

MARIA SETSUKO NAKATANI

*CELULASE EXTRACELULAR DO FUNGO  
PRODUTOR DE GALACTOSE OXIDASE*

*Tese de Mestrado apresentada ao  
Departamento de Bioquímica da  
Universidade Federal do Paraná*

CURITIBA

1979

Tese orientada pela Professora  
KAZUKO HISHIDA DO NASCIMENTO

Í N D I C E

INTRODUÇÃO .....	04
MATERIAIS E MÉTODOS .....	14
RESULTADOS .....	22
TABELAS E FIGURAS .....	26
DISCUSSÃO .....	46
RESUMO .....	51
AGRADECIMENTOS .....	52
BIBLIOGRAFIA .....	53

## INTRODUÇÃO

Os primeiros estudos que evidenciaram a decomposição da celulose por agentes biológicos foram realizados por MITSCHERLICH em 1850<sup>48</sup>. Ele verificou que a parte celulósica do tecido da batata era destruída sob certas condições laboratoriais definidas e responsabilizou a mudança na estrutura devido à ação de certos vibriões encontrados nos "substratos" das batatas.

POPOFF em 1875<sup>58</sup> foi o primeiro a associar a formação do metano com a fermentação da celulose. Suas experiências revelaram a temperatura ótima para a reação, o efeito dos antissépticos bem como alguns conhecimentos dos produtos da decomposição gasosa.

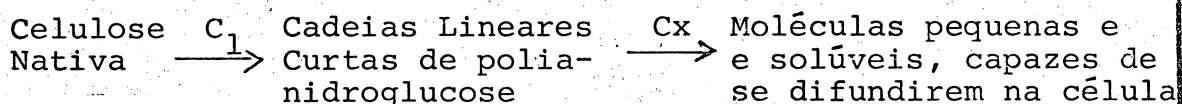
Desde os estudos de HARTIG em 1878<sup>32</sup>, grande importância tem sido dada a degradação da celulose pelos pequenos grupos de basidiomicetos chamados Agaricales e pelos numerosos grupos dos ascomicetos tais como a Daldinia e Xilaria.

A mais simples definição de celulase pode ser expressa como um sistema de enzimas, o qual é capaz de hidrolizar polímeros de celulose altamente cristalina em açúcares suficientemente pequenos que possam penetrar através das paredes celulares de microorganismos. Tal definição é, contudo, não aplicável a muitas enzimas específicas que só hidrolizam a celulose parcialmente degradada ou derivados solúveis, pelos componentes enzimáticos isolados dos meios de cultivo. Mas estes componentes não podem ser considerados como um "sistema de celulase" por não serem capazes de degradar a celulose altamente ordenada mesmo na ausência de lignina<sup>25</sup>.

SAUNDERS et al<sup>63</sup> em 1948, descreveram um método

de preparação de enzimas do fungo Myrothecium verrucaria. A enzima possuía uma temperatura ótima de 40°C e pH ótimo de 5,5 quando o substrato era o algodão. Era inativada rapidamente a temperatura acima de 50°C e em pH com valores fora da faixa de 5,0 a 9,0. O principal produto da hidrólise da celulose pelas enzimas deste fungo era a glucose.

O modo de ação do sistema celulolítico sobre a celulose nativa tem sido objeto de estudo de um grande número de pesquisadores começando com a hipótese original sugerida por REESE et al<sup>60</sup> em 1950. Eles verificaram que a habilidade dos microorganismos em utilizar a celulose nativa como substrato era muito relativa e postularam que a celulase que presumivelmente convertia a celulose nativa em açúcares, consistia em pelo menos dois sistemas:



Organismos não celulolíticos

Organismos celulolíticos

A maioria dos trabalhos publicados tem sido baseado na sequência bioquímica da hidrólise da celulose pelas enzimas extracelulares produzidas pelo Trichoderma viride.

Estudando o sistema celulásico do Trichoderma viride, LI et al<sup>45</sup> em 1965 verificaram que este sistema era um sistema celulásico verdadeiro, que era capaz de converter derivados cristalinos e amorfos da celulose em glucose. Os dados obtidos por eles estabeleciam que o sistema era multienzimático com tres enzimas vitais e distintas física e enzimaticamente. Os tres componentes exerciam papel essencial no processo de conversão da celulose em glucose.

