolíticas vêm sendo realizadas em inúmeros laboratórios. Alguns resultados já obtidos revelaram certos aspectos que justificam uma contínua pesquisa de novas fontes dentre microrganismos, pois as enzimas celulolíticas já encontradas diferem razoavelmente nas suas capacidades celulolíticas.

Em paralelo, deve-se lembrar que a seleção

.3.

eficiente de microrganismos para hidrólise de celulose oferece excelente material genético para o melhoramento dessa capacidade, seja através de radiação, mutagênicos químicos, hibridação somática e até mesmo técnicas de DNA recombinante. Dentre os fungos produtores de celulasas temos as cepas mutantes do *Trichoderma*: QM9133 e QM9414, *Rutgers* C30 e NG14, sendo altamente eficientes.

Os objetivos do presente trabalho foram o isolamento de fungos celulolíticos de bagaço de cana, seleção do mais promissor quanto a atividade celulolítica, caracterização do microrganismo selecionado e obtenção de mutantes, através do uso de radiação, com atividade superior ao selvagem.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. SELEÇÃO DE NOVOS MICRORGANISMOS CELULOLÍTICOS

A procura de microrganismos com grande capacidade de produção do complexo celulolítico tem sido objetivo de diversos trabalhos realizados.

FERGUS (1969) determinou a habilidade de alguns fungos termofílicos para produzir a fração C_x do complexo celulolítico. Observou que entre os diversos fungos testados *Chaetomium thermophile* ha Touche var. *coprophile* Cooney e Emerson; *C. thermophile* var. *dissitum* Cooney e Emerson; *Humicola grisea* Traaen var. *thermoidea* Cooney e Emerson; *H. insolens*, *Sporotrichum thermophile* e *Torula thermophile* Cooney e Emerson, degradaram papel de filtro.

MENEZES *et alii* (1976) compararam a atividade celulolítica de 51 linhagens de microrganismos. Os filtrados das culturas de três linhagens de fungos, sendo uma não identificada (25 F) e duas de basidiomicetos, apresentaram elevada atividade C_x .

MENEZES *et alii* (1976) testando a atividade enzimática entre diversas linhagens de fungos produtores

.5.

de celulase verificaram que o basidiomiceto 50 F mostrou ser uma boa fonte do complexo celulolítico $C_1 - C_x$.

PYE *et alii* (1977) entre doze culturas de fungos pertencentes aos gêneros *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Chaetomiun*, *Stachybotrys* e *Hypocrea*, verificaram que todos foram capazes de degradar xilana, avicel e carboximetilcelulose.

STENBERG *et alii* (1977) fizeram uma seleção para obter um microrganismo que produzisse quantidades relativamente grandes de β -glucosidase. Entre 200 linhagens de fungos e 15 de bactérias os organismos mais promissores foram os fungos *Aspergillus niger* QM877 e *A. phoenicis* QM329.

HAYASHIDA e YOSHIOKA (1980) isolaram de esterco o fungo termofílico *Humicola insolens* YH-8 o qual produziu uma quantidade significativa de celulases termoestáveis.

Cinco microrganismos celulolíticos foram isolados por FUJIO e MOO-YOUNG (1980) entre os quais o isolado *Aspergillus* espécie nº 81 pode degradar mais do que 86% de Solka Floc adicionada como substrato, em três dias de cultivo.

GINTEROVÁ *et alii* (1981) verificaram a produção de celulase em quatro culturas de fungos superiores

Agrocybe cylindracea, *Lentinus tigrinus*, *Pleurotus ostreatus* e *Ramaria formosa*, sendo melhor produtor o fungo *L. tigrinus*.

NG e ZEIKUS (1981) compararam a celulase extracelular de *Clostridium thermoCELLUM* LQR1 e *Trichoderma reesei* QM9414 observando que estas apresentaram diferenças significativas em relação às atividades dos componentes enzimáticos, modo de ação, estabilidade térmica e inibição por diversos compostos. A linhagem QM9414 foi significativamente mais ativa do que a LQR1.

SADLER (1982) fez uma comparação entre 100 linhagens de fungos de podridão da madeira quanto à habilidade para degradar blocos de madeira e produção de celulase extracelular, sendo que as linhagens de *Trichoderma* foram as melhores produtoras dessa enzima.

GUILIANO *et alii* (1983) estudaram a degradação de celulose por três novos isolados anaeróbicos mesofílicos em comparação com *Clostridium thermoCELLUM*. A degradação de diversos materiais celulósicos pelos anaeróbicos foi comparável a de *C. thermoCELLUM*.

SILMAN *et alii* (1984) avaliaram a atividade carboximetilcelulase de diversas linhagens de *Spicellum roseum*. As linhagens NRRL 13103, 13104 e 13106 produziram ati

vidade carboximetilcelulase de 2,9; 1,5 e 2,9 mg glucose/h/ml que foram as maiores atividades observadas.

DURAND (1984) comparou a atividade celulolítica entre as enzimas extracelulares de quatro fungos, *Trichoderma reesei* TD1B6, *Penicillium* espécie PD20, *Thielavia terrestris* NRRL8126 e *Sporotrichum cellulophilum* ATCC20494. As enzimas apresentaram-se diferentes quanto à atividade hidrolítica, estabilidade térmica e estabilidade a diferentes pHs.

2.2. PRODUÇÃO DE ENZIMAS CELULOLÍTICAS

Entre os fatores que afetam a produção das celulasas estão o meio de cultivo, o tipo de celulose usada como substrato para induzir a formação das enzimas, o tipo e quantidade do inóculo, a fonte de nitrogênio, o pH do meio de cultivo, a temperatura de desenvolvimento, a adição de surfactantes, agitação, a demanda de oxigênio dissolvido e o tipo de fermentação (Goksoyr e Eriksen, in ROSE, 1980; DEKKER, 1985).

2.2.1. INFLUÊNCIA DO MEIO DE CULTIVO

MANDELS e REESE (1960) em trabalhos utilizando *Trichoderma viride* e uma espécie de basidiomiceto, verificaram que a máxima produção de enzimas celulolíticas foi

obtida quando peptona ou sais nutritivos foram incluídos ao meio de cultura e o pH ajustado para pH 4,0 para o basidiomiceto e 2,7 para *T. viride*.

CHAHAL (1982) concorda com esses autores citando que pequenas quantidade de substratos facilmente utilizáveis, incluindo peptona, aumentaram a produção de celulase.

SHEWALE e SADANA (1978) observaram que o aumento do nível de uréia ou peptona no meio para *T. reesei* ou no meio denominado NM-1 não aumentou o nível de enzimas celulolíticas produzidas por uma espécie de basidiomiceto.

MENEZES *et alii* (1976) utilizaram dois meios de culturas para a produção de enzimas celulolíticas, e em relação a enzima ativadora pré hidrolítica e hidrolítica ambos mostraram o mesmo padrão de atividade.

PYE *et alii* (1977) verificaram que a adição de tampão citrato-fosfato no meio de cultivo reduziu grandemente os níveis de atividades celulolíticas de diversas culturas de fungos.

LINARDI e ROGANA (1977) compararam a produção do componente C₁, em quatro diferentes meios de cultura (Czapeck, Reese, Básico líquido, Eggins), pelo fungo *Trichoderma reesei* QM6a verificando que tanto o meio Reese como o Czapeck mostraram-se bons indutores desse componente.

De acordo com os autores citados anteriormente, MEHTA e MEHTA (1985) ao testarem diversos meios de cultura para a produção de enzimas pectolíticas e celulolíticas por *Fusarium oxysporum*, observaram que o meio Czapeck favoreceu a máxima produção de poligalacturonase e celulase. Para *Fusarium moniliforme* a maior produção de celulase obteve-se no meio Richard.

SHEWALE e SADANA (1978) verificaram que para o basidiomiceto denominado CPC 142 quando substratos como farelo de arroz ou de trigo, ou o líquido proveniente da extração da glicose do milho foram acrescentados ao meio de cultura denominado NM-2 houve aumento na produção de celulase e β -glucosidase.

MENEZES e DRAETTA (1979) citam que um dos meios de cultura testado foi considerado superior na produção do sistema enzimático celulolítico do basidiomiceto 50F e que devido as diversas combinações de sais na composição dos meios testados foi difícil atribuir a superioridade do meio à presença ou não de determinados componentes.

GINTEROVÁ *et alii* (1981) mostraram que quando um autolisado de levedura foi adicionado ao meio de cultura utilizado na produção de celulase por quatro culturas de fungos superiores, houve decréscimo na produção da enzima.

Em discordância, CHANG e STEINKRAUS (1982)

em estudos com *Volvariella volvacea*, utilizando um suplemento de 0,1% de extrato de levedura ao meio de MANDELS e REESE (1963) obtiveram 2 vezes mais celulase e micélio do que no meio sem extrato de levedura.

GOKHALE *et alii* (1984) verificaram a produção de β -glucosidase e celobiase pelo fungo *Aspergillus* sp, o qual foi desenvolvido no meio descrito por MANDELS e REESE (1963). O fungo secretou alto nível de β -glucosidase no meio de desenvolvimento.

Quando surfactantes, como Tween 80, foram acrescentados ao meio de cultura houve aumento na produção de enzimas celulolíticas extracelular (MANDELS e WEBER, 1969; STENBERG *et alii*, 1977; TANGNU *et alii*, 1981; CHAHAL, 1982; DEKKER, 1985).

Estudos do efeito de diferentes concentrações de nitrogênio na produção de celulase indicaram, segundo SHEWALE e SADANA (1978), que uma produção máxima de celulase, por espécies de basidiomiceto, foi obtida quando 0,42% a 0,70% de sulfato de amônio foram acrescentados ao meio básico para *Trichoderma reesei*.

TRIVEDI e RAO (1979) indicaram que para *Aspergillus fumigatus* a máxima produção de enzima foi alcançada usando 0,03% de sulfato de amônio com 0,01% de hidrogênio

nio fosfato de amônio.

DEKKER (1985) afirmou que fosfatos de amônio foram uma fonte efetiva de nitrogênio inorgânico, resultando em produções altas de celulase, devido à capacidade de tamponação desses sais os quais controlam o pH do meio de cultivo.

2.2.2. INFLUÊNCIA DO PH E DA TEMPERATURA

O pH do meio de cultura e a temperatura de incubação são fatores que também variam de acordo com o microrganismo utilizado em experimentos para a produção do complexo celulolítico.

MANDELS e REESE (1960) verificaram que a produção máxima de celulase foi obtida quando o meio de cultura apresentou pH 4,0 para uma espécie de basidiomiceto e 2,7 para *Trichoderma viride*. Em relação a temperatura observaram que para *T. viride* a produção de C_x foi maior a 24°C.

STUTZENBERGER (1971), obteve a maior produção de celulase pelo fungo *Thermomonospora curvata* a um pH inicial do meio de cultura ajustado para 8,0. Máxima ativi

dade C_1 e C_x ocorreu aproximadamente após 6 dias de desenvolvimento a 55°C .

Para *Sporotrichum thermophile* a máxima produção de C_1 e C_x foi observada a 45°C em 2 a 4 dias de desenvolvimento na presença de 1% de Solka Floc como substrato e nitrato de sódio ou uréia como fonte de nitrogênio. Nestas condições a atividade do filtrado foi semelhante àquela de *Trichoderma viride* (COUTTS e SMITH, 1976).

SHEWALE e SADANA (1978) em estudos das condições de cultura para maximização da produção de celulase e β -glucosidase pelo basidiomiceto denominado CPC142 um pH inicial de 6,5 foi visto ser o mais favorável para alta produção de enzimas.

Para o basidiomiceto 50F, MENEZES e DRAETTA (1979) verificaram que para as três frações celulolíticas a produção máxima ocorreu em meio de cultura com pH entre 3,5 e 4,5.

TANGNU *et alii* (1981) determinaram diversos parâmetros para a produção de celulase em fermentador e entre eles os perfís de temperatura e pH para o fungo *Trichoderma reesei* Rut C30. Para máxima produção de celulase e β -glucosidase, pH 5,0 e temperatura inicial de 31°C poderia aumentar substancialmente a atividade enzimática. A pH 6,0

pode-se produzir os mesmos níveis que a pH 4,0 ou 5,0, mas em menor tempo.

NATARAJAN e KANNAN (1982) verificaram que para culturas de *Amanita muscaria* o pH ótimo para produção da fração C_x do complexo celulolítico foi 4,5.

CHANG e STEINKRAUS (1982) observaram que o pH ótimo para a produção de enzimas celulolíticas produzidas por *Volvariella volvacea* foi 5,5.

CHAHAL (1982) em estudos com *Trichoderma reesei* verificou que o pH inicial do meio de cultura para inoculação foi geralmente 5,6 e a temperatura ótima para a produção de celulase foi 29°C.

Em testes da capacidade de *Pleurotus sajorcaju* para a produção de celulase, MADAN e BISARIA (1983) verificaram que o pH inicial para produção de celulase foi 5,0.

DEKKER (1985) citou que linhagens de *Trichoderma reesei* geralmente produzem os mais altos títulos de atividade da celulase (unidades/ml de enzimas) quando desenvolvidas em pH entre 4 e 5 e que a produção dessa enzima é geralmente maior quando o organismo é desenvolvido entre 25 e 28°C.

2.2.3. INFLUÊNCIA DO INÓCULO E PERÍODO DE INCUBAÇÃO

O tipo e tamanho do inóculo pode ter efeito marcante no desenvolvimento e produção de celulase. Inocula

ção micelial tem sido demonstrado produzir uma redução na fase inicial (lag) e tem resultado em maior produção de celulase comparada ao inóculo do tipo esporo (MANDELS e WEBER, in GOULD, 1969; CHAHAL, 1982; DEKKER, 1985).

Quanto ao curso de produção do complexo celololítico, pode ocorrer variações. Em estudos para determinar a habilidade de alguns fungos termofílicos e actinomicetos para produzir C_x , FERGUS (1969) observou que a produção máxima da enzima foi normalmente observada após 15 ou 20 dias de incubação.

PEITERSEN (1975), examinando a produção de celulase por *Trichoderma viride* verificou que a máxima produção foi alcançada após 4 - 10 dias de incubação.

Para os fungos *Aspergillus niger* QM877 e *A. phoenicis* QM329, STENBERG *et alii* (1977), observaram que após seis dias de desenvolvimento os níveis de β -glucosidase alcançaram seu pico, sendo a enzima distribuída uniformemente entre o micélio e o fluído da cultura. Após esse período o nível de enzimas micelial decresceu e o nível de enzimas no fluído da cultura aumentou.

TRIVEDI e RAO (1979) em culturas utilizando *Aspergillus fumigatus* obtiveram um máximo de atividade celololítica no 12º dia de desenvolvimento.

Para quatro culturas de fungos superiores, GINTEROVÁ *et alii* (1981), verificaram que a atividade da enzima celulolítica na presença de carboximetilcelulose foi maior após 12 dias de cultivo.

O fungo *Fusarium* sp teve sua máxima produção extracelular do complexo celulolítico no 5º dia de desenvolvimento (TRIVEDI e RAO, 1981).

Para *Acetivibrio cellulolyticus* a máxima atividade celulase foi detectada no 2º e 3º dia de incubação bem como o máximo desenvolvimento e degradação da celulose. (SADDLER e KHAN, 1980).

CHANG e STEINKRAUS (1982) observaram para *Volvariella volvacea*, uma atividade celulolítica máxima em cinco dias de cultivo.

Em culturas de *Amanita muscaria* a máxima atividade celulolítica extracelular foi detectada em culturas com 25 dias de crescimento (NATARAJAN e KANNAN, 1982).

STEWART *et alii* (1983) verificaram em estudos com *Aspergillus fumigatus* que atividade carboximetilcelulase extracelular, quando desenvolvidos em forragem e palha, aumentou através dos 10 dias de incubação.

2.2.4. INFLUÊNCIA DO TIPO E CONCENTRAÇÃO DO SUBSTRATO

Diversos têm sido os substratos utilizados com o objetivo de se obter grandes quantidades de enzimas celulolíticas por microrganismos, bem como diferentes concentrações desses substratos.

A eficácia de materiais celulósicos como indutores parece depender de sua susceptibilidade ao ataque pelo fungo.

Diversos microrganismos mostraram que celobiose é um indutor natural da celulase e que a baixa produção de enzimas obtidas em culturas com celobiose é devido a efeitos inibitórios pelo rápido desenvolvimento dos microrganismos nesse açúcar (MANDELS e REESE, 1960).

NISIZAWA *et alii* (1971) verificaram que o uso de sofrose como indutor de enzimas celulolíticas em culturas de *Trichoderma reesei* estimulou a formação de celulase, β -glucosidase e xilanase.

SHEWALE e SADANA (1978) ao analisarem a influência do substrato celulósico na produção de celulase e β -glucosidase pelo basidiomiceto denominado CPC 142 verificaram que as maiores quantidades dessas enzimas foram induzidas em celulose 123, Solka Floc SW40 e Avicel P.H. 101.

TRIVEDI e RAO (1979) testaram diversas fontes de carbono para induzir a formação de celulase pelo fungo *Aspergillus fumigatus*. Observaram que açúcares como glucose, sacarose, maltose e arabinose, não induziram a formação de celulase. Altos níveis da enzima foram observados quando celulose insolúvel foi usada como fonte de carbono e que, quando material lignocelulósico foi utilizado, baixos níveis de atividade celulolítica foram obtidos.

SONI e BHATIA (1979) em estudos da celulase extracelular (C_x) de *Fusarium oxysporum*, mostraram que os indutores reais dessa enzima são os produtos de degradação da celulose, melhor do que a própria celulose.

Com *Sporotrichum pulverulentum* foi observado que de acordo com o substrato usado para indução da enzima β -glucosidase, esta pode ser liberada para o meio de cultivo ou não. Utilizando celulose como fonte de carbono, β -glucosidase começou aparecer livre na solução de cultura após 7 horas. Com celobiose nenhuma atividade foi detectada na solução de cultura mesmo após 24 horas (DESHPANDE *et alii*, 1978).

Estudos da indução de β -glucosidase em *Phanerochaete chrysosporium*, mostraram que os mais fortes indutores de β -glucosidase extracelular foram polímeros celulósicos (celulose microcristalina, algodão, celulose Walseth)

e para β -glucosidase intracelular celobiose foi o substrato que induziu máxima atividade (SMITH e GOLD, 1979).

HERR (1979) verificando a produção de celulase por *Trichoderma viride* ITCC-1433 concluiu que carboximetilcelulose não pode ser considerada como um poderoso indutor dessa enzima ou como fonte de carbono e que a máxima produção da enzima foi obtida usando celulose em pó tratada com alcali.

Para os fungos superiores *Agrocybe cylindracea*, *Lentinus tigrinus*, *Pleurotus ostreatus* e *Ramaria formosa*, GINTEROVÁ *et alii* (1981) verificaram que entre diversos substratos testados serragem de pinho foi o mais efetivo para produção de celulase.

