

EFEITO DA GLUCOSE-OXIDASE SOBRE A PRODUÇÃO DE CELULASE*

MARIA CÉLIA DE OLIVEIRA HAULY**
 ANTONIO SÉRGIO DE OLIVEIRA***
 RUI SÉRGIO DOS SANTOS FERREIRA DA SILVA****
 ROSANGELA CAMINOTTO*****

RESUMO

A produção de celulase, especificamente a de origem fúngica, é de grande interesse econômico uma vez que ela representa uma alternativa viável para obtenção de alimentos e energia. Bons resultados têm sido conseguidos utilizando-se mutantes do *Trichoderma reesei*, meios enriquecidos, controle de pH e elevando-se os níveis de celulose no meio de cultivo. A biossíntese da celulase, apesar de intensamente estudada, ainda é limitada pelo efeito de repressão catabólica.

Visando-se a diminuir o efeito inibitório da glucose sobre a celulase, cultivou-se o microorganismo *Trichoderma reesei* QM-9414 em presença de 72.000 unidades (4g) de glucose-oxidase por litro de cultura. Determinações de atividade enzimática, proteína, atividade específica e celulose residual foram feitas em todas as preparações obtidas de fermentações em presença e ausência de glucose-oxidase. Análise de variância (teste F) aplicado aos dados obtidos para atividade enzimática e específica, mostrou que não há diferença significativa, ao nível de 5% de probabilidade, nas duas diferentes condições de fermentação. Propõe-se adicionar, em estudos posteriores, outras enzimas, entre elas a glucose-isomerase com a finalidade de converter a glucose, liberada durante a hidrólise da celulose, em frutose para diminuir o efeito inibitório sobre a celulase.

1 - INTRODUÇÃO

Em conseqüência da crise energética das fontes não renováveis, há um crescente interesse na bioconversão de biomassa para obtenção de produtos químicos e combustíveis líquidos. A celulose é o produto natural renovável mais abundante e sua hidrólise ácida ou enzimática até glucose é um processo adequado para tornar mais eficiente sua utilização. Tem-se demonstrado a viabilidade técnica da hidrólise enzimática da celulose⁽¹⁰⁾, porém são necessários novos progressos para torná-la economicamente viável. A produção de celulose é o fator crítico na composição do custo do processo⁽²⁾, por isso é indispensável aumentar o rendimento e a produtividade da enzima pela seleção ou mutação de microorganismos celulolíticos ou melhorando as condições de fermentação⁽⁷⁾.

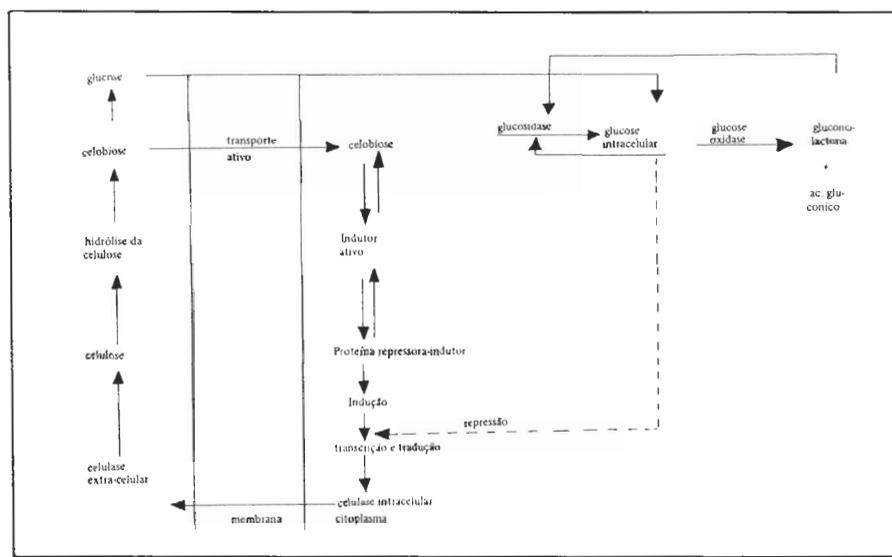
A biossíntese da celulase é controlada por mecanismo de indução e repressão catabólica. Entre os indutores da síntese de celulase encontram-se: celulose, derivados da celulose, celobio-

se em baixa concentração e lactose. Glucose e outros açúcares prontamente metabolizáveis presentes no meio de cultura acarretam repressão catabólica. FLICKINGER⁽¹⁾ propôs um modelo regulador da biossíntese da celulase em fungos, o qual pode ser visto no esquema abaixo:

Entre as várias alternativas sugeridas para controle, o mecanismo regulador inclui:

1. A importância da β - 1,4 glucosidase no controle dos níveis de glucose e celobiose dentro da célula.

2. A presença de baixo nível de síntese de celulase constitutiva para forne-



* Pesquisa Financiada pela Coordenadoria de Pesquisa e Pós-Graduação da UEL; parte deste trabalho foi apresentado no V Simpósio Nacional de Fermentação, Viçosa, MG, julho de 1982.