IWASAKI et al <sup>37</sup> em 1965 isolaram dois tipos diferentes de celulases de uma cultura de Trichoderma koningii, os quais eram proteínas homogêneas pelos critérios eletroforéticos e por ultracentrifugação. A celulase I possuía atividade sobre a celobiose mas era quase inativa sobre a celulose fibrosa. Por outro lado a celulase II tinha ação sobre as ligações glucosídicas da celulose fibrosa. Ambas as enzimas parecem atuar cooperativamente sobre a celulose fibrosa e glicol celulose (derivado de celulose solúvel em água).

Os filtrados de cultura do Trichoderma koningii, estudado por HALLIWELL em 1965<sup>29</sup> atuavam em todos os tipos de celulose; desde a celulose tratada com ácido fosfórico até a celulose das fibras do algodão.

WOOD em 1965<sup>78</sup> trabalhando com o Fusarium solani conseguiu isolar um componente  $C_1$  que diferia do componente  $C_1$  do Trichoderma viride mas que se assemelhava ao componente  $C_1$  do Trichoderma koningii por conter pequenas quantidades de atividade Cx. Contudo, as propriedades dessas atividades Cx eram diferentes para cada um deles. A atividade Cx associada ao componente  $C_1$  do Fusarium solani, poderia ser diminuída pelo tratamento térmico enquanto que a atividade Cx do Trichoderma koningii não podia. A estabilidade térmica deste último era exatamente o mesmo que o do componente  $C_1$  e isso sugeria que a atividade Cx poderia ser uma parte integral da enzima  $C_1$ . WOOD verificou também que tanto os componentes  $C_1$  do F. solani e do T. koningii tinham o mesmo volume de eluição em Sephadex G-100 e portanto provavelmente possuíam a mesma forma e tamanho.

SELBY e MAITLAND em 1967<sup>64</sup> separaram os componentes do sistema celulásico do Trichoderma viride. O componente C<sub>1</sub> quando sozinho não possuía ação sobre a celobiose, CM-celulose ou algodão, porém em recombinação com a celobiose e carboximetilcelulase readquiria a atividade do filtrado original.

WOOD em 1968<sup>77</sup> verificou que o sistema celulásico elaborado pelo Trichoderma koningii diferia do sistema elaborado pelo Trichoderma viride, examinado por SELBY e MAITLAND<sup>64</sup>. WOOD não conseguiu isolar o componente C<sub>1</sub> livre de traços de atividade de CM-celulase. Apesar de conter traços de CM-celulase, o componente C<sub>1</sub> tinha pouca ação sobre o algodão nativo, mas quando este era associado com o componente Cx, em suas proporções originais, cerca de 77% da atividade original sobre a celulose cristalina era recuperada.

Trabalhando com um produto comercial do Trichoderma viride, a meicelase, OKADA et al em 1968<sup>54</sup> obtiveram tres componentes celulásicos como LI et al<sup>45,64,77</sup>. As tres celulases hidrolisavam uma série de substratos incluindo diversos celooligossacarídeos, CMC e várias celulosas insolúveis tais como o avicel e o algodão absorvente, porém não apresentava atividade sobre a celobiose e aril-β-glucosídeo.

Em 1968 ROSNESS<sup>61</sup>, estudando a celulase do Dicystostelium discoideum durante a morfogênese, sugeriu que as celulases deste microorganismo eram produzidas em uma forma inativa e que eram ativadas posteriormente no estágio de desenvolvimento do corpo de frutificação. A celulase do corpo de frutificação degradava a celulose hidratada em glucose em pH baixos (pH 4,5) enquanto que em pH alto (pH 7,0) o maior produto de degradação era a celobiose e celotriose. Através destes dados ROSNESS sugeriu que o extrato celulolítico continha pelo menos uma endo-celulase ou talvez várias, em adição com a β-glucosidase.

ERIKSSON e RZEDOWSKI<sup>19</sup> em 1969 verificaram que as propriedades eletroforéticas da celulase são grandemente influenciadas pelas condições de cultivo. Observaram que o exemplo mais delicado é a mudança no ponto isoelétrico da celulase do Chrysosporium lignorum durante a cultura do organismo.