Utilizando diversas fontes de carbono, NAKATANI *et alii* (1981) tiveram os maiores valores de produção de celulase por *Dactylium dendroides* quando celulose em pó foi usada como fonte de carbono e que o tempo de secreção da enzima variou de acordo com a fonte de carbono usada.

Na produção de celulase extracelular por um isolado de *Fusarium* sp a máxima produção de todos os componentes da celulase foi observada com o uso de celulose Sigma (TRIVEDI e RAO, 1981).

Em estudo de excreção de celulase pelo fungo *Trichoderma reesei* CL-847, WARZYWODA *et alii*(1983) obtiveram as maiores produções da enzima quando utilizaram celulose Whatman CC41 como fonte de carbono e as menores produções foram obtidas com polpa de madeira.

STEWART *et alii* (1983) verificaram que culturas de *Aspergillus fumigatus* IMI 246651, ATCC 46324 produziram as maiores quantidades de xilanase e celulase extracelular quando desenvolvidas em forragem ou palha de cevada do que quando desenvolvidas em celulose CF 11.

Para *Penicillium funiculosum* UV-49 o desenvolvimento em algodão, filtro de papel, bagaço de cana e carboximetilcelulose foi pobre e a atividade celulolítica baixa (JOGLEKAR e KARANTH, 1984).

MOUNTFORT e ASHER (1985) observaram que para *Neocallimastix frontalis* PN-1 e PN-2 a atividade carboximetilcelulase foi maior em culturas desenvolvidas em filtro de papel Whatman n° 1 do que em outros substratos como Sigma Cell tipo 50, alfa celulose ou celulose MN-300.

As celulosas que não são facilmente hidrolisadas pelas celulasas (avicel, algodão, celulose em pó) parecem ser os melhores substratos para induzir a formação de celulase do que aquelas mais facilmente hidrolisadas como

carboximetilcelulose (DEKKER, 1985).

Quanto à concentração do indutor observou-se que a máxima produção de celulase para *Trichoderma reesei* e uma espécie de basidiomiceto foi obtida em 1% de substrato (MANDELS e REESE, 1960).

Com respeito à concentração de celulose, Mandels e Weber, in GOULD (1969) citaram que 0,5-1%, foi a concentração ótima para produção de celulase, dependendo do tipo de atividade medida e do nível de peptona no meio de cultura.

SHEWALE e SADANA (1978) observaram que para *Trichoderma viride* houve aumento na produção de celulase e β -glucosidase quando a concentração de celulose (Solka Floc SW 40 e celulose 123) no meio de cultivo foi aumentada de 0,5 a 3%.

Em relação ao fungo *Aspergillus fumigatus* o aumento da concentração de celulose Sigma acima de 0,5% levou a um aumento concomitante na produção de celulase, mas aumento acima de 0,75% causou decréscimo na produção dessa enzima (TRIVEDI e RAO, 1979).

MENEZES e DRAETTA (1979), observaram que a produção das frações celulólicas aumentou proporcionalmente com o aumento do substrato, dentro de uma faixa de concentração de bagaço de cana de 5 a 25 grãmas por litro de

meio de cultivo.

SADLER e KHAN (1980) verificaram que para *Acetivibrio cellulolyticus* a máxima atividade celulase foi obtida utilizando-se 1 grama de celulose por litro de meio de cultivo. Uma concentração de celulose de cerca de 10 gramas por litro causou diminuição na detecção da atividade de celulase no sobrenadante do caldo de cultivo.

FAHRICH e IRRGANG (1981) observaram que para *Chaetomium cellulolyticum*, a concentração de celulase livre foi menor em 2% de celulose, mas duas vezes mais celulose foi degradada em comparação a culturas desenvolvidas em 1% de celulose.

CHAHAL (1982) citou que uma concentração de 0,75% foi ótima para a produção de celulase por *Trichoderma reesei*. Maiores concentrações de celulose resultaram em um marcado decréscimo no nível final da enzima.

Para *Aspergillus fumigatus*, a concentração ótima forrageira para produção de enzimas celulolíticas extracelular foi de 4% (P/V) (STEWART *et alii*, 1983).

Em culturas de *Aspergillus terreus*, avicel, Solka Floc, lactose, celobiose, sofrorose e gentibiose em concentração de 1 grama por litro induziram a síntese de celulase extracelular. Durante o seu desenvolvimento em meio

com diferentes concentrações de celobiose a atividade da celulase foi inversamente relacionada ao desenvolvimento da cultura (OKUNEV *et alii*, 1983).

2.3. OBTENÇÃO DE MUTANTES

O mais significativo e notável avanço feito na produção de celulase foi através de mutação e programas de seleção de linhagens. Um grande número de mutantes foi obtido por vários geneticistas.

SADANA *et alii* (1979), obtiveram pelo uso de radiações ultravioleta um mutante de *Sclerotium rolfsii* CPC 142 que possuiu duas vezes mais atividade filtro de papel (FPA) do que a linhagem parental. A produção de endo- β -glucanase no mutante foi afetada em uma pequena intensidade.

FARKAS *et alii* (1981) isolaram quatro linhagens mutantes de *Trichoderma reesei* as quais exibiram aumento na produção de celulasas. Esses mutantes foram obtidos utilizando radiação ultravioleta em conídios de *T. reesei* QM 9414.

BAILEY e NEVALAINEN (1981) obtiveram uma linhagem mutante do fungo *Trichoderma reesei* hiperprodutor de ce-

lulase porém com baixa estabilidade. Esta foi posteriormente mutageneizada utilizando N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (NG) ou radiação gama (fonte de Cobalto-60, dose 80 - 120 kRad usando taxa de dose 100 kRad/h) obtendo-se um mutante com estabilidade melhorada.

Estudos de linhagens mutantes de *Trichoderma reesei* também foram feitos por MANDELS *et alii* (1981) os quais foram comparados sob condições de uso em diversos substratos celulósicos.

A partir de um isolado de solo, GUPTA *et alii* (1981) isolaram um mutante utilizando tratamento com N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina o qual mostrou atividade carbóximetilcelulase e β -glucosidase maior que o selvagem.

LACHKE *et alii* (1983) verificaram as condições de cultura para obter alta atividade extracelular β -glucosidase para o fungo *Penicillium funiculosum* e seu mutante hipersecretor Cu-1. Em meio suplementado com farelo de arroz ou torta de nozes ou coco a atividade de β -glucosidase extracelular foi de 30 - 36 IU/ml a qual está entre as maiores relatadas para fungos.

JOGLEKAR e KARANTH (1983) obtiveram um mutante de *Penicillium funiculosum* denominado UV-49 o qual produziu 50% a mais de atividade em papel de filtro e car-

boximetilcelulose.

ERIKSSON e JOHNSRUD (1983) utilizando radiação ultra-violeta obtiveram mutantes do fungo da podridão branca *Sporotrichum pulverulentum* com aumento na produção de celulase e β -D-glucosidase.

O trabalho de MOLONEY *et alii* (1983) teve como objetivo isolar um mutante, resistente à repressão catabólica, do fungo *Talaromyces emersonii* CBS 814.70 com melhoramento da atividade celulolítica extracelular. Obtiveram um mutante morfológico (UCG 42) e outros mutantes a partir do UCG 42 cujas atividades endoglucanase e exoglucanase estavam presentes em maior quantidade do que no tipo selvagem.

Um programa para a obtenção de mutantes de uma linhagem altamente celulolítica de *Aspergillus fumigatus* foi feito por WASE e VAID (1983). Através de experimentos com ultra-violeta foi possível obter um mutante com maior capacidade de degradar celulose do que o selvagem.

MACRIS (1984) fez a indução de mutantes de *Alternaria alternata* utilizando fonte de cobalto tipo gamma-cell com uma taxa de dose de 2,5 kRad/min e uma dose de 70 kRad. Um dos mutantes excretou melhores níveis de carboximetilcelulase e β -glucosidase quando desenvolvido em meio líquido com celulose do que o tipo selvagem.

FENNINGTON *et alii* (1984) conseguiram, por tratamento com metanosulfonato e radiação ultra-violeta, um mutante resistente a repressão catabólica a partir do fungo termofílico *Thermomonospora curvata*. A biossíntese de celulase não declinou pelo uso de glucose, 2 deoxiglucose ou alfa-metil glucosídeo, os quais foram repressores da produção de celulase pelo tipo selvagem.

LECLERC *et alii* (1985) isolaram mutantes de *Candida wickerhamii* e *Dekkera intermedia* os quais não foram reprimidos pela síntese de β -glucosidase, mostrando-se hiperprodutores dessa enzima em condições anaeróbicas de cultura. Esses mutantes produziram grande quantidade de β -glucosidase mesmo quando a concentração de glucose foi alta no meio de cultivo.

2.4. UTILIZAÇÃO DE ENZIMAS CELULOLÍTICAS

Muitas investigações para a utilização das enzimas celulolíticas, obtidas a partir de microrganismos, tem sido feitas com a finalidade de contribuir para a hidrólise e posterior fermentação de resíduos celulolíticos.

MENEZES (1978) utilizou o caldo celulolítico obtido do basidiomiceto 50F como auxiliar na sacarificação

do mosto de mandioca, com o objetivo de aumentar o rendimento de álcool. Embora tivesse sido constatada uma melhoria nas propriedades reológicas do mosto, como o decréscimo da viscosidade, não foi detectado um acréscimo substancial no rendimento em álcool.

Outro trabalho utilizando celulase para pré-tratamento da mandioca foi descrito por OLIVEIRA e SILVA (1983). Estes utilizaram celulase comercial "celluclast TM" do Novo Industri tipo 200LTY pen-200 CaVU/gr no pré-tratamento de mandioca para fins energéticos, uma vez que é conhecida a possibilidade de aumento na liberação do amido intracelular pelo rompimento da parede celular lignocelulósica. Um índice econômico proposto mostrou que a relação enzima-substrato de 1% (1,0071 UI/g) conjugada a um tempo de ação de 8 horas pode ser recomendado pelo menos a nível de laboratório.

FAHRICH e IRRGANG (1982) utilizando o sistema enzimático celulólitico extracelular de *Chaetomium cellulolyticum* obtiveram 30% de sacarificação da celulose de jornal.

MENEZES *et alii* (1983) usaram uma solução enzimática de *Rhizopus* e do basidiomiceto 50F para hidrolisar bambu (*Bambusa* sp) para posterior produção de etanol,

verificando que com a adição da enzima a quantidade de açúcares aumentou ocorrendo um decréscimo na viscosidade do material.

SHEWALE e SADANA (1979) fizeram estudos da sacarificação de celuloses puras (algodão, avicel, celulose 123, Solka Floc SW40) e resíduos celulósicos (palha de arroz, bagaço de cana, madeira, efluentes de usinas de papel).

Verificando os fatores que afetam a sacarificação, MES-HARTREE *et alii* (1983) usaram a solução enzimática de *Trichoderma* E58 para a hidrólise de resíduos agrícolas pré-tratados, como palha de cevada e trigo, caule e folhas de milho, talo de alfafa, verificando que todos os resíduos foram parcialmente hidrolisados pelo complexo celulolítico desse fungo.

Entre os resíduos agrícolas, o principal utilizado na sacarificação enzimática tem sido o bagaço de cana.

CHOU DHURY *et alii* (1981) obtiveram eficiente sacarificação de bagaço de cana pré-tratado por alcali quando se utilizou uma preparação enzimática combinando celulase de *Cellulomonas* e de *Trichoderma reesei*.

Estudos da degradação de bagaço de cana com

diversos tratamentos (alcalino, com álcool-éter, com etilenodiamina e ácido acético) pela enzima celulolítica isolada do fungo *Rhizopus*, foram feitos por MENEZES e HIOSHII (1982). Tratamento com etilenodiamina a 28% e hidróxido de sódio a 4%, seguido de aquecimento a 120°C, proporcionaram os melhores índices de sacarificação, sendo de 60 e 35% respectivamente.

GOEL e RAMACHANDRAN (1983) compararam a taxa de hidrólise entre palha de arroz e bagaço de cana com celulose microcristalina e Solka Floc. Observaram que a taxa e intensidade de hidrólise de palha de arroz e bagaço de cana pré-tratado foi muito maior do que para celulose microcristalina e Solka Floc quando enzimas de *Trichoderma reesei* D1-6 foram utilizadas.

RAO *et alii* (1983) verificaram o efeito da enzima de *Penicillium funiculosum* na hidrólise de bagaço de cana submetidos a diversos pré-tratamentos sendo a recuperação da enzima de resíduos insolúveis obtida parcialmente.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. MEIO DE CULTIVO PARA ISOLAMENTO DE MICRORGANISMOS DO BAGAÇO DE CANA

O meio de cultivo usado para isolar os microrganismos de bagaço de cana e manter os fungos foi o meio BDA com a seguinte composição:

- Batata 200 gramas
- Ágar 20 gramas
- Dextrose 10 gramas
- Água destilada . . 1.000 mL

O meio foi autoclavado por 15 minutos a temperatura de 120°C.

3.2. MEIO BÁSICO PARA PRODUÇÃO DE ENZIMAS CELULOLÍTICAS

O meio básico líquido usado para a produção do complexo celulolítico foi o meio Czapeck descrito por LINARDI e ROGANA (1977) com algumas modificações sugeridas por SHEWALE e SADANA (1978).

NaNO ₃	2,0 gramas
KH ₂ PO ₄	1,0 grama
KCl	0,5 grama
Mg SO ₄ .7H ₂ O	0,5 grama
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,01 grama
Proteose peptona	1,0 grama
Uréia	0,3 grama
Extrato de levedura	1,0 grama
Tween-80	1,0 ml
Bagaço de cana	5,0 gramas
Água destilada	1.000 ml
pH	5,0

O meio foi distribuído em volumes de 50 ml em frascos Erlenmeyer de 250 ml e esterilizado em autoclave à temperatura de 120°C por 15 minutos.

3.3. BAGAÇO DE CANA USADO COMO SUBSTRATO

Como substrato utilizou-se bagaço de cana tratado à pressão de vapor (17 atm/5 min), lavado, seco a 60°C em estufa e moído.

A lavagem do bagaço é necessária para a retirada de açúcares presentes e inibidores (componentes fenólicos e furfural).

3.4. ISOLAMENTO E MANUTENÇÃO DAS CULTURAS

Cerca de 1 grama de bagaço de cana em estado de decomposição foi incorporado ao meio de isolamento (BDA). As placas foram incubadas a 35°C durante quatro dias. As colônias em desenvolvimento foram transferidas para outra placa e incubadas nas mesmas condições. A fim de se obter colônias puras aplicou-se a técnica da diluição em série, utilizando-se tubos de ensaio contendo 9 ml de solução salina (0,85%) esterilizada, adicionando-se a eles 1 ml da amostra até se obter a diluição de 10^{-5} .

0,1 ml de cada diluição foi novamente plaqueada em meio BDA para obtenção de colônias isoladas puras.

As colônias puras isoladas foram transferidas para tubos inclinados contendo BDA. Os tubos foram incubados a 35°C e repicados a cada 15 dias.

Os fungos isolados do bagaço de cana foram identificados utilizando a abreviatura Bg e numerados de 1 a 5.

3.5. PREPARO DO INÓCULO

Em culturas desenvolvidas em BDA a 35°C por um período de seis dias acrescentaram-se 5 ml de solução salina (0,85%) esterilizada. Os tubos foram agitados em agitador Phoenix Mod. AT:56 para melhor homogeneização da suspensão de esporos.

O número de esporos foi determinado em câmara de Neubauer.

Como inóculo foi utilizado 0,5 ml da suspensão de esporos contendo $1,3 \times 10^7$ esporos por ml para 50 ml de meio básico líquido.

3.6. PREPARO DO CALDO ENZIMÁTICO

Após quatro dias de crescimento do inóculo em meio básico líquido em agitador rotativo, as culturas foram filtradas utilizando-se bomba de vácuo, separando-se o micélio do caldo de cultivo.

O caldo foi usado como extrato bruto para medir a atividade enzimática.

3.7. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

3.7.1. CELULASE TOTAL (FPA)

A avaliação da atividade celulolítica foi feita de acordo com MANDELS *et alii* (1976), sendo os açúcares redutores determinados de acordo com MILLER (1959). Atividade de celulase total foi determinada usando-se o método do filtro de papel. Tomou-se 1,0 ml da solução enzimática (item 3.6.), adicionou-se 1,0 ml de tampão citrato 0,05 M pH 5,0 e tiras de papel de filtro Whatman nº 1 (1,0 x 6,0), e incubou-se em banho-maria a 50°C por 60 minutos. A reação foi interrompida com a adição de 3 ml de reagente dinitrosalicílico e a mistura aquecida em água fervente por 5 minutos.

A quantidade de açúcares redutores formada foi estimada espectrofotometricamente a 540 nm, utilizando-se glucose como padrão. A atividade celulolítica total foi expressa em μg de Açúcares Redutores (AR) \times $\text{mililitro}^{-1} \times \text{minuto}^{-1}$ e atividade específica em μg AR \times μg proteína $^{-1} \times \text{hora}^{-1}$.

3.7.2. β -GLUCOSIDASE

A atividade β -glucosidase foi determinada usan

do-se salicina como substrato, de acordo com MANDELS *et alii* (1976) e açúcares redutores formados de acordo com MILLER (1959).

A 0,5 ml da solução enzimática adicionou-se 0,5 ml de solução de salicina 1%. Após agitação, a mistura foi incubada por 30 minutos a temperatura de 50°C e a reação interrompida por adição de 3 ml de reagente dinitro salicílico. A mistura foi aquecida por 5 minutos e os açúcares formados foram determinados em espectrofotômetro Perkin-Elmer Coleman 54 β a 540 nm. Glucose foi utilizada como padrão. Atividade β-glucosidase foi expressa em $\mu\text{g AR} \times \text{ml}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ e atividade específica em $\mu\text{g AR} \times \mu\text{g prot}^{-1} \times \text{h}^{-1}$.

3.7.3. CARBOXIMETILCELULASE (CMCase)

A atividade carboximetilcelulase foi determinada usando-se o método descrito por MANDELS *et alii* (1976), tendo carboximetilcelulose (sigma Lote 12F -0358) como substrato.

Para 0,5 ml da solução enzimática adicionou-se 0,5 ml de solução de carboximetilcelulose 1%. Após agitação as amostras foram incubadas por 30 minutos a 50°C e a

.35.

reação interrompida pela adição de 3,0 mL de reagente di-nitrosalicílico. A mistura foi incubada em água fervente por 5 minutos. A quantidade de açúcares redutores formada foi determinada de acordo com MILLER (1959) em espectrofotômetro a 540 nm. Atividade carboximetilcelulase foi expressa em $\mu\text{g AR} \times \text{mL}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ e atividade específica em $\mu\text{g AR} \times \mu\text{g prot}^{-1} \times \text{h}^{-1}$.

3.8. DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS SOLÚVEIS

A determinação de proteínas solúveis na solução enzimática foi feita de acordo com o ensaio para microproteína proposto por BRADFORD (1976).

A 0,1 mL de solução enzimática adicionou-se 1 mL do reagente para proteínas (Coomassie Brilliant Blue G 250).