** Mestre em Ciências de Alimentos, Professora do Departamento de Química da UEL.

*** Professor Assistente do Departamento de Química da UEL.

**** Doutor em Ciências de Alimentos, Professor do Departamento de Tecnologia de Alimentos e Medicamentos da UEL.

***** Estagiária do Departamento de Química, UEL.

cer o indutor inicial (celobiose) para a contínua produção de celulase quando a celulose é a fonte de carbono.

3. Controle dos níveis de celobiose intracelular por membrana ou glucosidase intracelular e ou glucose ou gluco-lactona.

No intuito de diminuir o efeito de repressão catabólica causada pela glucose, liberada durante a hidrólise da celulose, propõe-se, neste trabalho, a adição de glucose-oxidase para manter baixo o nível deste açúcar facilmente metabolizável.

2 – MATERIAIS E MÉTODOS

MICROORGANISMO. O fungo utilizado neste estudo foi *Trichoderma reesei* QM-9414. Os cultivos foram estocados em tubos contendo ágar – batata – dextrose, mantidos à temperatura ambiente (25 – 28°C) e as transferências efetuadas a cada quinze dias.

CULTIVO DO FUNGO. O meio utilizado para o crescimento do fungo e produção da enzima foi o descrito por MANDELS & STERNBERG⁽¹⁰⁾ modificado por HAULY et alii⁽⁴⁾. A composição do meio base, por litro de água destilada, era de: KH₂ PO₄ 5,5g; (NH₄)₂SO₄ 1,4g; Uréia 0,3g; Mg SO₄ 7.H₂O 0,3g; Ca Cl₂ 0,6 g; Proteose – peptona 1,0g; Avicel 10,0g; Tween 80 2,0g; FeSO₄ 7H₂O 0,005g; Mn SO₄.H₂O 0,00156g; ZnSO₄ 7H₂O 0,0014g; CoCl₂ 0,002g. O pH do meio foi ajustado para 5,5 com NaOH 1 N ou HCl 0,1N antes da autoclavagem.

A glucose – oxidase (18.000 U/g de sólido) obtida de *Aspergillus niger*, sigma, foi adicionada depois da autoclavagem e antes da pré-fermentação, na concentração de 4 g/l ou 72.000 U por litro de meio base. A escolha desta concentração foi baseada em experimentos preliminares, os quais mostraram que não há diferença significativa, teste F⁽³⁾, ao nível de 5% de probabilidade, ao adicionar 4g ou 8g de glucose-oxidase por litro de meio de cultura para fermentação.

FERMENTAÇÃO. O fungo foi cultivado em frascos Erlenmeyers de 250ml contendo 25ml de meio de cultivo, inoculados com 1% (em volume) de inóculo vegetativo. Os frascos foram incubados a 27°C ± 2°C numa mesa (“Shaker”) agitadora rotativa (SUEG, Piracicaba, SP), que operava em ± 228 r.p.m. (min⁻¹). A duração do

processo fermentativo foi de 168 horas.

ANÁLISES. A determinação da atividade enzimática foi feita pelo método do papel de filtro de acordo com MANDELS & STERNBERG⁽¹⁰⁾, em cultivos de 168 horas. A atividade celulolítica foi medida em unidades internacionais U.I. (Umol de açúcares redutores, como glucose produzidos por minuto) com papel de filtro Whatman n. 1 (tiras de 1x6cm, com 50mg), utilizando-se filtrados do caldo de cultivo a pH 4,8 e 50°C, incubados por 1 horas⁽⁸⁾.

Os açúcares redutores (expressos em glucose) foram determinados pelo método do ácido 3,5 dinitro-salicílico⁽¹⁰⁾.

A proteína solúvel do filtrado (preparação enzimática) proveniente do caldo de cultivo foi medida pelo método de LOWRY⁽⁶⁾, após precipitação com ácido tricloroacético a 5%⁽⁹⁾, usando albumina bovina como padrão.