ERIKSSON e RZEDOWSKI<sup>20</sup> obtiveram tres picos de celulase do meio de cultura do Chrysosporium lignorum com fortes indícios da presença do componente C<sub>1</sub>.

Estudando os componentes celulásicos do Trichoderma koningii, HALLIWELL e RIAZ<sup>30</sup> em 1970 separaram em DEAE Sephadex dois componentes com atividade de CM - celulase e um componente C<sub>1</sub>. O componente C<sub>1</sub> agia muito fracamente e somente em fibras de algodão, formando produtos solúveis porém sem formação de fibras curtas. A habilidade em formar fibras curtas parecia estar confinado quase que totalmente a um dos componentes de CM-celulase o qual degradava totalmente o algodão, no mínimo a produtos solúveis e extensivamente a fibras curtas. Os dois componentes de CM-celulase solubilizavam a celulose sinergisticamente enquanto que o componente C<sub>1</sub> era inibidora (C<sub>1</sub> do Reese).

SAMPATHNARAJANAN e SHANMUGASUDARAM<sup>62</sup> em 1970, estudando a inibição e a ativação da celulase do Fusarium vasinfectum ATK observou que esta enzima se assemelhava a da Myrothecium verrucaria, a qual era suscetível aos inibidores do grupo tiol, e a do Aspergillus oryzae, a qual é inibida pelos metais quelantes. Observaram ainda que o pré-tratamento do filtrado de cultura do F.vasinfectum com os metais quelantes eliminava a infecção em relação aos brotos do algodão.

Na purificação dos componentes celulásicos do Trichoderma koningii, WOOD e McCRAE<sup>80</sup> em 1972, isolaram uma

celulase que tinha pouca habilidade em atacar o CMC ou formas altamente ordenadas de celulose, porém degradava rapidamente a celulose tratada com ácido fosfórico. A celobiose era o principal produto da hidrólise (97%). As fibras de algodão desengordurado eram degradados até um limite de 15% quando expostas a altas concentrações da enzima por um período prolongado:- a celobiose era novamente o principal açúcar presente no sobrenadante (96%). Celotetraose e celohexaose eram quase que exclusivamente hidrolisados a celobiose. Evidências indicaram que a enzima era provavelmente uma  $\beta$ -1,4-glucano celobiosilhidrolase.

Os referidos autores sugerem que a enzima  $C_1$  não pode ser considerada como a iniciadora do ataque a substratos celulósicos altamente ordenados, pois isto parece ser mais uma característica da enzima Cx do que do  $C_1$ . Verificaram ainda que ambas as enzimas em associação com a  $\beta$ -glucosidase devem estar presentes na solução para a manifestação máxima e total da atividade celulásica.

HORTON e KEEN em 1966<sup>34</sup> verificaram que a glucose numa concentração de  $5 \times 10^{-4}$  M era suficiente para reprimir a síntese da celulase do Pyrenochaeta terrestris.

A Comissão de Enzimas<sup>17</sup> define "celulase" como nome trivial para a enzima que possui o nome sistemático de  $\beta$ -1,4-glucano 4-glucanohidrolase E.C.3.2.1.4. Portanto é de consenso atual que a atividade dos diferentes componentes é expresso como<sup>25</sup>:  $C_1$  — atividade exo- $\beta$ -1,4- glucanase, Cx — atividade endo  $\beta$ -1,4- glucanase e  $\beta$ -glucosidase {E.C.3.2.1.21}.

BERGHEM e PETTERSSON<sup>8</sup> em 1973 verificaram que a celulase do Trichoderma viride produzida comercialmente apresentava o componente  $C_1$  semelhante ao componente  $C_1$  do Trichoderma koningii e ao do Chrysosporium lignorum. O componente  $C_1$  era provavelmente uma glicoproteína com peso molecular de 46000, contendo 3,3% de carboidrato e ponto isoelétrico em torno de pH 3,79 semelhante ao encontrado

por WOOD e McCRAE <sup>80</sup> para o Trichoderma koningii.

IKEDA et al <sup>38</sup> em 1973 observaram que a enzima comercial do Aspergillus niger possuíam atividade máxima em pHs ácidos: 2,3 a 2,5 e referiram a eles como células ácidas.