Absorbância foi lida a 595 nm em espectrofotômetro Perkin Elmer Coleman 54 β . Como padrão foi utilizado soro albumina bovina.

3.9. SELEÇÃO PARA OBTENÇÃO DE CEPA COM MAIOR CAPACIDADE CELULOLÍTICA

Diversos fungos isolados de bagaço de cana (Ítem 3.4.) foram utilizados para testes de atividade enzimática.

0,5 ml de solução de esporos ($1,3 \times 10^7$ esporos/ml) foi inoculado em meio básico líquido à temperatura de 40°C durante quatro dias. Após esse período obteve-se o extrato bruto (Ítem 3.6.) no qual se determinaram a atividade enzimática (Ítem 3.7.) e as proteínas solúveis (Ítem 3.8.). Dentre os fungos foi selecionado o que apresentou maior atividade enzimática.

3.10. INFLUÊNCIA DAS CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS NA PRODUÇÃO DE ENZIMAS CELULOLÍTICAS

Para o fungo selecionado no Ítem anterior foram determinadas as condições de temperatura, pH, concentração de substrato e período de incubação para melhor produção do complexo enzimático.

3.10.1. FAIXA DE TEMPERATURA

Para determinação da temperatura ótima para produção do complexo enzimático o inóculo ($1,3 \times 10^7$ esporos/mL) foi colocado em meio básico líquido e em agitador rotativo. As culturas foram incubadas nas temperaturas de 25, 30, 35, 40, 45°C durante quatro dias.

Utilizaram-se três repetições sendo coletadas três amostras de cada uma delas para determinação das atividades enzimáticas (item 3.7.) e proteína (item 3.8.).

3.10.2. FAIXA DE PH

Na determinação da faixa de pH ótima para a produção das frações enzimáticas utilizou-se o meio líquido básico com pHs ajustados para 3,0; 4,0; 5,0; 6,0; 6,5; 7,0; 8,0, ao qual foi colocado o inóculo, sendo incubado em agitador rotativo por quatro dias na temperatura determinada anteriormente.

As determinações de atividades enzimáticas e proteína foram feitas de acordo com os itens 3.7 e 3.8., respectivamente.

3.10.3. CONCENTRAÇÃO DE BAGAÇO DE CANA TRATADO

Para a determinação da concentração da fonte de carbono utilizaram-se concentrações crescentes (5, 10, 15, 20, 25 gr/1.000 ml) de bagaço de cana tratado de acordo com o ítem 3.3., em meio básico líquido, o qual foi inoculado com uma solução de esporos ($1,3 \times 10^7$ esporos/ml) e colocado em agitador rotativo durante quatro dias na temperatura e pH determinados anteriormente.

3.10.4. CURVA DE INCUBAÇÃO

Após determinação dos três parâmetros anteriores, fez-se a curva de incubação. Determinou-se a atividade enzimática extracelular (ítem 3.7.) e proteína solúvel (ítem 3.8.) durante dez dias de incubação nas condições de temperatura, pH e concentração de bagaço ótimos determinados pelo ítem 3.10.

3.11. COMPARAÇÃO DO FUNGO ISOLADO E *Trichoderma reesei* QM9414

Compararam-se as atividades enzimáticas do mi-

o organismo isolado de bagaço ao *Trichoderma reesei* QM9414 utilizando-se o meio básico líquido proposto no ítem 3.2.

Foram determinadas as atividades enzimáticas e proteína solúvel nos dois microrganismos de acordo com os ítems 3.7. e 3.8., respectivamente.

Para o microrganismo isolado de bagaço de cana utilizaram-se condições de temperatura, pH e concentração de bagaço determinados anteriormente. Para o *Trichoderma reesei* utilizaram-se a temperatura de 28°C, pH 5,0 e a mesma concentração de bagaço de cana usada para o fungo isolado.

3.12. CURVA DE SOBREVIVÊNCIA A RADIAÇÃO GAMA E OBTENÇÃO DE MUTANTES MORFOLÓGICOS CELULOLÍTICOS

Preparou-se uma suspensão densa de conídios em solução salina 0,85% (p/v) mais Tween-80 obtendo-se uma concentração 0,1% (v/v).

O número de conídios foram contados com o auxílio de câmara de Neubauer.

Transferiu-se a solução para placas de Petri vazias e esterilizadas (4 ml/placa).

Posteriormente, estas foram irradiadas em

fonte de Cobalto-60 com uma taxa de dose de 1,5 kGy/hora com doses de 0,1; 0,2; 0,4; 0,8 e 1,0 kGy.

Foram feitas diluições adequadas para cada dose utilizando solução salina 0,85% (p/v).

As soluções de esporos irradiadas e diluídas foram semeadas em placas de Petri contendo meio básico para produção de enzimas celulolíticas com 5 gramas de glicose/1.000 mL.

As placas foram incubadas por 48 horas em estufa regulada para 35°C.

Após incubação as colônias desenvolvidas foram contadas e a porcentagem de sobrevivência determinada.

Os mutantes morfológicas foram isolados e testados quando a capacidade de produzir enzimas celulolíticas.

Esses mutantes foram isolados em BDA (item 3.1.) e cultivados em meio básico líquido (item 3.2.) nas condições ótimas determinadas para o fungo referência.

Os fungos isolados foram testados após 4,7 e 10 dias de desenvolvimento em meio básico líquido utilizando bagaço de cana pré-tratado (item 3.3.) como fonte de carbono.

.41.

As atividades enzimáticas foram determinadas de acordo com o ítem 3.7. e as proteínas solúveis pelo método descrito no ítem 3.8.

4. RESULTADOS

4.1. SELEÇÃO PARA OBTENÇÃO DE CEPA COM MAIOR CAPACIDADE CELULOLÍTICA

O estudo comparativo da atividade extracelular total da celulase (FPA) e β -glucosidase dos 5 fungos isolados de bagaço de cana e o teste F e Tukey estão representados na Tabela 1. A atividade FPA foi mostrada apenas pelos isolados Bg1 e Bg5. Os outros isolados não apresentaram atividade FPA extracelular nas condições do experimento. Os 5 isolados apresentaram atividade β -glucosidase e nenhum deles mostrou atividade carboximetilcelulase. Os coeficientes de variação para a atividade celulolítica e específica FPA foram 2,68 e 3,45%, respectivamente. Para atividade celulolítica β -glucosidase 12,57% e atividade específica β -glucosidase 9,69%, mostrando uma precisão experimental razoável.

Pelo teste F verificou-se que houve significância ao nível de 1% de probabilidade para a atividade: celulolítica e específica FPA e β -glucosidase, o que indica que pelo menos um dos isolados mostrou atividade enzimá

Tabela 1 - Estudo comparativo e análise de variância da atividade extracelular total da celulase(FPA) e β -glucosidase de fungos isolados de bagaço de cana crescidos a 40°C em meio básico líquido, pH 5,0 durante 96 horas. Atividade celulolítica foi expressa em $\mu\text{g AR} \times \text{ml}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ e atividade específica em $\mu\text{g AR} \times \mu\text{g prot}^{-1} \times \text{h}^{-1}$.

Isolados Bg	FPA				β -glucosidase	
	Atividade celulolítica		Atividade específica		Atividade celulolítica	Atividade específica
	Valor obtido	Valor estimado ($\sqrt{x + 0,5}$)	Valor obtido	Valor estimado ($\sqrt{x + 0,5}$)		
1	3,08	1,89	1,96	1,57	6,04	3,86
2	0,00	0,71	0,00	0,71	16,09	12,65
3	0,00	0,71	0,00	0,71	14,71	10,69
4	0,00	0,71	0,00	0,71	0,66	0,45
5	5,37	2,42	3,86	2,09	33,38	23,87
\bar{X}		1,29		1,16	14,18	10,30
GL Tratamento		4		4		4
QM Tratamento		1,9902		0,8307	466,1666	246,6692
QM Resíduo		0,0012		0,0016	3,1779	0,9968
F		1658,5000**		519,1875**	146,6901**	247,4610**
CV (%)		2,68		3,45	12,57	9,69
Δ (5%)		0,09		0,11	4,79	2,68

tica maior que os outros.

Aplicando-se o teste de Tukey, observou-se que em relação a atividade celulolítica e específica FPA o isolado Bg 5 mostrou-se superior a Bg 1 a nível de 5% de probabilidade. Para a atividade celulolítica e específica β -glucosidase verificou-se que o isolado Bg 5 foi superior em relação aos outros isolados a nível de 5% de probabilidade.

Analisando os resultados verificou-se que o isolado Bg 5 apresentou a maior atividade celulolítica e específica FPA e β -glucosidase em relação aos demais isolados.

Este isolado foi selecionado para posteriores testes e enviado para classificação. O fungo foi classificado como *Aspergillus* sp.

4.2. AVALIAÇÃO DAS CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS PARA A PRODUÇÃO DE ENZIMAS CELULOLÍTICAS PELO FUNGO *Aspergillus* sp.

A Tabela 2 e Figura 1 mostram as atividades FPA, β -glucosidase extracelular do fungo *Aspergillus* sp. inoculado em diversas temperaturas e o teste F e Tukey desses dados.

Tabela 2 - Atividade extracelular total da celulase (FPA) e β -glucosidase do fungo *Aspergillus* sp crescendo em meio básico líquido, pH 5,0, em diferentes temperaturas, após 96 horas de incubação e análise de variância. Atividade celulolítica foi dada em $\mu\text{g AR} \times \text{ml}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ e atividade específica em $\mu\text{g AR} \times \mu\text{g prot}^{-1} \times \text{h}^{-1}$.

Temperatura	pH final	FPA					
		Atividade celulolítica		Atividade específica		β -glucosidase	
		Valor obtido	Valor estimado ($\sqrt{x+0,5}$)	Valor obtido	Valor estimado ($\sqrt{x+0,5}$)	Atividade celulolítica	Atividade específica
25	7,0	0,00	0,71	0,00	0,71	10,49	11,79
30	7,3	0,07	0,75	0,05	0,74	19,56	15,92
35	7,2	3,89	1,90	2,72	1,79	36,27	25,45
40	7,2	5,37	2,41	3,86	2,09	33,38	23,87
45	6,9	11,41	3,45	7,45	2,82	26,66	17,49
\bar{X}			1,84		1,63	25,27	18,90
GL Tratamento			4		4	4	4
QM Tratamento			4,0500		2,4570	329,2815	96,2646
QM Resíduo			0,0379		0,0019	3,6666	1,2745
F			106,8602**		1293,1579**	89,8057**	75,5313**
CV (%)			10,58		2,67	7,61	5,94
Δ (5%)			0,52		0,12	5,8830	3,1026

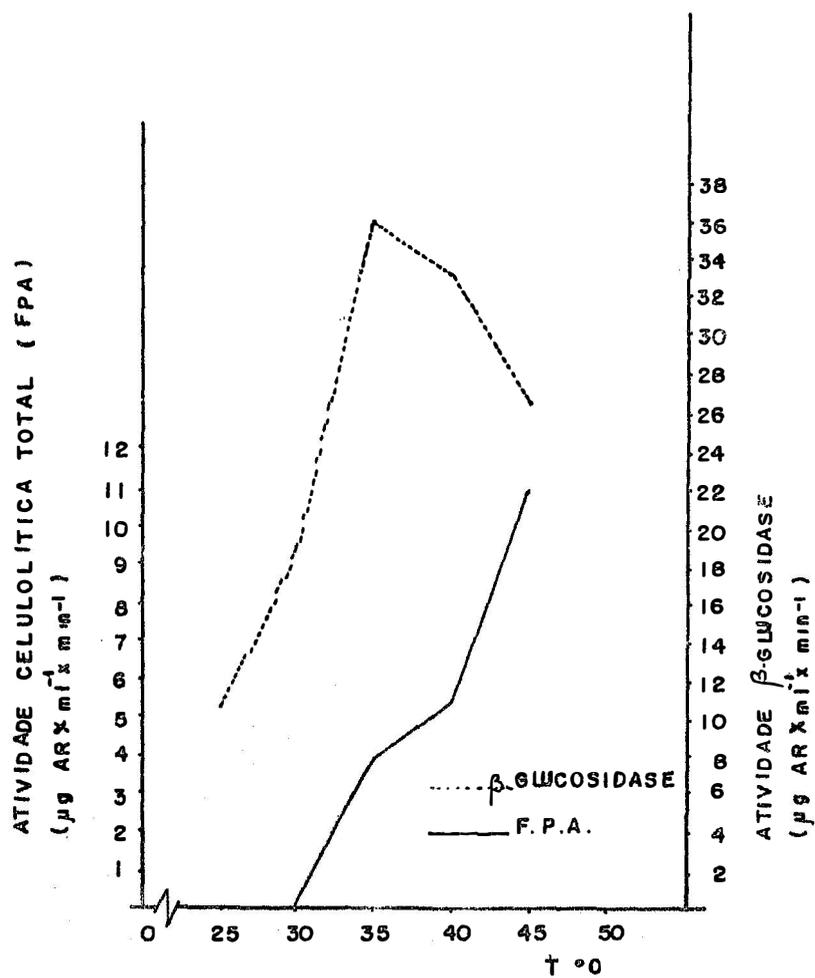


Figura 1 - Atividade celulolítica total da celulase (FPA) e β -glucosidase do isolado *Aspergillus* sp, crescido em meio básico líquido, pH 5,0, em diferentes temperaturas após 96 horas de incubação.

Para atividade celulolítica e específica FPA pode-se ver na Tabela 2 e Figura 1 que a medida que se aumentou a temperatura houve aumento na atividade FPA. As atividades β -glucosidase não mostraram idêntica correlação.

O isolado *Aspergillus* sp não apresentou atividades CMCase em nenhuma das temperaturas testadas.

Os coeficientes de variação para atividade celulolítica e específica FPA foram 10,58 e 2,67% respectivamente. Para a atividade celulolítica e específica β -glucosidase tivemos coeficientes de variação de 7,61 e 5,94%, respectivamente.

O teste F evidencia que a atividade celulolítica e específica da fração FPA e β -glucosidase apresentaram diferenças significativas quando submetidas a variações de temperatura na faixa de 30 - 45°C para as atividades FPA e de 25 - 45°C para as atividades β -glucosidase.

Pelo teste Tukey verificou-se que houve diferença entre os tratamentos de temperatura para atividade celulolítica e específica FPA à nível de 5% de probabilidade.

As melhores atividades celulolíticas não fo-

ram observadas nas mesmas temperaturas. As maiores atividades FPA apresentaram-se a 45°C, já as atividades β -glucosidase a 35 e 40°C.

A temperatura de 35°C foi utilizada para incubar os microrganismos para testes posteriores.

Na Tabela 3 e Figura 2 são mostrados os resultados obtidos quando o fungo *Aspergillus* sp foi incubado em meio líquido básico com diferentes pHs.

Testando-se os pHs do meio básico líquido para produção de enzimas celulolíticas observou-se que atividade FPA está presente em todos os pHs testados. Atividade β -glucosidase não foi verificada a pH 3,0. Atividade CMCase não foi obtida em nenhum dos tratamentos.

Os coeficientes de variação para atividade celulolítica e específica FPA foram de 5,68 e 5,78%, respectivamente. Para atividade celulolítica e específica β -glucosidase tivemos 3,64 e 2,92%, respectivamente.

Pelo teste F houve significância (1%) para as atividades enzimáticas testadas.

Pelo teste Tukey a pH 7 foram detectadas as maiores atividades celulolíticas FPA, que diferiram (5%) de todos os outros tratamentos de pH.

Tabela 3 - Atividade extracelular total da celulase (FPA) e β -glucosidase do fungo *Aspergillus* sp crescido em meio básico líquido a 35°C e em diferentes pHs, após 96 horas de incubação e a análise de variância. Atividade celulolítica foi expressa em $\mu\text{g AR} \times \text{ml}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ e atividade específica em $\mu\text{g AR} \times \mu\text{g prot}^{-1} \times \text{h}^{-1}$.

	FPA				β -glucosidase				
	pH inicial	pH final	Atividade celulolítica		Atividade celulolítica		Atividade específica		
			Valor obtido	Valor estimado ($\sqrt{x + 0,5}$)	Valor obtido	Valor estimado ($\sqrt{x + 0,5}$)	Valor obtido	Valor estimado ($\sqrt{x + 0,5}$)	
3,0	6,5	3,48	3,57	0,00	0,71	0,00	0,71	0,00	0,71
4,0	6,6	1,86	2,12	10,46	3,31	11,22	3,42	11,22	3,42
5,0	7,2	4,00	3,41	27,53	5,29	23,61	4,91	23,61	4,91
6,0	7,3	4,95	3,90	34,40	5,90	27,12	5,25	27,12	5,25
6,5	7,5	5,28	4,10	29,26	5,45	23,40	4,89	23,40	4,89
7,0	7,9	6,25	4,77	13,93	3,79	10,61	3,33	10,61	3,33
8,0	8,3	3,30	2,59	6,66	2,68	6,03	2,55	6,03	2,55
\bar{X}		4,16	3,49		3,88		3,58		3,58
GL Tratamento		6	6		6		6		6
QM Tratamento		4,2448	1,6270		6,7962		5,2212		5,2212
QM Resíduo		0,0559	0,0409		0,0199		0,0109		0,0109
F		75,9356**	39,7739**		341,5176**		479,0092**		479,0092**
CV (%)		5,68	5,78		3,64		2,92		2,92
Δ (5%)		0,94	0,80		0,56		0,41		0,41

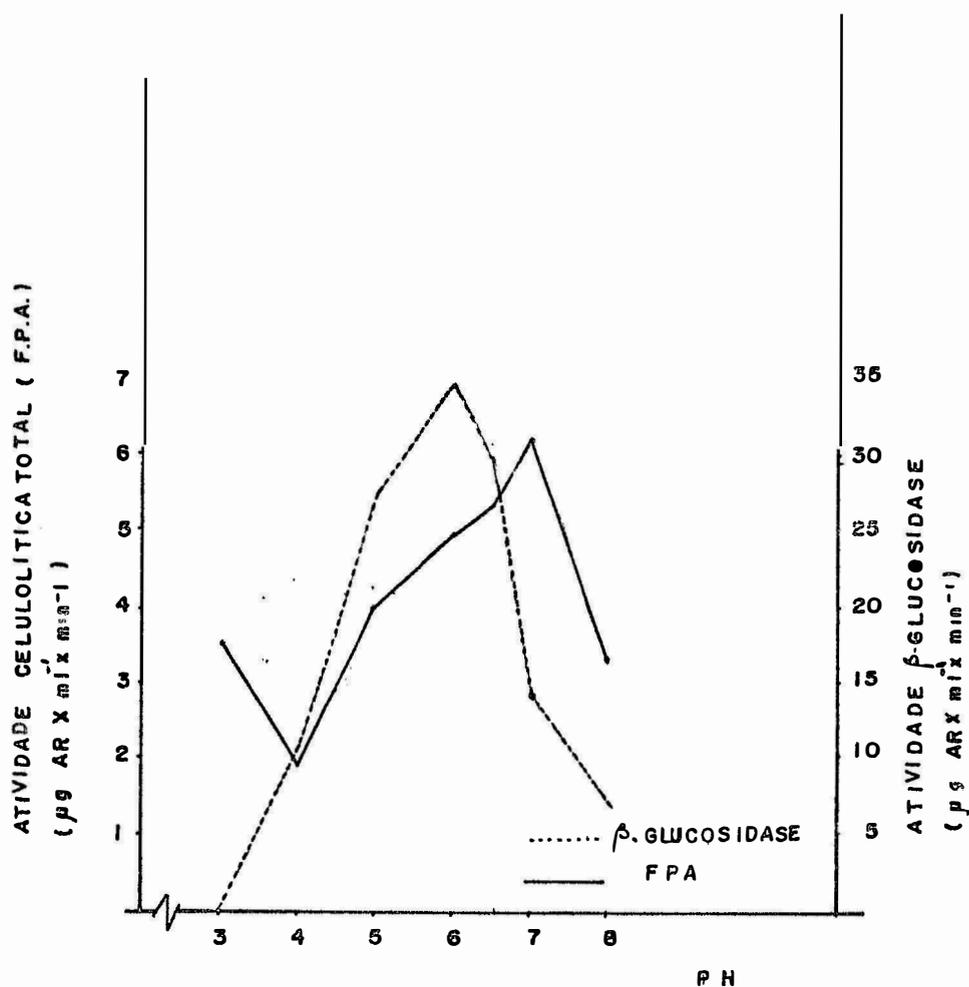


Figura 2 - Atividade celulolítica total (FPA) e β -glucosidase do isolado *Aspergillus* sp, crescido em meio básico líquido, a 35°C , em diferentes pHs, após 96 horas de incubação.