A atividade específica foi obtida pela razão entre a atividade celulolítica e a proteína solúvel da respectiva preparação enzimática.

A quantificação dos carboidratos totais foi feita pelo método do fenol sulfúrico⁽⁵⁾.

A determinação da celulose residual foi realizada no resíduo obtido pela filtração à vácuo, do caldo fermentado, o qual foi lavado com água e extraído por duas vezes com 10ml de H₂SO₄ 67% durante 30 minutos, à temperatura ambiente. A seguir realizou-se dosagem de açúcares totais pelo método do fenol sulfúrico⁽⁵⁾.

TRATAMENTO ESTATÍSTICO. Os resultados obtidos foram testados pelo teste F⁽³⁾, a fim de se obter, com maior segurança, uma indicação da eficácia ou não quanto à adição da enzima glucose-oxidase junto ao meio base.

3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

Através de fermentações realizadas com meio base e fermentações contendo meio base mais a enzima glucose-oxidase conseguimos obter os resultados apresentados nos quadros I e II, respectivamente.

Pode-se observar, através da análise de variância (teste F), para atividade enzimática, quadro III, e para atividade específica, quadro IV, que as diferenças dos resultados obtidos das fermentações não são significativas ao nível de 5% de probabilidade.

O quadro V nos mostra que os resul-

tados obtidos para celulose residual, dos dois tipos de fermentações, são significativos ao nível de 5% de probabilidade. Porém, não justifica a adição de glucose-oxidase ao meio base uma vez que, não melhora significativamente a atividade enzimática e atividade específica. Em parte, isto pode ser explicado pelo fato de que a glucose-oxidase oxida a glucose, produzida pela hidrólise da celulose, fornecendo gluconolactona e ácido glucônico diminuindo a repressão da síntese de celulase pela glucose. Entretanto, a gluconolactona em concentração elevada pode inibir a celobiase, também presente no complexo da celulase. Assim, a celobiose acumulada pode inibir a produção de celulase.

Face aos resultados obtidos conclui-se que o tratamento com glucose-oxidase, na concentração de 4 g/l, em fermentações fúngicas não promove acentuada melhora na produção de celulase.

Será importante estudar o efeito de outras enzimas, tais como, celobiase e glucose-isomerase em separado ou simultaneamente com glucose-oxidase no intuito de melhorar a produção de celulase.

QUADRO I – Resultados obtidos da fermentação sem glucose-oxidase

No. de Experimentos	Açúcares redutores (mg)	Atividade enzimática U.I./ml	Proteínas mg/ml	Atividade específica U.I./mg	Carboidratos totais mg/ml	Celulose residual mg/g
1	1,3525	0,6255	0,694	0,9012	0,510	8,4
2	1,2433	0,5750	0,733	0,7844	0,357	17,9
3	1,3525	0,6255	0,774	0,8081	0,510	8,9
4	1,3525	0,6255	0,522	1,1982	0,357	8,5
5	1,2082	0,5587	0,733	0,7622	0,524	8,7
6	1,2082	0,5587	0,744	0,7218	0,367	8,6
7	1,1403	0,5272	0,506	1,0418	0,483	15,1
8	1,2788	0,5912	0,603	0,9804	0,388	9,5
9	1,3150	0,6080	0,694	0,8760	0,328	7,6
10	1,6387	0,7578	0,694	1,0919	0,275	7,7
11	1,4695	0,6795	0,603	1,1268	0,399	7,7
12	1,1403	0,5272	0,522	1,009	0,292	14,3
13	1,5100	0,6982	0,733	0,9525	0,377	14,1
14	1,6387	0,7577	0,887	0,8542	0,367	13,6
15	1,3150	0,6080	0,774	0,7855	0,410	12,5
16	1,3903	0,6430	0,887	0,7249	0,367	12,5