Estudando o sistema enzimático do fungo Sporotrichium pulverulentum na degradação da celulose, ERIKSSON e PETERSSON <sup>21</sup> em 1975 conseguiram obter cinco endo  $\beta$ -1,4-glucanases, no qual a relação da atividade entre as cinco endoglucanases no meio de cultura era de 4:1:1:1:1. Seus pesos moleculares variavam entre 28300 a 37500 e a quantidade de carboidratos era entre 0 a 10,5%.

HALLIWELL <sup>30</sup> em 1975, verificou que o sistema multienzimático do Trichoderma koningii e Myrothecium verrucaria consistia de duas celulases (exo e endoglucanases) e duas dextrinases (CM-celulase e celobiase) os quais em conjunto sacarificavam a celulose nativa.

NAKAYAMA et al <sup>49</sup>, em 1976, estudando as celulases do Trichoderma viride observaram que a ocorrência da multiplicidade dos componentes celulásicos "in vivo", poderia ser o resultado de modificações secundárias, provavelmente pela ação de enzimas proteolíticas e que tais modificações secundárias poderiam estar acompanhados por pequenas mudanças em relação a especificidade dos componentes celulásicos pelos substratos.

BERGHEM et al <sup>11</sup> isolaram duas  $\beta$ -1,4-glucano glucanohidrolase de alto e baixo peso molecular, de uma preparação comercial da enzima celulase do Trichoderma viride. Os pesos moleculares encontrados foram de 12500 e 50000  $\pm$  20000 respectivamente. A enzima de baixo peso molecular continha 21% de carboidrato enquanto que o de alto peso

molecular possuía 12% de carboidrato. Contudo, HÅKANSSON et al <sup>27</sup> isolaram uma endoglucanase do Trichoderma viride com peso molecular em torno de 20000. A enzima pura não continha carboidrato e o seu ponto isoelétrico foi determinado como sendo em torno de pH 7,52. Este valor era de 2 a 3 unidades de pH acima dos outros valores encontrados para as enzimas celulolíticas do Trichoderma viride.

Recentemente KANDA et al <sup>40</sup> isolaram uma celulase do Irpex lacteus com alta atividade sobre o avicel (celulose cristalina). Esta endo-celulase possuía um peso molecular em torno de 56000 e 12,2% de carboidrato. Mais tarde em 1978 <sup>42</sup> isolaram e purificaram uma celulase do tipo exo de preparação comercial do Irpex lacteus, chamada drieselase, cujo peso molecular era em torno de 65000 e continha 2,35% de glucose como carboidrato.

OLUTIOLA <sup>55</sup> em 1976, estudando o complexo enzimático do Penicillium citrinum, observou a presença de onze componentes enzimáticos, dos quais quatro eram de alto peso molecular e sete de baixo peso molecular. Um dos componentes possuía as características do componente C<sub>1</sub>.

Comparando tres diferentes celulases comerciais e uma celulase obtida em laboratório, GUM e BROWN <sup>26</sup> observaram que as quatro celulases eram diferentes quanto a fração glicosídica porém com a mesma cadeia polipeptídica com papéis idênticas na degradação da celulose. Com base nestes estudos verificaram que o conteúdo de carboidrato, era o principal fator que diferenciava as celobiohidrolases.

ERIKSSEN e GOKSØYR <sup>22</sup> em 1977 estudaram as celulases do Chaetomium thermophile var. dissitum e mostraram que este fungo possuía um sistema celulásico completo que consistia de dois componentes celulásicos e um componente

de  $\beta$ -glucosidase (celobiase). Observaram que a carboximetilcelulose tinha um efeito estabilizante sobre a enzima pois na ausência do substrato a enzima começava a se inativar em temperatura acima de 50°C. Estes resultados levaram os autores a concluir que o sistema celulolítico do Chaetomium termophile var. dissitum não era marcadamente um fungo termofílico comparado com os fungos mesofílicos.