Para atividade específica FPA o teste Tukey mostrou que a maior atividade ocorreu em pH 7,0 e 6,5.

Em relação a β -glucosidase, a maior atividade de celulolítica foi verificada em pH 6,0 que foi significativamente superior a todos os outros tratamentos, exceto daquele em pH 6,5.

O teste Tukey para atividade específica β -glucosidase mostrou que as maiores atividades foram observadas em pH 5,0; 6,0 e 6,5 entre os quais não houve diferença significativa.

Os resultados observados quando o fungo *Aspergillus* sp foi cultivado em meio básico líquido com diferentes concentrações de bagaço de cana como fonte de carbono e o teste F e Tukey estão na Tabela 4 e Figura 3.

Quando 5 gramas de bagaço de cana tratado foram utilizadas não houve produção de enzimas com atividade FPA, porém observou-se atividade β -glucosidase. Não se verificou atividade CMCase em nenhuma das concentrações de bagaço de cana testadas.

Os coeficientes de variação para atividade celulolítica FPA, atividade específica FPA, atividade celulolítica β -glucosidase, atividade específica β -glucosidase foram 8,55; 4,92; 14,75; 13,28%, respectivamente.

Tabela 4 - Atividade extracelular total da celulase (FPA) e β -glucosidase do fungo *Aspergillus* sp crescido em meio básico líquido a 35°C, pH 6,0, em diversas concentrações de bagaço de cana, após 96 horas de incubação e a análise de variância. Atividade celulolítica foi expressa em $\mu\text{g AR} \times \text{ml}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ e atividade específica em $\mu\text{g AR} \times \mu\text{g prot}^{-1} \times \text{h}^{-1}$.

Concentração de bagaço de cana (gr / l)	pH final	FPA				β -glucosidase	
		Atividade celulolítica		Atividade específica		Atividade celulolítica	Atividade específica
		Valor obtido	Valor estimado ($\sqrt{x + 0,5}$)	Valor obtido	Valor estimado ($\sqrt{x + 0,5}$)		
5	7,6	0,00	0,71	0,00	0,71	18,39	17,78
10	7,4	1,18	1,29	0,99	1,22	19,51	13,71
15	6,7	3,49	1,99	2,07	1,60	20,27	12,79
20	6,7	2,18	1,63	1,13	1,27	22,89	12,04
25	6,7	2,60	1,76	1,16	1,28	18,40	9,17
\bar{X}			1,48		1,22	19,89	13,10
GL Tratamento			4		4	4	4
QM Tratamento			0,4974		0,3104	10,3247	30,1376
QM Resíduo			0,0016		0,0036	8,6116	2,9376
F			310,8750**		86,2222**	1,1989	10,2593**
CV (%)			8,55		4,92	14,75	13,28
Δ (5%)			0,16		0,16	7,89	4,60

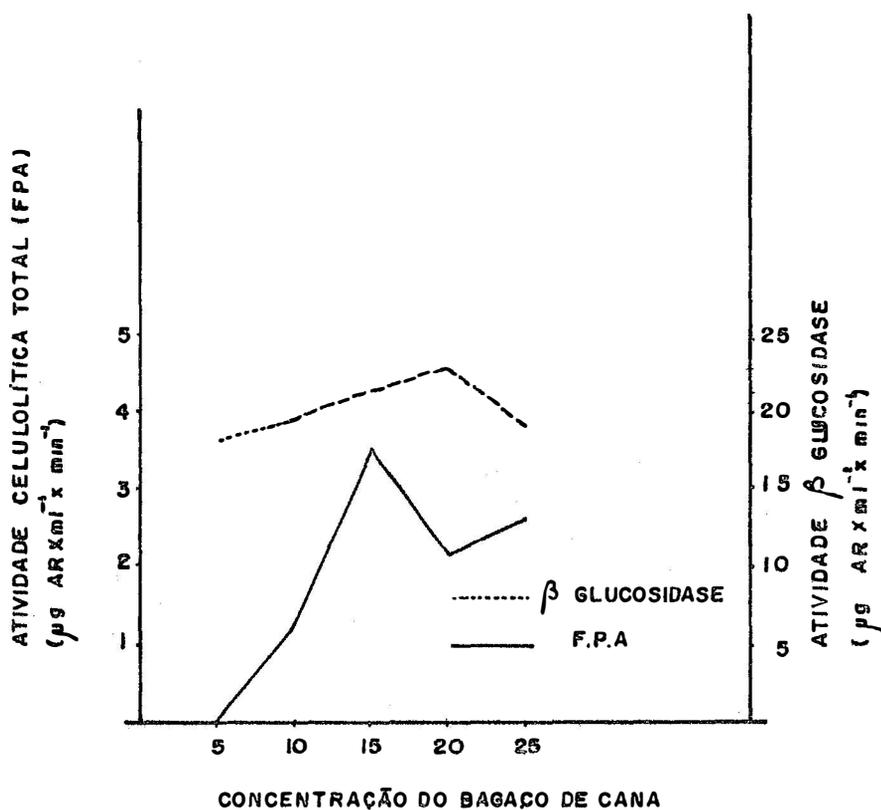


Figura 3 - Atividade extracelular total da celulase (FPA) e β -glucosidase do fungo *Aspergillus* sp crescido em meio básico líquido, a 35°C, pH 6,0 e em diversas concentrações de bagaço de cana tratado, após 96 horas de incubação.

O teste F foi significativo a nível de 1% para quase todos os testes, exceto para atividade celulolítica β -glucosidase, o que significa que não houve diferença para atividade celulolítica β -glucosidase nos diferentes tratamentos.

O teste Tukey mostrou que para atividade celulolítica FPA o tratamento onde se utilizaram concentrações de substrato de 15 gramas/litro de meio básico foi significativamente maior a nível de 5% em relação aos outros tratamentos.

Para a atividade específica FPA, quando se utilizou 15 gramas de bagaço/litro de meio obteve-se diferença significativa (5%) em relação aos demais tratamentos.

Os testes para atividade celulolítica β -glucosidase não mostraram diferença significativa.

Atividade específica β -glucosidase foi maior quando se testou 5 a 10 gramas de substrato por litro de meio básico. Nem sempre as melhores atividades enzimáticas foram obtidas numa mesma concentração de bagaço de cana.

Uma concentração de 15 gramas de bagaço/litro de meio foi escolhida para o teste de incubação.

Pela Tabela 5 e Figura 4 pode-se verificar a atividade enzimática FPA e β -glucosidase do fungo *Aspergillus*

Tabela 5 - Atividade extracelular total da celulase (FPA) e β -glucosidase durante um período de 10 dias de incubação do fungo *Aspergillus* sp em meio básico líquido, pH 6,0, 35°C, concentração de bagaço de cana de 15 gramas/litro de meio de cultura e a análise de variância. Atividade celulolítica foi expressa em $\mu\text{g AR} \times \text{ml}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ e atividade específica em $\mu\text{g AR} \times \mu\text{g prot}^{-1} \times \text{h}^{-1}$.

Dias de incubação	pH	FPA						β -glucosidase						
		Atividade celulolítica		Atividade específica		Atividade celulolítica		Atividade específica		Atividade celulolítica		Atividade específica		
		Valor obtido	Valor estimado ($\sqrt{x + 0,5}$)	Valor obtido	Valor estimado ($\sqrt{x + 0,5}$)	Valor obtido	Valor estimado ($\sqrt{x + 0,5}$)	Valor obtido	Valor estimado ($\sqrt{x + 0,5}$)	Valor obtido	Valor estimado ($\sqrt{x + 0,5}$)	Valor obtido	Valor estimado ($\sqrt{x + 0,5}$)	
1	6,9	0,00	0,71	0,00	0,71	0,00	0,71	0,00	0,71	0,00	0,71	0,00	0,71	0,71
2	6,8	0,00	0,71	0,00	0,71	0,00	0,71	0,00	0,71	0,00	0,71	0,00	0,71	0,71
3	6,9	0,00	0,71	0,00	0,71	0,00	0,71	0,00	0,71	0,00	0,71	0,00	0,71	0,71
4	6,9	0,69	1,09	0,32	0,90	0,32	0,90	0,32	0,90	27,00	5,24	12,95	3,67	3,67
5	6,5	2,89	1,84	1,54	1,43	1,54	1,43	1,54	1,43	30,49	5,57	16,25	4,09	4,09
6	6,0	6,79	2,70	3,46	1,99	3,46	1,99	3,46	1,99	18,18	4,32	9,27	3,12	3,12
7	6,0	8,56	3,01	4,13	2,15	4,13	2,15	4,13	2,15	23,11	4,86	11,17	3,41	3,41
8	5,3	5,09	2,36	2,84	1,83	2,84	1,83	2,84	1,83	5,33	2,41	2,98	1,86	1,86
9	6,3	9,52	3,17	4,08	2,14	4,08	2,14	4,08	2,14	29,69	5,50	12,71	3,63	3,63
10	6,3	10,92	3,38	4,18	2,16	4,18	2,16	4,18	2,16	52,13	7,25	19,96	4,52	4,52
\bar{x}			1,97		1,47		1,47		1,47		4,28		3,02	3,02
GL Tratamento		9		9		9		9		9		9		9
QM Tratamento		3,5794		1,2823		1,2823		1,2823		10,2935		3,8210		3,8210
QM Resíduo		0,0017		0,0010		0,0010		0,0010		0,0062		0,0014		0,0014
F		2105,5294**		1282,3000**		1282,3000**		1282,3000**		1660,2419**		2729,2857**		2729,2857**
CV (%)		2,09		2,15		2,15		2,15		1,84		1,24		1,24
Δ (5%)		0,12		0,09		0,09		0,09		0,23		0,11		0,11

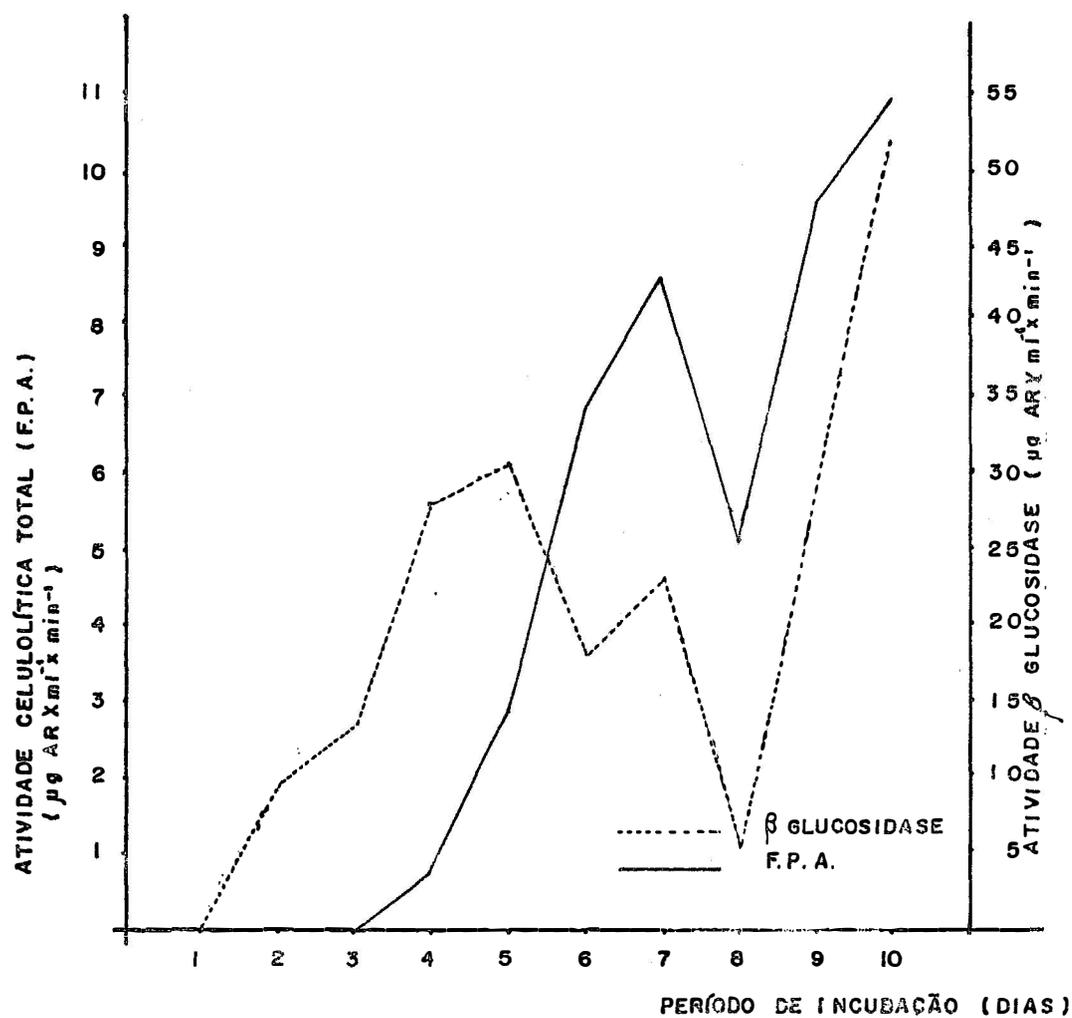


Figura 4 - Atividade celulolítica total (FPA) e β -glucosidase em um período de 10 dias de incubação do fungo *Aspergillus* sp em meio básico líquido.

sp durante um período de incubação de 10 dias em meio básico líquido a pH 6,0, a 35^oC e utilizando uma concentração de bagaço de cana de 15 gramas/litro de meio de cultura.

A atividade FPA não foi observada nos 3 primeiros dias de incubação, enquanto atividade β -glucosidase foi detectada logo no 2^o dia de incubação. Atividade CMCase não foi observada em nenhum dia do período de incubação.

O coeficiente de variação foi de 2,09% para atividade celulolítica FPA, 2,15% para atividade específica FPA, 1,84% para atividade celulolítica β -glucosidase, 1,24% para atividade específica β -glucosidase.

O teste F foi significativo a nível de 1% para todo o experimento.

Pelo teste Tukey pode-se observar que para atividade celulolítica FPA houve diferença significativa (5%) em todos os tratamentos. A atividade celulolítica FPA foi crescendo durante os dias de incubação ocorrendo uma queda no 8^o dia. Posteriormente observou-se ainda um sensível aumento.

Para atividade específica houve um aumento significativo (5%) até o 7^o dia. No oitavo dia houve uma queda significativa (5%) da atividade após a qual ocorreu ainda um razoável aumento.

A atividade celulolítica e específica β -glucosidase apresentou um aumento significativo até o 5º dia. Ocorreu uma queda pronunciada no 8º dia e um posterior aumento.

Nota-se pela Tabela 5 e Figura 4 que as atividades celulolíticas FPA e β -glucosidase atingiram os maiores valores no 10º dia de incubação. Verificou-se que no 8º dia houve quedas significativas nas atividades enzimáticas daquelas enzimas.

4.3. PRODUÇÃO DE ENZIMAS CELULOLÍTICAS PELO FUNGO *Trichoderma reesei* QM 9414

A produção de enzimas celulolíticas pelo fungo padrão *T. reesei* QM9414, em um período de 10 dias de desenvolvimento e o teste F e Tukey são mostrados na Tabela 6 e Figura 5.

A atividade FPA começou a ser detectada no 2º dia de incubação. Já a atividade β -glucosidase foi observada no 3º dia.

Os coeficientes de variação verificados foram de 2,32% para atividade celulolítica FPA; 2,09% para atividade específica FPA. Para atividade β -glucosidase tivemos 1,41% para atividade celulolítica e 0,87% para atividade es

Tabela 6 - Atividade extracelular total da celulase (FPA) e β -glucosidase do fungo *Trichoderma reesei* QM 9414 crescido em meio básico líquido pH 5,0, 28°C e concentração de bagaço de cana de 15 gramas/litro de meio de cultura, em 10 dias de desenvolvimento e a análise de variância. Atividade celulolítica foi expressa em $\mu\text{g AR} \times \text{m}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ e atividade específica em $\mu\text{g AR} \times \mu\text{g prot}^{-1} \times \text{h}^{-1}$.