QUADRO II – Resultados obtidos da fermentação com glucose-oxidase

No. de Experimentos	Açúcares redutores mg	Atividade enzimática U.I./ml	Proteínas mg/ml	Atividade específica U.I./mg	Carboidratos totais mg/ml	Celulose residual mg/g
1	0,9227	0,4265	0,578	0,7379	0,602	8,7
2	1,0436	0,4826	0,448	1,0772	0,524	5,7
3	0,9227	0,4267	0,469	0,9098	0,602	13,5
4	0,9227	0,4267	0,538	0,7931	0,539	11,9
5	0,9227	0,4267	0,570	0,7485	0,562	5,6
6	0,8934	0,4131	0,420	0,9836	0,470	5,4
7	1,0436	0,4826	0,293	1,6470	0,524	6,8
8	1,0124	0,4682	0,538	0,8702	0,585	5,6
9	1,6840	0,7788	0,829	0,9394	0,656	12,6
10	1,8271	0,8450	0,753	1,1221	0,676	12,1
11	1,3903	0,6430	0,343	1,8746	0,718	9,5
12	1,4695	0,6796	0,733	0,9271	0,620	7,8
13	1,4293	0,6610	0,818	0,8080	0,697	13,4
14	1,7780	0,8223	0,912	0,9016	0,697	11,2
15	1,3150	0,6081	0,639	0,9516	0,620	11,2
16	1,2082	0,5587	0,657	0,8503	0,638	13,9

QUADRO III – Análise de variância para a atividade enzimática

Fonte de variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrado médio	F calc.	F Tab.
Tratamento	1	0,0209	0,0209	1,5	4,17(ns)
Resíduo	30	0,4170	0,0139		
Total	31	0,4379			

ns. não significativo ao nível de 5% de probabilidade.

QUADRO IV – Análise de variância para a atividade específica

Fonte de variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrado médio	F calc.	F Tab.
Tratamentos	1	0,0689	0,0689	1,1388	4,7(ns)
Resíduo	30	1,8165	0,0605		
Total	31	1,8854			

ns. não significativo ao nível de 5% de probabilidade.

QUADRO V – Análise de variância para a celulose residual

Fonte de variação	Graus de liberdade	soma dos quadrados	Quadrado médio	F calc.	F Tab.
Tratamentos	1	13,3943	13,3943	16,60	4,17*
Resíduo	30	24,1939	0,8065		
Total	31	37,5882			

*significativo ao nível de 5% de probabilidade.

ABSTRACT

With the object to decrease the glucose inhibitory effect over cellulase, *Trichoderma reesei* QM 9414 was cultivated in the presence of 72,000 units (4g) of glucose-oxidase per liter culture media. Measurements were made for enzyme activity, protein and residual cellulose for all the fermentations in the presence or in the absence of glucose-oxidase. Analysis of variance (F-test) had shown that the enzyme activity and specific activity were not statistically significant at 5% level ($p < 0,05$) under these two different fermentation conditions.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- FLICKINGER, M.C. Current biological research in conversion of cellulosic carbohydrates in to liquid fuels: how far have we come? *Biotechnol. Bioeng.*, New York, 22 (suppl 1): 27-48, 1980.
- GALLO, B.J. et alii Cellulase production by a new mutant strain of *T. reesei* MCG77. *Biotechnol. Bioeng. Symposium*, New York, 8: 88-191, 1978.
- GOMES, F.P. *Curso de estatística experimental*. Piracicaba, Nobel, 1976. 430 p.
- HAULY, M.C.O. et alii Produção de celulase: uma análise pela metodologia da superfície de resposta. Otimização de nutrientes salinos no meio de cultivo. *Rev. Bras. Technol.*, 11: 1-11, 1980.
- HODGE, J.E. & HOFREITER, B.T. Determination of reducing sugars and carbohydrates. In: WHISTLER, R.L. et alii. *Methods in Carbohydrate Chemistry*. New York, Academic Press, 1962.
- LOWRY, O.H. et alii Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, Bethesda, 193: 265-75, 1951.
- MANDELS, M. & ANDREOTTI, R.E. Problems and challenges in the cellulose to cellulase fermentation. *Process. Biochem.* Walford, 13: 6-13, May 1978.
- MANDELS, M. et alii Measurement of saccharifying cellulase. In: GADEN Jr., E.L. et alii *Enzymatic conversion of cellulosic Materials: technology and applications*. New York, J. Wiley, 1976. p. 21-33.
- MANDELS, M. et alii Enzymatic hidrólisis of wast cellulose. *Biotechnol. Bioeng.*, New York, 16: 1471-93, 1974.
- MANDELS, M. & STERNBERG, D. Recent advances in cellulase technology. *J. Ferment. Technol.*, 54: 267-86, 1976.
- WOODWARD, J. & ARNOLD, S.L. The inhibition of β -glucosidase activity in *Trichoderma reesei* C-30 cellulase by derivatives and isomers of glucose. *Biotechnol. Bioeng.*, New York, 23: 1553-62, 1981.