Dias de incubação	pH	β -glucosidase					
		FPA			β -glucosidase		
		Atividade celulolítica Valor obtido	Atividade específica Valor estimado	Atividade específica Valor obtido	Atividade celulolítica Valor obtido	Atividade específica Valor estimado	Atividade específica Valor obtido
1	6,3	0,00	0,71	0,00	0,00	0,71	0,71
2	5,5	5,45	2,44	3,08	0,00	0,71	0,71
3	5,0	9,29	3,13	2,86	20,05	4,53	2,58
4	5,2	20,48	4,58	4,68	34,93	5,95	2,91
5	5,2	41,69	6,49	9,75	47,78	6,95	3,42
6	5,2	41,87	6,41	9,40	49,02	7,03	3,39
7	5,3	65,13	8,10	14,17	62,02	7,85	3,72
8	6,0	77,50	8,83	15,73	59,87	7,77	3,56
9	6,0	78,60	8,89	16,38	59,96	7,78	3,59
10	6,0	78,82	8,90	16,11	55,51	7,48	3,44
\bar{X}			5,85			2,91	
GL Tratamento		9				9	
QM Tratamento		26,8260		4,1558		23,6603	3,9922
QM Resíduo		0,0184		0,0037		0,0064	0,0006
F		1457,9348**		1123,1892**		3696,9219**	6653,6667**
CV (%)		2,32		2,09		1,41	0,87
Δ (5%)		0,39		0,18		0,23	0,07

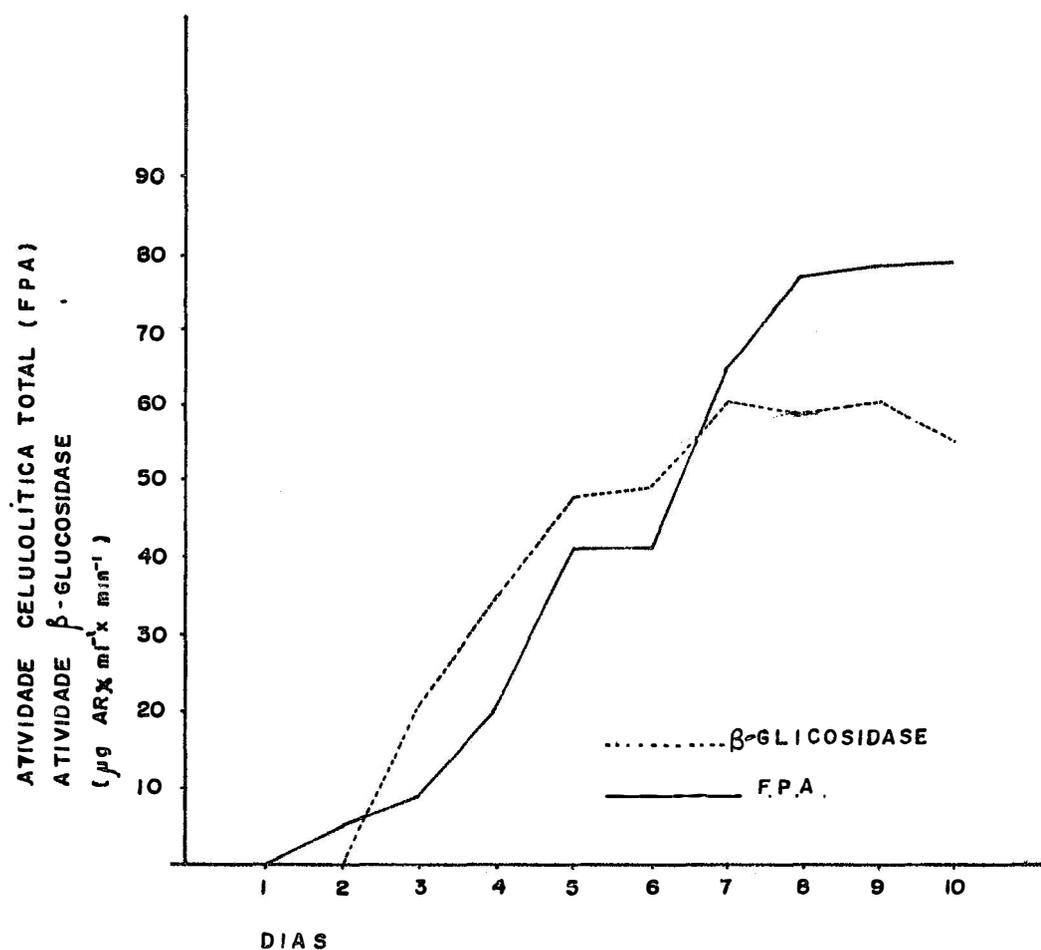


Figura 5 - Atividade celulolítica total (FPA) e β -glucosidase durante um período de 10 dias de incubação do fungo *T. reesei* QM 9414, em meio básico líquido, pH 5,0; 28^oC e 15 gramas de bagaço de cana/litro de meio de cultura.

pecífica.

A análise de variância foi significativa a nível de 1% para as atividades enzimáticas.

O teste Tukey mostrou que a atividade celulolítica e específica FPA foi aumentando até o 8º dia a partir do qual parece ter estabilizado.

Para atividade celulolítica e específica β -glucosidase houve aumento significativo até o 7º dia de incubação com uma tendência a se estabilizar a partir do 8º dia.

4.4. COMPARAÇÃO ENTRE O ISOLADO *Aspergillus* sp E O PADRÃO *Trichoderma reesei* QM 9414

A comparação das atividades da enzima celulolítica entre o fungo isolado de bagaço de cana *Aspergillus* sp e o fungo padrão *Trichoderma reesei* QM9414 está representada graficamente nas Figuras 6 a 9.

Pela Figura 6 pode-se ver a atividade celulolítica FPA para os 2 fungos. A atividade celulolítica para o *Aspergillus* sp começou a aparecer no 4º dia de incubação enquanto para *T. reesei* QM9414 no 2º dia.

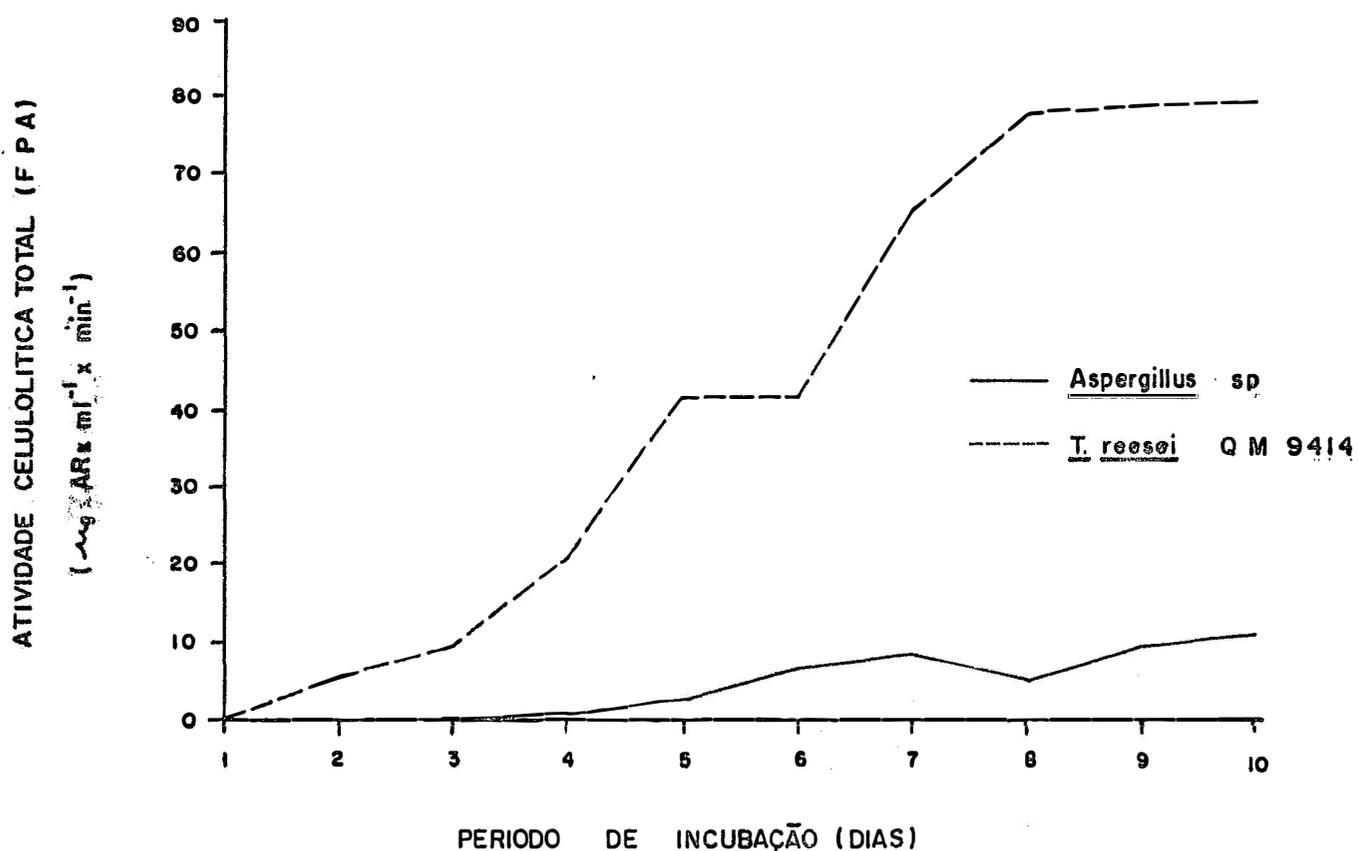


Figura 6 - Comparação da atividade celulolítica total (FPA) entre o fungo *Aspergillus* sp cultivado a 35°C, pH 6,0 e o *T. reesei* QM 9414 cultivado a 28°C, pH 5,0, em uma concentração de bagaço de cana de 15 gramas/litro de meio básico líquido durante 10 dias de incubação.

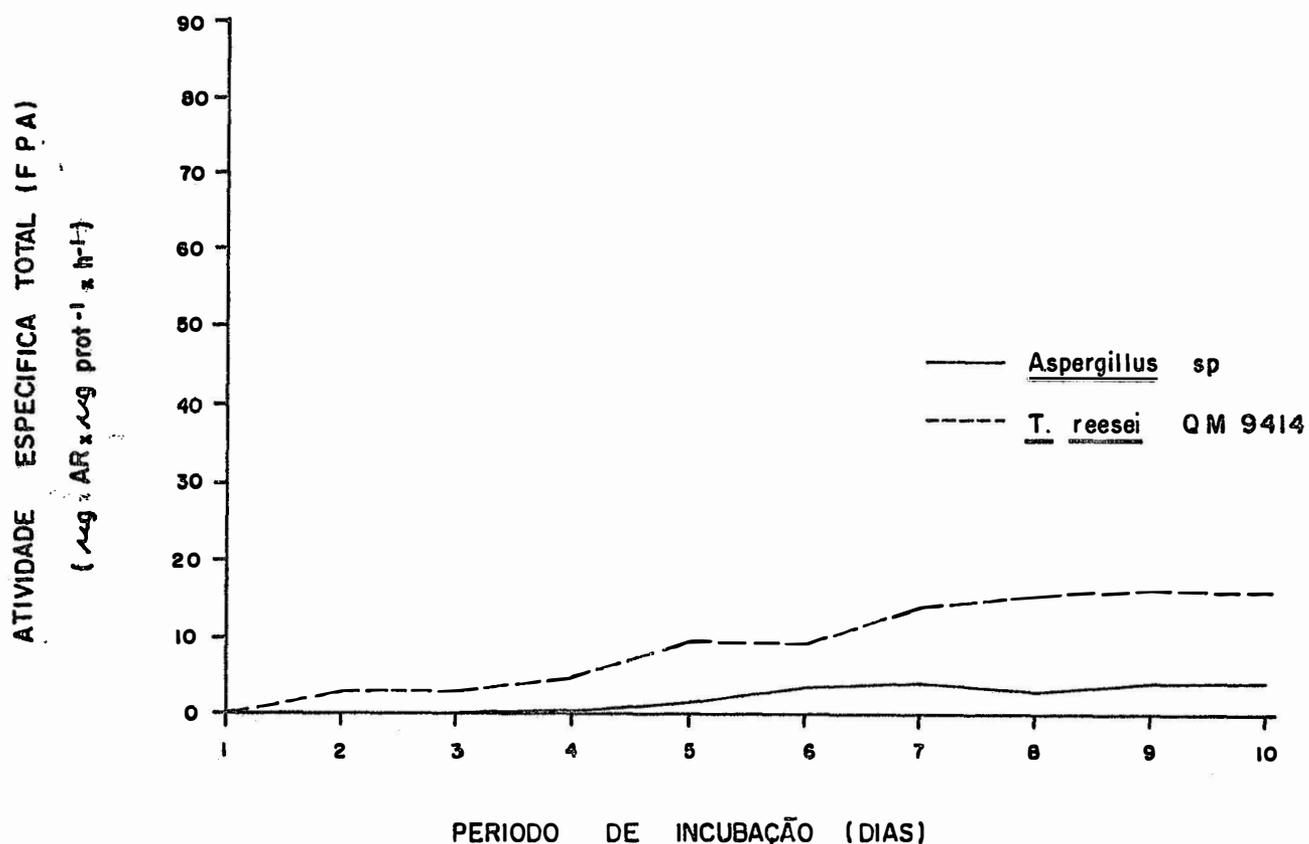


Figura 7 - Comparação entre a atividade específica total (FPA) do fungo *Aspergillus* sp cultivado em meio básico líquido a 35°C, pH 6,0 e do fungo *T. reesei* QM 9414, cultivado a 28°C, pH 5,0, utilizando concentração de bagaço de cana de 15 gramas/litro de meio básico, durante um período de 10 dias.

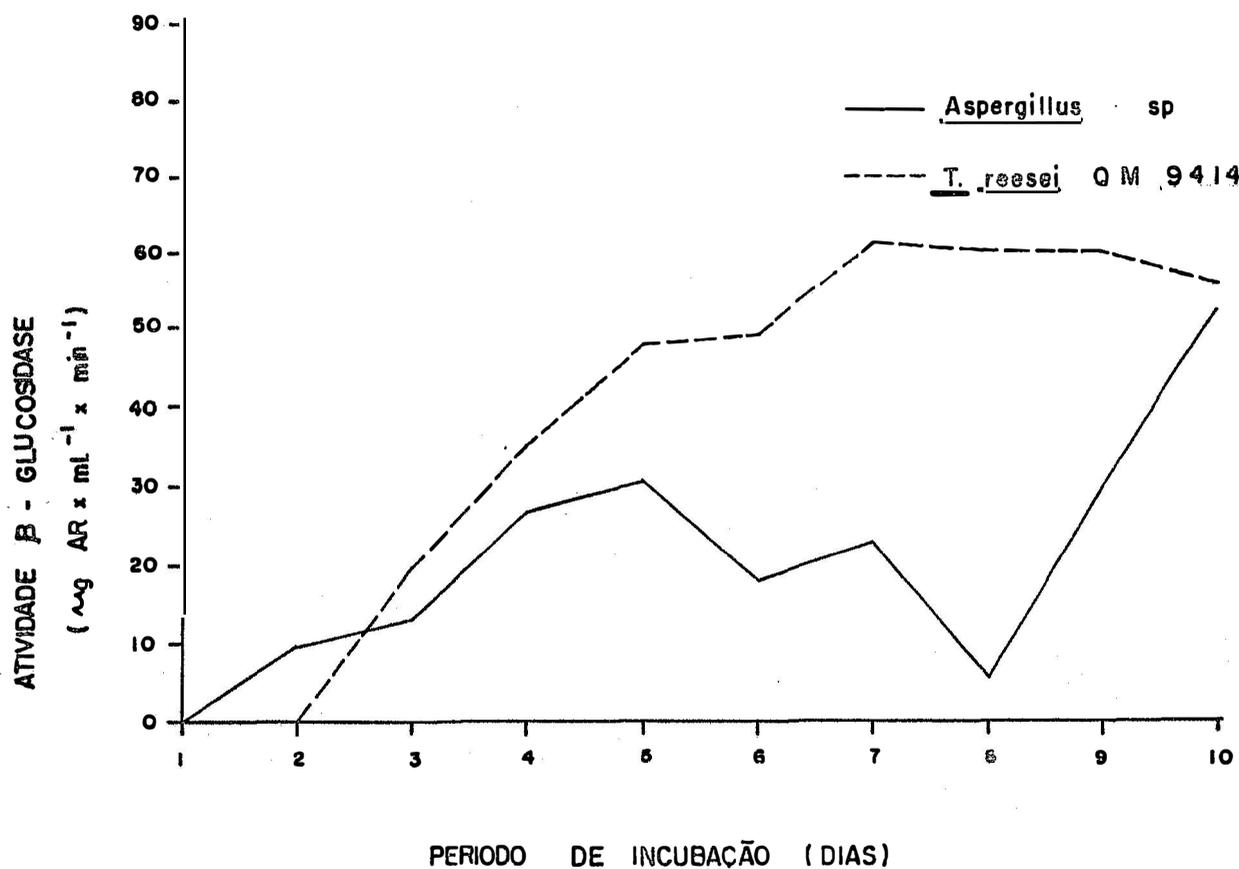


Figura 8 - Comparação entre a atividade celulolítica β-glu cosidase do fungo *Aspergillus* sp cultivado a 35°C, pH 6,0 e do fungo *T. reesei* QM 9414 cultiva do a 28°C, pH 5,0 em meio básico líquido com concentração de bagaço de cana de 15 gramas/li-tro de meio de cultura por 10 dias.

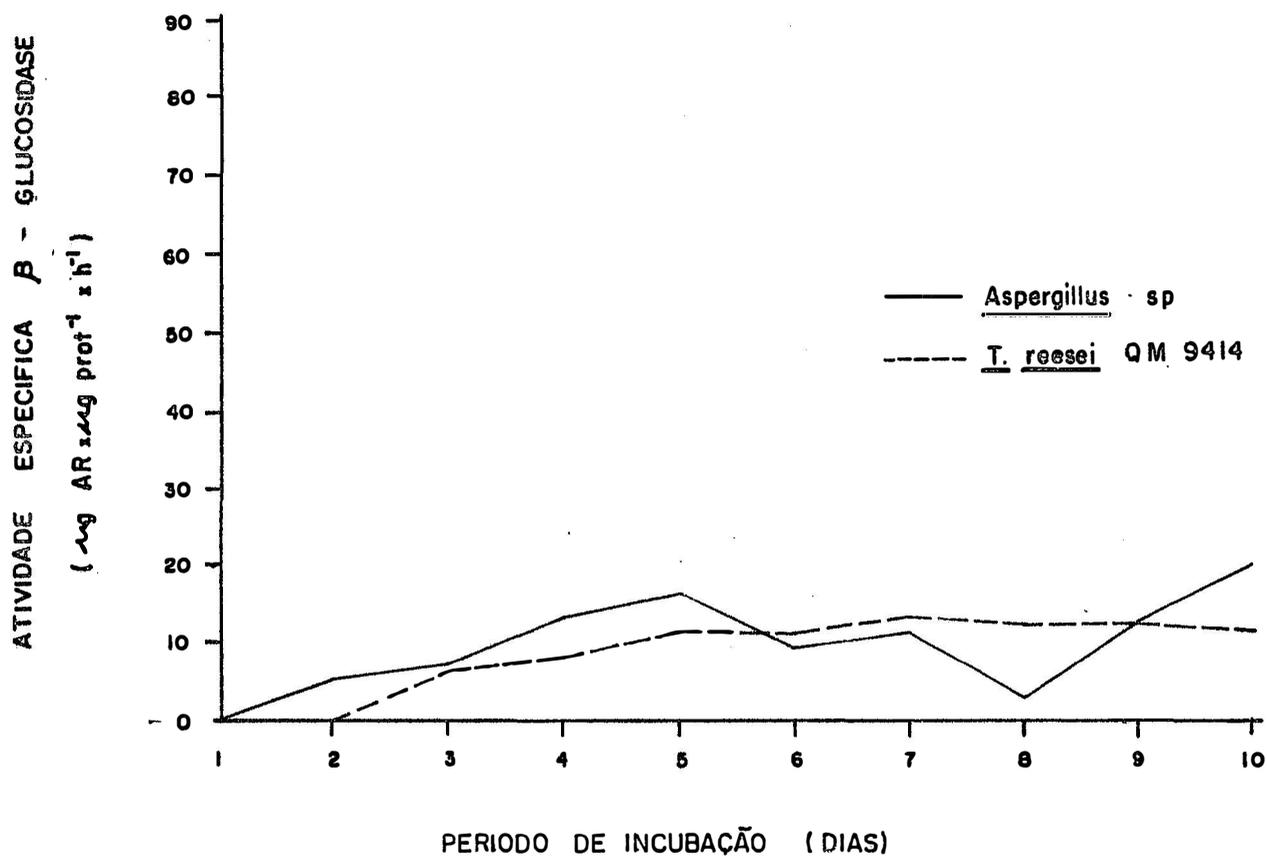


Figura 9 - Comparação da atividade específica β -glucosidase entre o fungo *Aspergillus* sp cultivado a 35°C , pH 6,0, concentração de bagaço de cana de 15 gramas/litro de meio básico líquido e o fungo *T. reesei* QM 9414 cultivado a 28°C , pH 5,0, concentração de bagaço de cana de 15 gramas/litro de meio básico, durante 10 dias.

Foi bastante expressiva a diferença entre os 2 fungos em relação à atividade celulolítica FPA. *Aspergillus* sp mostrou atividade bem menor que o padrão durante o período de incubação.

Para atividade específica FPA o *T. reesei* QM9414 também mostrou atividade maior durante todo o período de incubação (Figura 7) em relação ao fungo testado *Aspergillus* sp, contudo a diferença se mostrou bem menor do que a observada na atividade celulolítica total (Figura 6).

Em relação à atividade celulolítica β -glucosidase notou-se que para *Aspergillus* sp ela estava presente no 2º dia de incubação enquanto que no *T. reesei* QM9414 a atividade celulolítica β -glucosidase foi observada a partir do 3º dia de incubação. O fungo *T. reesei* QM9414 apresentou um aumento regular na atividade celulolítica β -glucosidase, porém *Aspergillus* sp mostrou algumas quedas acentuadas como no 6º e 8º dia de incubação (Figura 8).

No 10º dia de incubação a diferença entre a atividade celulolítica β -glucosidase dos 2 fungos não foi marcante (Figura 8).

Para atividade específica β -glucosidase o fungo *T. reesei* QM9414 apresentou uma curva mais uniforme que o fungo *Aspergillus* sp.

Em relação a essa atividade, pode-se notar que durante o decurso do experimento os dois são equivalentes mas no 10º dia de incubação o *Aspergillus* sp apresentou uma atividade específica β -glucosidase razoavelmente superior. (Figura 9).

4.5. SOBREVIVÊNCIA DE CONÍDIOS DE *Aspergillus* sp EXPOSTOS A RADIAÇÃO GAMA E OBTENÇÃO DE MUTANTES MORFOLÓGICOS

A Tabela 7 e Figura 10 mostram a porcentagem de sobrevivência do fungo *Aspergillus* sp exposto a diversas doses de radiação.

Mutantes morfológicos foram obtidos quando os esporos do fungo *Aspergillus* sp foram expostos a doses de radiação de 0,8 e 1,0 kGy. Estes foram testados com relação as atividades FPA, β -glucosidase e carboximetilcelulase e os resultados comparados com os do tipo selvagem. Os mutantes obtidos apresentaram coloração diferente do selvagem. Foram denominados de M0, M1, M2, M3, M4.

A Figura 11 mostra o aspecto das colônias dos mutantes obtidos por irradiação do fungo *Aspergillus* sp.

A uma dose de 0,8 kGy foi possível obter os mutantes M0 e M4. M0 apresentou coloração branca, M4 exi-

Tabela 7 - Número de colônias e porcentagem de sobrevivência do fungo *Aspergillus* sp quando esporos foram expostos a radiação gama (Co-60) com taxa de dose de 1,5 kGy/hora , com doses de 0; 0,1; 0,2; 0,4; 0,8 e 1,0 kGy.

Dose (kGy)	Número de colônias	Porcentagem de sobrevivência
0	$4,8 \times 10^6$	100,0
0,1	$2,9 \times 10^6$	44,2
0,2	$1,5 \times 10^6$	33,8
0,4	$5,7 \times 10^5$	25,8
0,8	$2,2 \times 10^5$	4,0
1,0	$5,7 \times 10^4$	1,2

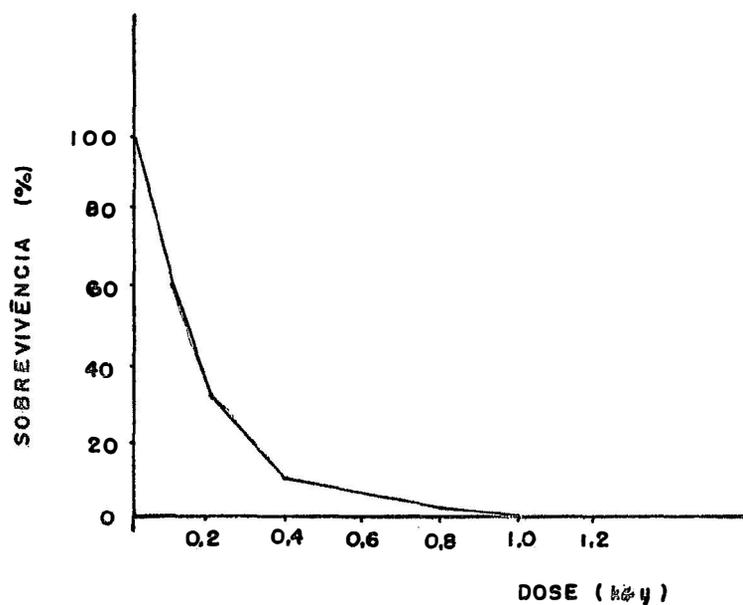


Figura 10 - Curva de sobrevivência do fungo *Aspergillus* sp exposto à radiação gama (Co-60), com uma taxa de dose de 1,5 kGy/hora e doses de 0; 0,1; 0,2; 0,4; 0,8; 1,0 kGy.



Figura 11 - Aspecto das colônias do selvagem e dos mutantes denominados de M0, M1, M2, M3 e M4, obtidos quando esporos do fungo *Aspergillus* sp foram irradiados a diversas doses de radiação em fonte de Co-60. (Taxa de dose = 1,5 kGy/h).

biu colônias pretas.

M1, M2 e M3 foram obtidos por irradiação de esporos a 1 kGy. M1 mostrou colônias de cor cinza. As colônias de M2 foram de coloração marrom e bastante pequenas e M3 apresentou coloração cinza clara.

4.6. TESTES DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA PARA OS MUTANTES MORFOLÓGICOS OBTIDOS POR IRRADIAÇÃO DE CONÍDIOS DO FUNGO *Aspergillus* SP,

As Tabelas 8, 9, 10 e 11 e as Figuras 12 e 13 mostram as atividades celulolíticas e específicas dos mutantes em relação ao selvagem. Os mutantes denominados de M3 e M4 não apresentaram nenhum tipo de atividade do complexo celulolítico.

Após um período de 4 dias de incubação, observou-se (Tabela 8) que a atividade celulolítica FPA foi encontrada apenas no *Aspergillus* sp e no mutante M2. Os mutantes M0 e M1 não mostraram atividade celulolítica FPA.

O coeficiente de variação encontrado na análise das atividades enzimáticas dos mutantes foi de 1,22% e de 1,90% em relação aos dias de incubação.

O teste F foi significativo a nível de 1%

Tabela 8 - Atividade extracelular total da celulase (FPA) dos mutantes M0, M1 e M2 quando comparados com o selvagem (S) e a análise de variância. Atividade celulolítica foi expressa em $\mu\text{g AR} \times \text{ml}^{-1} \times \text{min}^{-1}$.

Microorganismo	Dias de incubação										\bar{X}
	Valor obtido					Valor estimado ($\sqrt{x + 0,5}$)					
	4	7	10	4	7	10	4	7	10	10	
S	0,69	8,56	10,92	1,09	3,01	3,38					2,49
M0	0,00	5,77	7,54	0,71	2,50	2,83					2,01
M1	0,00	2,58	8,29	0,71	1,75	2,96					1,81
M2	1,84	5,74	8,61	1,53	2,50	3,02					2,35
\bar{X}				1,01	2,44	3,05					

Causa de Variação	GL	SQ	QM	F
Mutantes	3	2,6105	0,8702	1243,1428**
Resíduo (a)	8	0,0057	0,0007	
Parcelas	11	2,6162		
Dias	2	26,2791	13,1395	7729,1176**
Mutantes x Dias	6	1,6616	0,2769	162,8823**
Resíduo (b)	16	0,0266	0,0017	
Sub-parcelas	35	30,5835		

$CV_a(\%) = 1,22$; $CV_b(\%) = 1,90$; $\Delta_a(5\%) = 0,04$; $\Delta_b(5\%) = 0,04$

Tabela 9 - Atividade específica extracelular total da celulase (FPA) dos mutantes M0, M1 e M2 quando comparados com o selvagem (S) e a análise de variância. Atividade específica foi expressa em $\mu\text{g AR} \times \mu\text{g prot}^{-1} \times \text{h}^{-1}$.

Microorganismo	Dias de incubação						\bar{x}
	Valor obtido			Valor estimado ($\sqrt{x + 0,5}$)			
	4	7	10	4	7	10	
S	0,32	4,13	4,18	0,90	2,15	2,16	1,74
M0	0,00	3,12	3,60	0,71	1,90	2,02	1,54
M1	0,00	1,39	3,15	0,71	1,37	1,91	1,33
M2	0,94	2,71	3,98	1,20	1,81	2,12	1,71
\bar{x}				0,88	1,81	2,05	

Causa de Variação	GL	SQ	QM	F
Mutantes	3	0,9424	0,3141	314,1000**
Resíduo (a)	8	0,0083	0,0010	
Parcelas	11	0,9507		
Dias	2	9,1798	4,5899	9179,8000**
Mutantes x Dias	6	0,5901	0,0983	196,6000**
Resíduo (b)	16	0,0076	0,0005	
Subparcelas	35	10,7282		

$CV_a(\%) = 2,00$; $CV_b(\%) = 1,41$; $\Delta_a(5\%) = 0,05$; $\Delta_b(5\%) = 0,02$.

Tabela 10 - Atividade celulolítica β -glucosidase dos mutantes M0, M1 e M2 quando comparados com o selvagem (S) e a análise de variância. Atividade celulolítica foi expressa em $\mu\text{g AR} \times \text{ml}^{-1} \times \text{min}^{-1}$.

Microorganismo	Dias de incubação									
	Valor obtido					Valor estimado ($\sqrt{x + 0,5}$)				
	4	7	10	4	7	10	4	7	10	\bar{X}
S	27,00	23,11	52,13	5,24	4,86	7,25	5,78			
M0	21,07	30,67	33,69	4,64	5,58	5,84	5,35			
M1	0,00	9,24	14,18	0,71	3,12	3,83	2,55			
M2	8,40	21,29	21,02	2,98	4,67	4,64	4,10			
\bar{X}				3,39	4,56	5,39				
Causa de Variação	GL	SQ	QM	F						
Mutantes	3	56,9781	18,9927	2208,4535**						
Resíduo (a)	8	0,0691	0,0086							
Parcelas	11	57,0472								
Dias	2	24,1589	12,0794	2196,2545**						
Mutantes x Dias	6	9,7987	1,6331	296,9273**						
Resíduo (b)	16	0,0883	0,0055							
Sub-parcelas	35	91,0931								

$CV_a(\%) = 2,08$; $CV_b(\%) = 1,67$; $\Delta_a(5\%) = 0,14$; $\Delta_b(5\%) = 0,08$

Tabela 11 - Atividade específica β -glucosidase dos mutantes M0, M1 e M2 quando comparados com o selvagem (S) e a análise de variância. Atividade específica foi expressa em $\mu\text{g AR} \times \mu\text{g prot}^{-1} \times \text{h}^{-1}$.

Microorganismo	Dias de incubação					\bar{X}	
	4	7	10	4	7		10
S	12,95	11,17	19,96	3,67	3,41	4,52	3,87
M0	11,12	16,61	16,12	3,40	4,13	4,07	3,87
M1	0,00	4,99	5,39	0,71	2,34	2,43	1,83
M2	4,24	10,14	9,72	2,18	3,25	3,19	2,87
\bar{X}				2,49	3,28	3,55	
Causa de Variação	GL	SQ	QM	F			
Mutantes	3	25,6569	8,5523	2311,4324**			
Resíduo (a)	8	0,0293	0,0037				
Parcelas	11	25,6862					
Dias	2	7,3566	3,6783	994,1351**			
Mutantes x Dias	6	3,4610	0,5768	155,8919**			
Resíduo (b)	16	0,0583	0,0037				
Sub-parcelas	35	36,5621					

$CV_a(\%) = 1,96$; $CB_b(\%) = 1,96$; $\Delta_a(5\%) = 0,09$; $\Delta_b(5\%) = 0,06$.

de probabilidade para todos os dados do experimento.

Com relação ao teste Tukey observaram-se diferenças significativas (5%) entre os mutantes. O selvagem mostrou a maior média da atividade celulolítica FPA não sendo superado por nenhum dos mutantes testados.

No 10º dia foram observados os maiores valores para atividade celulolítica FPA para todos os fungos testados.

A atividade específica FPA não foi mostrada pelos mutantes M0 e M1 no 4º dia de desenvolvimento, mas estava presente no 7º dia (Tabela 9).

Pela análise da Tabela 9 verificou-se que o coeficiente de variação para atividade específica FPA foi de 2,00% para os mutantes e de 1,41% para os dias.

O teste F mostrou que houve diferença significativa (1%) entre os mutantes e entre os dias de desenvolvimento.

Aplicando-se o teste Tukey observou-se que o selvagem mostrou a maior atividade específica FPA.

A atividade específica FPA observada no 10º dia diferiu significativamente daquela observada no 4º e 7º dia.

A atividade celulolítica β -glucosidase nao foi apresentada pelo mutante M1 no 4º dia de incubação (Tabela 10).

O coeficiente de variação foi de 2,08% na comparação entre os mutantes e de 1,67% para os dias de incubação.

O teste F mostrou-se significativo a nível de 1% para os resultados obtidos.

Pelo teste Tukey tivemos que o selvagem mostrou atividade celulolítica β -glucosidase significativamente (5%) superior em relação a todos os mutantes testados.

O teste Tukey com relação aos dias de desenvolvimento dos fungos mostrou diferença significativa entre eles. O 10º dia foi superior em relação ao 4º e 7º dia de desenvolvimento.

Atividade específica β -glucosidase é mostrada na Tabela 11. O mutante M1 não mostrou atividade específica β -glucosidase no 4º dia de desenvolvimento. O coeficiente de variação para os mutantes e para os dias de incubação foi de 1,96% em ambos os casos. O teste F foi significativo a nível de 1%.

Aplicando-se o teste Tukey, podemos ver que o mutante M0 mostrou-se superior em relação aos outros mu-

tantes não diferindo significativamente do tipo selvagem.

Houve diferença significativa entre as atividades observadas nos dias de incubação dos fungos. A maior atividade β -glucosidase foi verificada no 10º dia.

As Figuras a seguir representam as atividades celulolíticas extracelular total (FPA) (Figura 12) e β -glucosidase (Figura 13) nos mutantes M0, M1 e M2 quando comparadas com as atividades celulolíticas FPA e β -glucosidase do fungo selvagem.

Em relação à atividade celulolítica FPA nenhum dos mutantes testados superou o tipo selvagem após 10 dias de incubação.

A atividade β -glucosidase também não foi superada pelos mutantes testados.

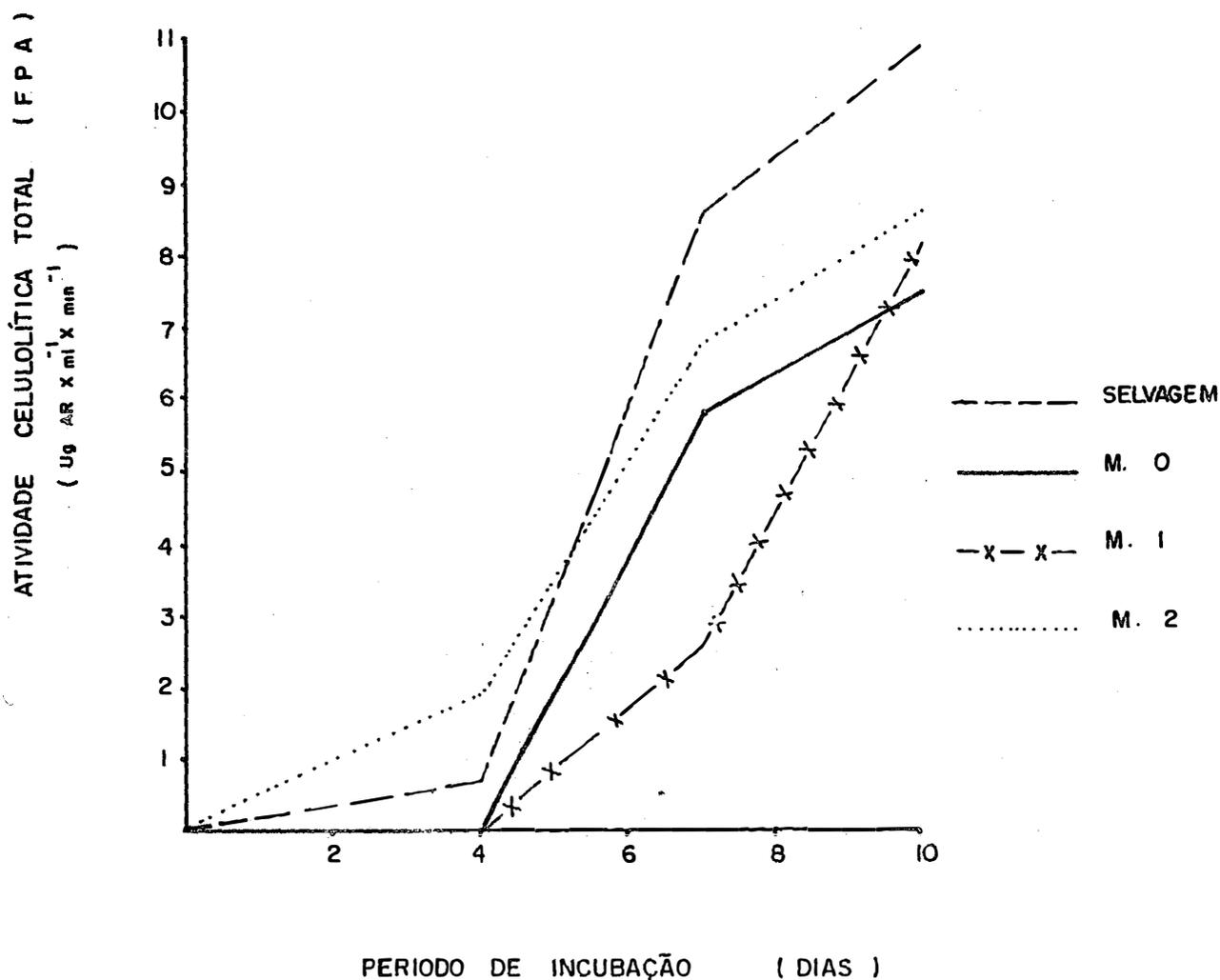


Figura 12 - Atividade celulolítica total (FPA) para os fungos M0, M1, M2 e selvagem quando desenvolvidos em meio básico líquido, pH 6,0, 35°C e concentração de bagaço de cana de 15 gramas/litro de meio de cultura.

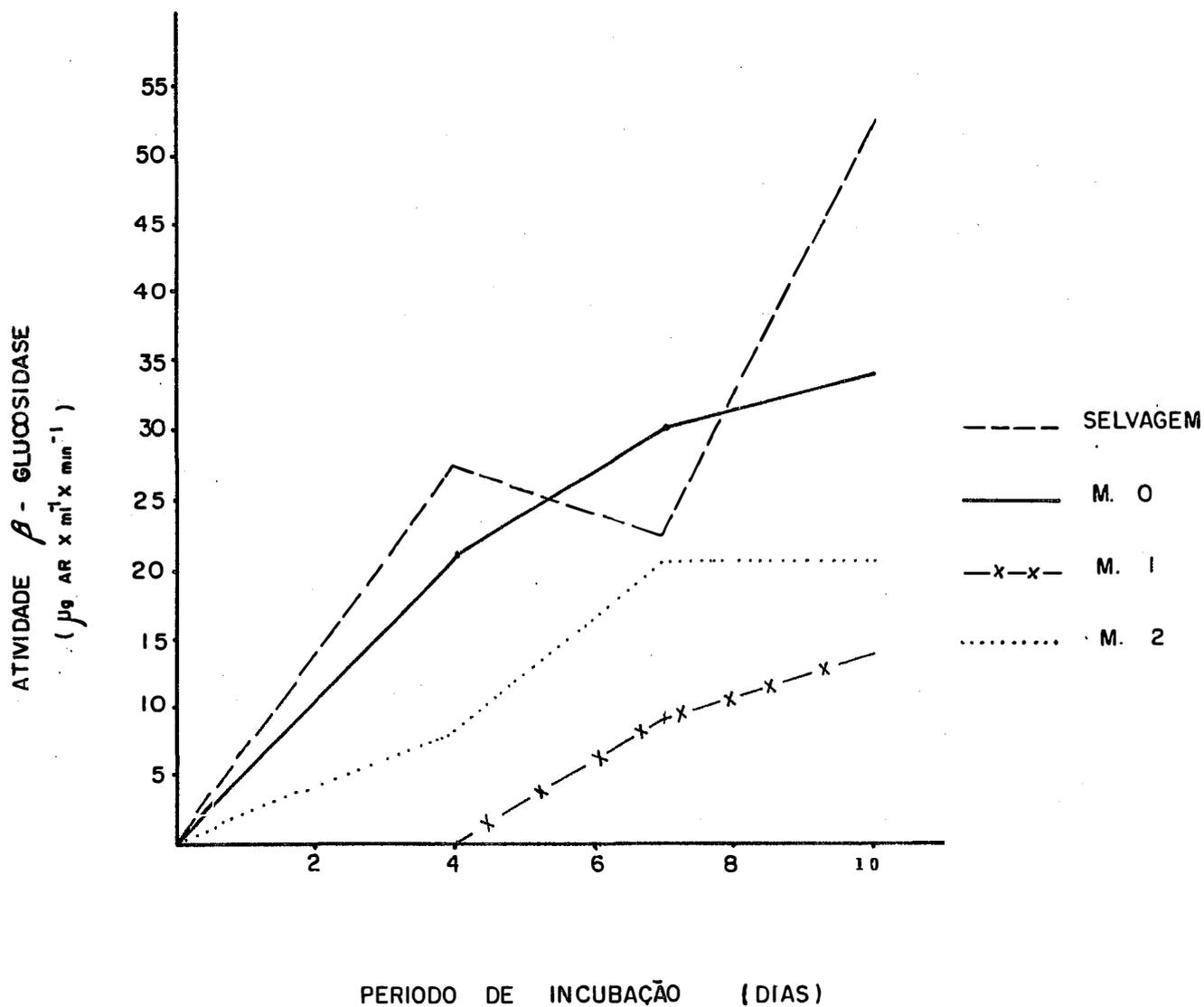


Figura 13 - Comparação entre a atividade β -glucosidase dos fungos M0, M1, M2 e selvagem, quando desenvolvidos em meio básico líquido, pH 6,0, 35°C e concentração de bagaço de cana de 15 gramas/litro meio de cultura.

5. DISCUSSÃO

5.1. SELEÇÃO PARA OBTENÇÃO DE CEPA COM MAIOR CAPACIDADE CELULOLÍTICA

O estudo comparativo da atividade enzimática de diversos microrganismos isolados de bagaço de cana mostrou que a produção de enzimas é bastante variável, sendo que em alguns deles apenas atividade β -glucosidase extracelular foi verificada.

Esta variação já era esperada, pois foi observada por vários autores. FERGUS (1969) comparou diversos fungos quanto a degradação de papel de filtro e produção de Cx, obtendo diferentes valores. PYE *et alii* (1977) verificaram também, ao fazer uma seleção entre vários fungos, que a atividade máxima da enzima Cx extracelular foi diferente para cada um deles.

Mais recentemente DURAND (1984) encontrou valores diferentes para atividade β -D-glucosidase, CMCase, FPA, endo-1,4- β -D-xilanase, β -D-xilosidase e pectinase em estudo comparativo de celulasas e hemicelulasas em fungos.

Diferenças na atividade da celulase em fun

gos superiores foram encontrados por GINTEROVÁ *et alii* (1981) que observaram que grande parte da enzima encontrava-se no micélio e não livre no sobrenadante.

Pela Tabela 1 observou-se evidência de que a atividade enzimática específica é característica de cada isolado sendo maior para o Bg5.

5.2. AVALIAÇÃO DAS CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS NA PRODUÇÃO DE ENZIMAS CELULOLÍTICAS

Pela Tabela 2 observa-se que as atividades enzimáticas foram dependentes da temperatura utilizada, fato que também foi verificado por TANGNU *et alii* (1981) com *Trichoderma reesei* (Rut C-30) onde a atividade β -glucosidase foi fortemente dependente da temperatura usada durante o desenvolvimento e produção da enzima.

A atividade FPA aumentou com a temperatura atingindo os maiores valores a 45°C, que foi a maior temperatura testada. Para β -glucosidase houve aumento da atividade enzimática até 35°C. A temperatura de incubação de 45°C a atividade β -glucosidase foi menor do que aquela a 35°C.

Esse fato sugere que a enzima β -glucosidase do fungo *Aspergillus* sp estudado poderia ser relativamente

instável com respeito à temperatura ou que o aumento da temperatura poderia transformar a fração não enzimática em inibidor da β -glucosidase, fato esse não verificado com a enzima responsável pela atividade FPA.

Pelos resultados pode-se dizer que o fungo *Aspergillus* sp apresentou as melhores atividades enzimáticas em temperaturas mais elevadas.

Em concordância com isto está o trabalho de COUTTS e SMITH (1976) que observaram um aparecimento mais rápido da atividade C1 e Cx em culturas de *Sporotrichum thermophile* incubadas a 45°C. Baixas atividades da enzima celulase ocorreram a 35 e 50°C.

Valores um pouco mais elevados da temperatura foram observados por SADLLER e KHAN (1980) para *Acetivibrio cellulolyticum* quando atividades ótimas da endo e exoglucanase foram obtidas a uma temperatura próxima de 50°C. Também HAYASHIDA e YOSHIOKA (1980) para *Humicola insolens* YH-8, obtiveram uma produção mais significativa de Avicelase e CMCase a 50°C.

A utilização de altas temperaturas de incubação usadas no cultivo de certos fungos para produção de celulase pode ser de bastante interesse uma vez que limita grandemente o número de contaminantes capazes de se desen

volverem, podendo-se utilizar equipamentos menos sofisticados para produção em larga escala (COUTTS e SMITH, 1976).

Outro fator que pode afetar a produção da celulase é o pH do meio de cultivo que deve ser controlado durante a fermentação (DEKKER, 1985).

Para o isolado *Aspergillus* sp verificou-se a influência do pH na produção de enzimas celulolíticas.

Com pH ácido (3,0 e 4,0) foram observadas as mais baixas atividades FPA e β -glucosidase. Quando o pH inicial do meio de cultivo foi acertado para 6,0 - 7,0 houve aumento nas atividades enzimáticas. Em pH maior que 7,0 ocorreu queda pronunciada nas atividades enzimáticas (Tabela 3).

Resultados semelhantes foram obtidos por SHEWALE e SADANA (1978) na produção de celulase e β -glucosidase pelo basidiomiceto denominado CPC-142. Um valor de pH de 6,5 foi encontrado como o mais favorável para produzir altas quantidades de celulase e β -glucosidase. O desenvolvimento e produção das enzimas foram marcadamente inibidos quando o pH inicial foi acima de 7,0 e abaixo de 5,0. Para *Aspergillus* sp esses valores de pH também afetaram a produção de enzimas. Após 96 horas de incubação do fungo *Aspergillus* sp, observou-se um aumento bastante acentuado

do pH do meio de cultivo, principalmente para os pHs iniciais ácidos.

Como fonte de carbono em culturas de *Aspergillus* sp foi utilizado bagaço de cana pré-tratado. Para o fungo *Aspergillus* sp houve aumento na atividade FPA até quando se utilizou 15 gramas de bagaço de cana por litro de meio de cultivo. Em concentrações maiores ocorreu queda na atividade (Tabela 4).

É conhecido que a concentração de celulose no meio de cultivo influencia os níveis de celulase em um número de microrganismos (SHEWALE e SADANA, 1978; MENEZES e DRAETTA, 1979; OKUNEV *et alii*, 1983).

A dependência da biossíntese de enzimas pela concentração de substrato pode ser explicada por uma interação da ação indutiva do substrato e a ação de repressão de seus metabólitos (OKUNEV *et alii*, 1983), ou por não haver um aumento correspondente dos sais minerais no meio de cultivo quando há aumento na concentração de celulose, levando a um decréscimo na produção de enzimas (CHAHAL, 1982).

Outra causa para a aparente diminuição de enzimas observadas em altas concentrações de substrato é o fato delas poderem estar adsorvidas ao substrato consequentemente diminuindo sua detecção no sobrenadante (COUTTS e

SMITH, 1976; SADDLER e KHAN, 1980).

Dados semelhantes aos obtidos para *Aspergillus* sp também foram observados por COUTTS e SMITH (1976) para *Sporotrichum thermophile* quando a atividade CI foi marcadamente reduzida no filtrado da cultura quando os níveis iniciais de substrato (Solka Floc) excedessem 1,5%.

Para atividade β -glucosidase não houve diferenças significativas em relação às concentrações de bagaço de cana usadas. Talvez o uso de menores concentrações de substrato levassem a valores maiores na atividade β -glucosidase, pois de acordo com OKUNEV *et alii* (1983) a síntese de celulasas em *Aspergillus terreus* foi induzida por baixas concentrações de celobiose, gentibiose, sofrorose e lactose. Altas concentrações do substrato (5 gr/l ou mais do indutor) reprime a síntese de celulase.

Entretanto discordando desses autores, SHEWALE e SADANA (1978) sugerem que aumento na concentração de substrato de 0,5 para 3% levou a maior produção de celulase e β -glucosidase por uma espécie de basidiomiceto.

Seria pois de interesse testar concentrações menores e maiores daqueles do presente trabalho.

Analisando-se a atividade enzimática do fungo *Aspergillus* sp durante um período de 10 dias de incuba-

ção notou-se que a atividade FPA começou a aparecer no meio de cultivo a partir do 4º dia de incubação aumentando até o 8º dia quando sofreu uma queda. No 9º e 10º dia ocorreu um aumento bastante pronunciado na atividade FPA (Figura 4).

A atividade β -glucosidase apareceu no 2º dia de desenvolvimento ocorrendo 2 quedas significativas no 6º e 8º dia (Figura 4).

Para ambas as enzimas ocorreu um período "lag" no início da incubação após o qual a produção da enzima aumentou rapidamente (Figura 4). Isto está de acordo com o trabalho de SHEWALE e SADANA (1978) que observaram no basidiomiceto CPC-142, após inoculação, um período "lag" de 2 dias antes de enzimas extracelulares e proteínas alcançarem níveis detectáveis.

Esse fato é também confirmado por CHANG e STEINKRAUS (1982) que para *Volvariella volvacea* após um período "lag" as enzimas celulolíticas começaram a aparecer.

O perfil das variações de pH durante os 10 dias de incubação do fungo *Aspergillus* sp (Tabela 5) pode ser comparável ao obtido por ERIKSSON e JOHNSRUD (1983) com um mutante de *Sporotrichum pulverulentum* denominado de linhagem 63, que mostrou um período "lag" de 1-2 dia antes da enzima extracelular alcançar níveis detectáveis. Os mes

mos autores observaram que o pH do meio elevou-se inicialmente, seguindo-se uma queda e posterior aumento, o qual permaneceu estável durante o resto do período de desenvolvimento.

Esse fato é explicado por CHANG e STEINKRAUS (1982) relatando que a presença dessas enzimas provoca uma queda no pH do meio. Como o meio contém peptona, a desaminação dos aminoácidos da peptona libera amônia para o meio, o que causa um aumento do pH. Com o desenvolvimento ativo ocorre rápido consumo de nitrogênio e celulose produzindo grande quantidade de ácidos e por isso o valor do pH diminui rapidamente. O pH pode elevar-se posteriormente devido a vagarosa autólise celular.

Observa-se na Tabela 5 que a atividade FPA do *Aspergillus* sp apareceu após atividade β -glucosidase estar presente no meio de cultivo.

Essa observação também foi feita por TRIVEDI e RAO (1979) que em cultura de *Aspergillus fumigatus* a β -glucosidase apareceu primeiro, seguida por endoglucanase e exoglucanase.

Resultados semelhantes foram encontrados por SADANA *et alii* (1979) em trabalhos com *Sclerotium rolfsii* e seu mutante onde endo- β -glucanase, β -glucosidase e celo-

biase apareceram no 3º dia de desenvolvimento, enquanto FPA no 5º dia.

O aparecimento da atividade β -glucosidase no meio de cultivo antes da atividade FPA também foi observada por TRIVEDI e RAO (1981) onde para *Fusarium* sp β -glucosidase apareceu no filtrado da cultura antes da atividade de endo ou exoglucanase ser detectada.

5.3. PRODUÇÃO DE CELULASE PELO FUNGO *Trichoderma reesei* QM 9414

A atividade FPA para o fungo *T. reesei* QM 9414 mostrou um aumento até o 8º dia a partir do qual pareceu ter se estabilizado (Figura 5).

Para β -glucosidase a atividade enzimática sofreu uma queda no 8º dia a partir da qual não ocorreu mais aumento da atividade (Figura 5).

Pela Tabela 6 observa-se que atividade FPA foi detectada no 2º dia de incubação enquanto β -glucosidase foi detectada no 3º dia. Esse fato também foi observado por GOKSOYR e ERIKSEN in ROSE (1980) para *Trichoderma viride* QM 9123 e QM 9414 cuja produção de β -glucosidase ocorreu com maior atraso do que outras enzimas.

Pelos dados da Tabela 6, verificou-se um aumento inicial do pH do meio de cultivo seguido de uma queda. No 8º dia houve um aumento e o pH se estabilizou até o 10º dia de desenvolvimento.

Dados semelhantes foram observados por MANDELS e WEBER in GOULD (1969) com *Trichoderma viride*, que verificaram um "lag" na produção de celulase após inoculação com elevação do pH, particularmente se peptona estava presente. Posteriormente ocorreu queda no pH e celulase apareceu no meio. Finalmente celulose foi consumida e o pH subiu cessando a produção de celulase.

GOKSOYR e ERIKSEN in ROSE (1980) citam que em cultura de *Trichoderma viride* QM 9123 e QM 9414, durante rápida queda no pH as celulasas foram produzidas. Esses autores explicam que o pH do meio caiu devido a alta atividade metabólica havendo a indução da celulase em um período de alta metabolização. A produção de ácido poderia ter uma função regulatória.

5.4. COMPARAÇÃO ENTRE O ISOLADO *Aspergillus* sp E O PADRÃO *Trichoderma reesei* QM 9414

Comparando-se as atividades enzimáticas do complexo celulólitico entre o fungo isolado de bagaço de

cana *Aspergillus* sp e o padrão *Trichoderma reesei* QM 9414 observou-se que o fungo *Aspergillus* sp não superou o padrão na atividade FPA (Figura 6 e 7).

Em relação à atividade FPA isso já era esperado uma vez que *Trichoderma viride* (*reesei*) tem sido descrito como a linhagem com maior atividade celulolítica conhecida (GOKSOYR e ERIKSEN, *in* ROSE, 1980; DEKKER, 1985) sendo o produtor de um complexo celulolítico estável (MANDELS e WEBER, *in* GOULD, 1969).

Os resultados mostrados na Figura 8 indicaram que a atividade celulolítica β -glucosidase do *Aspergillus* sp sofreu um grande acréscimo tendo atingido valores equivalentes aos dos *Trichoderma reesei* QM 9414 no 10º dia de incubação.

Embora não tenhamos resultados além desse período há indicações de que o *Aspergillus* sp poderia alcançar valores maiores de atividade celulolítica β -glucosidase do que aquela do *T. reesei* QM 9414, pois a partir do 7º dia a atividade enzimática desse fungo pareceu ter se estabilizado.

O exame da Figura 9 mostra que as atividades específicas β -glucosidase foram praticamente a mesma durante os 10 dias de incubação. Contudo os valores do 10º dia parecem justificar a indicação citada an-

teriormente embora o *Trichoderma reesei* QM 9414 tenha apresentado uma produção mais estável.

Para os resultados obtidos deve-se também levar em consideração que o bagaço de cana não é um bom indutor do complexo celulolítico (SHEWALE e SADANA, 1978; JOGLEKAR e KARANTH, 1984) para os fungos testados e que lignina e certos fenóis (produtos da degradação da lignina) têm sido mostrado serem inibidores do desenvolvimento de linhagens mutantes de *Trichoderma reesei* bem como na produção de celulase e β -glucosidase por esse fungo. Esse efeito é bastante crítico quando resíduos lignocelulósicos autohidrolizados por "steam-explosion" são usados para produção de celulase (DEKKER, 1985).

5.5. OBTENÇÃO DE MUTANTES UTILIZANDO FONTE DE RADIAÇÃO GAMA (^{60}Co)

Como resultado do tratamento de esporos do fungo *Aspergillus* sp com radiação gama foi possível obter diversos mutantes com características morfológicas diferentes das do tipo selvagem.

O uso de agentes mutagênicos físicos ou quí-

micos tem levado a mudanças morfológicas em diversos fungos como em mutantes obtidos a partir de *Sclerotium rolfsii* (SADANA *et alii*, 1979), mutantes do isolado denominado de K1 (GUPTA *et alii*, 1981), mutantes de *Talaromyces emersonii* CBS 81470 (MOLONEY *et alii*, 1983) e mutantes de *Penicillium funiculosum* (JOGLEKAR e KARANTH, 1984).

Dos mutantes morfológicos obtidos nenhum superou o selvagem na produção de atividade FPA e β -glucosidase, sendo que os mutantes denominados de M3 e M4 perderam a capacidade de produzir atividade enzimática (Tabelas 8, 9, 10, 11).

Outros autores também obtiveram alguns mutantes que não mostraram atividade enzimática ou houve decréscimo na atividade em comparação com o selvagem. GUPTA *et alii* (1981) obtiveram a partir do isolado K1, alguns mutantes que perderam a capacidade de sintetizar CMCase (KM1, KM2 e KM3), outros que mostraram decréscimo na atividade (KM6) e outros com aumento da capacidade de produção de CMCase e β -glucosidase (KM7). ERIKSSON e JOHNSRUD (1983) isolaram diversos mutantes de *Sporotrichum pulverulentum* sendo que entre eles a linhagem 63-2 mostrou menor atividade FPA e endo-1,4- β -D-glucanase e endo-1,3- β -D-xilanase do que o selvagem.

A utilização da radiação gama com o objetivo de induzir mutações para melhorar a produção de enzimas por microrganismos também foi usada nos trabalhos de BAILEY e NEVALAINEN (1981) e MACRIS (1984) obtendo resultados positivos para *Trichoderma reesei* (BAILEY e NEVALAINEN, 1981) e *Alternaria alternata* (MACRIS, 1984).

Dentre os mutantes obtidos e interessante destacar as atividades de β -glucosidase do mutante M0 e selvagem.

Embora as colônias do mutante M0 sejam brancas em contraste com as do selvagem que são verdes a atividade da β -glucosidase durante os 7 primeiros dias de incubação parece ser equivalente a do selvagem, mostrando um comportamento mais homogêneo. Este fato pode estar relacionado com uma maior estabilidade da β -glucosidase podendo se constituir em um mutante promissor no sentido de melhorar o fungo *Aspergillus* sp. (Figura 13).

6. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos pode-se concluir que:

1. Dos 5 fungos isolados do bagaço de cana aquele classificado como uma espécie de *Aspergillus* sp foi o que apresentou maior atividade enzimática.

2. As condições ótimas para produção de enzimas celulolíticas pelo fungo *Aspergillus* sp foram:

2.1. Temperatura

2.1.1. 45°C para atividade FPA.

2.1.2. 35°C para atividade β -glucosidase.

2.2. pH:

2.2.1. 7,0 para atividade FPA.

2.2.2. 6,0 para atividade β -glucosidase.

2.3. Concentração de substrato:

2.3.1. 15 gramas por litro de meio de cultivo para atividade FPA.

2.3.2. Para atividade β -glucosidase não houve diferenças em nenhuma das concentrações de substrato usadas.

2.4. Período de incubação:

2.4.1. No 10º dia de incubação foi detectada a maior atividade enzimática para ambas enzimas.

3. Não houve produção de CMCase em nenhuma das condições usadas.
4. A atividade celulolítica e específica FPA apresentada por *Aspergillus* sp foi 10,92 e 4,18 $\mu\text{g AR} \times \text{ml}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ e para *Trichoderma reesei* 78,82 e 16,11 $\mu\text{g AR} \times \text{ml}^{-1} \times \text{min}^{-1}$. Para atividade celulolítica e específica β -glucosidase os valores obtidos para *Aspergillus* sp foram de 52,13 e 19,96 $\mu\text{g AR} \times \text{ml}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ enquanto para *Trichoderma reesei* foram de 55,51 e 11,35 $\mu\text{g AR} \times \text{ml}^{-1} \times \text{min}^{-1}$.
5. Os mutantes morfológicos testados não superaram o selvagem na atividade enzimática FPA e β -glucosidase, não apresentando atividade CMCase.
6. O mutante M0 com características morfológicas diferentes do selvagem apresentou uma atividade celulolítica específica β -glucosidase equivalente à do selvagem mas com um aumento de atividade mais regular.

7. LITERATURA CITADA

- BAILEY, M.J. e K.M.H. NEVALAINEN, 1981. Induction, isolation and testing of stable *Trichoderma reesei* mutants with production of solubilizing cellulase. *Enzyme Microb. Technol.*, 3:153-157.
- BRADFORD, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein - dye binding. *Anal Biochem.*, 72:248-254.
- CHAHAL, D.S., 1982. Enzymatic hydrolysis of cellulose "State - of - the - art". Division of Energy Research and Development. Canadá, 74p.
- CHANG, S.C. e K.H. STEINKRAUS, 1982. Lignocellulolytic enzymes produced by *Volvariella volvacea*, the edible straw mushroom. *Appl. Environ. Microbiol.*, 43:440-446.
- CHOUDHURY, N.; N.W. DUNN e P.P. GRAY, 1981. Use of a combined *Cellulomonas* and *Trichoderma* cellulase preparation for cellulose saccharification. *Biotechnol. Lett.*, 3(9):493-496.
- COUTS, A.D. e R.E. SMITH, 1976. Factors influencing the production of cellulases by *Sporotrichum thermophile*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 31(6):819-825.

- DEKKER, R.F.H., 1985. Developments on enzymatic hydrolysis of cellulosic materials and aspects of the fermentation of produced sugars. Division of Chemical and Wood technology, Clayton, Victoria. Australia, 81p.
- DESHPANDE, V., K.E. ERIKSSON e B. PETTERSSON, 1978. Production, purification and partial characterization of 1,4 β -glucosidase enzymes from *Sporotrichum pulverulentum*. *Eur. J. Biochem.*, 90:191-198.
- DURAND, H., 1984. Comparative study of cellulases and hemicellulases from four fungi: mesophiles *Trichoderma reesei* and *Penicillium* sp and thermophiles *Thielavia terrestris* and *Sporotrichum cellulophilum*. *Enzyme Microb. Technol.*, 6:175-180.
- ERIKSSON, K.E. e S.C. JOHNSRUD, 1983. Mutants of the white - rot fungus *Sporotrichum pulverulentum* with increased cellulase and β -D-glucosidase production. *Enzyme Microb. Technol.*, 5:425-429.
- FAHRNICH, P. e K. IRRGANG, 1981. Cellulase and protein production by *Chaetomium cellulolyticum* strains grown on cellulosic substrates. *Biotechnol. Lett.*, 3:201-206.

- FAHRICH, P. e K. IRRGANG, 1982. Conversion of cellulose to sugars and cellobionic acid by the extracellular enzyme system of *Chaetomium cellulolyticum*. *Biotechnol. Lett.*, 4:775-780.
- FARKAS, V., I. LABUDOVÁ, S. BAUER e L. FERENCZY, 1981. Preparation of mutants of *Trichoderma viride* with increased production of cellulase. *Folia Microbiol.*, 26:129-132.
- FENNINGTON, G.D., D. NEUBAUER e F. STUTZENBERGER, 1984. Cellulase biosynthesis in a catabolite repression-resistant mutant of *Thermomonospora curvata*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 47:201-204.
- FERGUS, C., 1969. Cellulolytic thermophilic fungi. *Mycologia*, 61:120-129.
- FUJIO, Y. e M. MOO-YOUNG, 1980. Isolation of cellulolytic fungi and some properties of isolated fungi for cellulose biodegradation. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 26:37-44.
- GINTEROVÁ, A.; O. JANOTKOVA e L. FINDOVÁ, 1981. Effect of cultivation conditions on cellulase activity of higher fungi. *Folia Microbiol.*, 26:133-136.

- GOEL, S.C. e K.B. RAMACHANDRAN, 1983. Comparison of the rates of enzymatic hydrolysis of pretreated rice straw and bagasse with cellulases. *Enzyme Microb. Technol.*, 5:281-284.
- GOKHALE, D.V.; V.S. PUNTAMBEKAR, A.K. VYAS, S.G. PATIL e D.N. DEOBAGKAR, 1984. Hyper production of β -glucosidase by an *Aspergillus* sp. *Biotechnol. Lett.*, 6:719-722.
- GOKSOYR, J. e J. ERIKSEN, 1980. Cellulases. In: Rose, A.H. Microbial enzymes and bioconversions. Economic Microbiology Academic Press, vol. 5. 693p.
- GUILIANO, C.; M. ASTHER e A.W. KHAN, 1983. Comparative degradation of cellulose and sugar formation by three newly isolated mesophilic anaerobes and *Clostridium thermocellum*. *Biotechnol. Lett.*, 5:395-398.
- GUPTA, J.K.; C.K. SHIRKOT e S. DHAWAN, 1981. Isolation and mutation of cellulolytic fungi. *Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung.*, 28:31-36.
- HAYASHIDA, S. e H. YOSHIOKA, 1980. Production and purification of thermostable cellulases from *Hemicola insolens* YH-8. *Agric. Biol. Chem.*, 44:1721-1728.
- HERR, D., 1979. Secretion of cellulase and β -glucosidase by *Trichoderma viride* ITCC - 1433 in submerged culture on different substrates. *Biotechnol. Bioeng.*, 21:1361-1371.

- JOGLEKAR, A.V. e N.G. KARANTH, 1984. Studies on cellulase production by a mutant - *Penicillium funiculosum* UV-49. *Biotechnol. Bioeng.*, 26(11):1079-1084.
- LACHKE, A.H.; K.B. BASTAWDE, V.K. POWAR e M.C. SRINIVASAN, 1983. Enhanced production of extracellular β -glucosidase by *Penicillium funiculosum* in submerged culture. *Biotechnol. Lett.*, 5:649-652.
- LECLERC, M.; B. BLONDIN; R. RATOMAHENINA; A. ARNAUD e P. GALZY, 1985. Selection and study of mutants of *Dekkera intermedia* and *Candida wickerhamii* derepressed for β -glucosidase production. *FEMS Microbiol. Lett.*, 30:389-392.
- LINARDI, W.R. e E. ROGANA, 1977. Influência do meio de cultura na produção de celulase. *Revista Brasileira de Tecnologia*, 8:223-227.
- MACRIS, B.J., 1984. Production and characterization of cellulase and β -glucosidase from a mutant of *Alternaria alternata*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 47:560-565.
- MADAN, M. e R. BISARIA, 1983. Cellulolytic enzymes from a edible mushroom. *Pleurotus Sajor-Caju*. *Biotechnol. Lett.*, 5:601-604.

- MANDELS, M. e E.T. REESE, 1960. Induction of cellulase in fungi by cellobiose. *J. Bacteriol.*, 79:861-826.
- MANDELS, M. e J. WEBER, 1969. The production of cellulases. In: Gould, R.F. Cellulases and their applications. Advances in chemistry series 95. *American Chemical Society*. Washington, D.C., p.391-414.
- MANDELS, M.; R.E. ANDREOTTI e C. ROCHE, 1976. *Biotechnol. Bioeng. Symp.*, 6:17-34.
- MANDELS, M.; J.E. MEDEIROS, R.E. ANDREOTTI e F.H. BISSETT, 1981. Enzymatic hydrolysis of cellulose: evaluation of cellulase culture filtrates under use conditions. *Biotechnol. Bioeng.*, 23:2009-2026.
- MEHTA, A. e P. MEHTA, 1985. Production of pectolytic and cellulolytic enzymes by *Fusarium oxysporum* and *F. moniliforme* under different cultivation conditions. *Folia Microbiol.*, 30:42-50.
- MENEZES, T.J.B.; P.R. DE LAMO; T. ARAKAKI, 1976. Isolamento e seleção de microrganismos produtores de celulase. *Col. Ital.*, 7:83-90.
- MENEZES, T.J.B.; T. ARAKAKI e P.R. DE LAMO, 1976. Produção do complexo celulolítico C₁ - C_x por microrganismos. *Col. Ital.*, 7:91-96.

- MENEZES, T.J.B., 1978. Caracterização bioquímica de uma celulase fúngica e sua influência no rendimento de álcool da mandioca. *Col. Ital*, 9:175-200.
- MENEZES, T.J.B. e I.S. DRAETTA. Influência das condições experimentais na produção de celulase. *Col. Ital*, 10:153-168.
- MENEZES, T.J.B. e S.H. HIOSHII, 1982. Efeito do tratamento do bagaço de cana na extensão da hidrólise da celulose. *Col. Ital*, 12:123-135.
- MENEZES, T.J.B.; C.L.M. DOS SANTOS e A. AZZINI, 1983. Saccharification of bamboo carbohydrates for the production of ethanol. *Biotechnol. Bioeng.*, 25:1071-1082.
- MES-HARTREE, M.; C. HOGAN; R.D. HAYES e J.N. SADDLER, 1983. Enzymatic hydrolysis of agricultural residues by *Trichoderma* cellulases and the fermentation of the liberated sugars to ethanol. *Biotechnol. Lett.*, 5:101-106.
- MILLER, G.L., 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.*, 31:426-428.

MOLONEY, A.P.; T.J. HACKETT, P.J. CONSIDINE e M.P. COUGHLAN, 1983. Isolation of mutants of *Talaromyces emersonii* CBS 814.70 with enhanced cellulase activity. *Enzyme Microb. Technol.*, 5:260-264.

MOUNTFORT, D.O. e R.A. ASHER, 1985. Production and regulation of cellulase by two strains of the rumen anaerobic fungus *Neocallimastix frontalis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 49:1314-1322.

NAKATANI, M.S.; G.T. ZANCAN, A.J. NASCIMENTO e K.H. NASCIMENTO, 1981. Extracellular CM-cellulase of *Dactylium dendroides* (*Polyporus circinatus*). *Arq. Biol. Technol.*, 24:277-289.

NATARAJAN, K. e K. KANNAN, 1982. Cellulase production by *Amanita muscaria*. *Corrent Science*, 51:559-561.

NG, T.K. e J.G. ZEIKUS, 1981. Comparison of extracellular cellulase activities of *Clostridium thermocellum* LQR1 and *Trichoderma reesei* QM9414. *Appl. Environ. Microbiol.*, 42:231-240.

NISIZAWA, T.; H. SUZUKI e K. NISIZAWA, 1971. "De novo" synthesis of cellulase induced by sophorose in *Trichoderma viride* cells. *J. Biochem.*, 70:387-393.

OKUNEV, O.N.; I.D. SVISTOVA; N.A. ZHEREBTSOV e E.L.

GOLOVLEV, 1983. Induction of endo - 1,4 - β - D-glucanase
exo - 1,4 - β - D - glucosidase and cellobiase in
Aspergillus terreus. *Mikrobiologiya*, 52:202-208.

OLIVEIRA, A.S. e R.S.F. DA SILVA, 1983. Prê-tratamento da
mandioca com celulase: Produtividade e Índice econômico
comparativo. *Semina*, 4:433-438.

PEITERSEN, N., 1975. Production of cellulase and protein
from barley straw by *Trichoderma viride*. *Biotechnol.*
Bioeng., 17:361-374.

PYE, R.; A. FICCHTER e E. GALAS, 1977. The production of
cellulolytic enzymes by fungal cultures. *Eur. J. Appl.*
Microbiol., 4:151-158.

RAO, M.; R. SEETA e V. DESHPANDE, 1983. Effect of
pretreatment on the hydrolysis of cellulose by *Penicillium*
funiculosum cellulase and recovery of enzyme. *Biotechnol.*
Bioeng., 25:1863-1871.

SADANA, J.C.; J.G. SHEWALE e M.V. DESHPANDE, 1979. Enhanced
cellulase production by a mutant of *Sclerotium rolfsii*.
Appl. Environ. Microbiol., 38:730-733.

SADDLER, J.N. e A.W. KHAN, 1980. Cellulase production by *Acetivibrio cellulolyticus*. *Can J. Microbiol.*, 26:760-765.

SADDLER, J.N., 1982. Screening of highly cellulolytic fungi and the action of their cellulase systems. *Enzyme Microb. Technol.*, 4:414-418.

SHEWALE, J.G. e J.C. SADANA, 1978. Cellulase and β -glucosidase production by a basidiomycete species. *Can. J. Microbiol.*, 24:1204-1215.

SHEWALE, J.G. e J.C. SADANA, 1979. Enzymatic hydrolysis of cellulosic materials by *Sclerotium rolfsii* culture filtrate for sugar production. *Can J. Microbiol.*, 25:773-783.

SILMAN, R.W.; J.E. MCGHEE e R.J. BOTHAST, 1984. CMCase production by *Spicellum roseum* in liquid and solid culture. *Biotechnol. Lett.*, 6:115-118.

SMITH, M.K. e M.H. GOLD, 1979. *Phanerochaete chrysosporium* β -glucosidases: Induction, cellular localization and physical characterization. *Appl. Environ. Microbiol.*, 37:938-942.

- SONI, G.L. e I.S. BHATIA, 1979. Studies on the extracellular cellulase (C_x) from *Fusarium oxysporum*. *Indian J. Biochem. Biophys.*, 16:223-226.
- STENBERG, D.; P. VIJAYAKUMAR e E.T. REESE, 1977. β -glucosidase: Microbial production and effect on enzymatic hydrolysis of cellulose. *Can. J. Microbiol.*, 33:130-147.
- STEWART, J.C.; A. LESTER; B. MILBURN e J.B. PARRY, 1983. Xylanase and cellulase production by *Aspergillus fumigatus* fresenius. *Biotechnol. Lett.*, 5:543-548.
- STUTZENBERGER, F.J., 1971. Cellulase production by *Termomonospora curvata* isolated from municipal solid waste compost. *Appl. Microbiol.*, 22(2):147-152.
- TANGNU, S.K.; H.W. BLANCH e C.R. WILKE, 1981. Enhanced production of cellulase, hemicellulase and β -glucosidase by *Trichoderma reesei* (Rut C-30). *Biotechnol. Bioeng.*, 23:1837-1849.
- TRIVEDI, L.S. e K.K. RAO, 1979. Production of cellulolytic enzymes by *Aspergillus fumigatus*. *Indian J. Exp. Biol.*, 17:671-674.

- TRIVEDI, L.S. e K.K. RAO, 1981. Production of cellulolytic enzymes by *Fusarium* species. *Biotechnol. Lett.*, 3:281-284.
- WARZYWODA, M.; V. FERRE e J. POURQUIE, 1983. Development of a culture medium for large - scale production of cellulolytic enzymes by *Trichoderma reesei*. *Biotechnol. Bioeng.*, 25:3005-3010.
- WASE, D.A.J. e A.K. VAID, 1983. Isolation and mutation of a highly cellulolytic strain of *Aspergillus fumigatus*. *Process Biochem.*, 18:35-37.