WOOD e McCRAE<sup>81</sup> demonstraram que as quatro  $\beta$ -1,4-endoglucanases do Trichoderma koningii tinham grande especificidade, mas que eram enzimas distintas com diferentes modos de ação. Os quatro componentes conseguem hidrolisar com relativa facilidade a celulose tratada com ácido fosfórico, CM-celulose, celotetraose e celopentaose, porém nenhuma das endoglucanases conseguiu hidrolisar a celulose do algodão quando agiam isoladamente.

As endoglucanases II, III e IV do Trichoderma viride estudadas por SHOEMAKER e BROWN<sup>66</sup> eram altamente ativas em degradar a carboximetilcelulose e a celulose tratada com ácido fosfórico. A endoglucanase III possuía pouca atividade sobre a celobiose mas reagia rapidamente com a celotriose. As endoglucanases II e IV mostravam preferência por ligações glicosídicas internas dos celooligosacarídeos. O produto solúvel da ação inicial das endoglucanases II e IV sobre a celulose inchada eram glucose, celobiose e celotriose, os quais eram gradualmente convertidos em glucose e celobiose.

Durante a germinação dos esporos do Dictyostelium discoideum JONES et al<sup>39</sup> em 1979 verificaram que a liberação da celulase no meio extracelular era um processo seletivo que requeria calor, e que ocorria durante o estágio entumescimento da germinação. Observaram também que a celu-

lase consistia de duas enzimas cujos pesos moleculares encontrados foram em torno de 136000 e 69000. Ambas tinham respostas semelhantes a inibidores tais como os ions mercúrios e estas observações indicavam que possuíam sitios ativos similares. Com os dados obtidos em relação aos inibidores e os valores dos pesos moleculares concluíram que as enzimas provavelmente eram formas monoméricas e diméricas.

As celulasas são produzidas comercialmente no Japão em grande escala. A maior parte da produção é utilizada na indústria farmacêutica. Outros usos estão relacionados a remoção ou amolecimento de celulosas em preparações alimentares e nas celulosas que interferem com os processos de extração.

POWER e COCKING<sup>59</sup> foram os pioneiros na utilização de celulasas na preparação de protoplastos de plantas. Seus primeiros processos utilizavam somente a celulase de Myrothecium verrucaria, porém em trabalhos recentes usaram uma combinação de celulase e pectinase. Eles estabeleceram as condições para a fusão reproduzível de protoplastos de diferentes espécies e assim abriram um possível caminho para a produção de híbridos de plantas que não podem ser cruzados sexualmente.

O fungo produtor de galactose oxidase<sup>5</sup> apresenta uma grande versatilidade bioquímica, sendo capaz de secretar ao meio enzimas hidrolíticas<sup>24,50</sup> desde que no meio de cultura se acrescente oligo e polissacarídeos.

Devido a grande importância industrial das celulasas<sup>23,76</sup> se procurou induzir a produção de um sistema celulolítico capaz de catalisar a despolimerização da celulose. O presente trabalho estuda o sistema celulolítico secretado ao meio de cultura quando o fungo é crescido em diferentes formas de celulose.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### 1. Microorganismo.

O microorganismo utilizado foi o fungo produtor de galactose oxidase gentilmente cedido pela Dra. Déa Amaral. O fungo foi inicialmente classificado como Polyporus circinatus Fr.<sup>7</sup> e posteriormente como Dactylium dendroides<sup>52</sup> mas sua classificação exata continua em discussão<sup>43</sup>.

### 2. Meios, condições de manutenção e cultivo.

O fungo foi mantido em ágar Sabouraud-glucose. Após crescimento em estufa a 28°C por 72 horas as amostras foram estocadas em geladeira a 4°C. As amostras foram repiçadas trimestralmente.

O cultivo em meio líquido foi feito no meio descrito por MARKUS<sup>47</sup> et al com a seguinte composição (g/l):  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  - 9;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  - 8;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  - 2;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  - 0,2;  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  - 0,1;  $\text{MnSO}_4$  e  $\text{H}_2\text{O}$  - 0,002;  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  - 0,0025; extrato de levedura - 1 e fontes de carbono - 2, ajustando - se o pH do meio para 5,8.

Inicialmente o fungo foi semeado neste meio mineral, contendo -D-glucose 0,2%. Após 48 horas de crescimento a 28°C em agitador rotatório, (New Brunswick a 100 r.p.m.), uma certa quantidade de micélio foi transferida para frascos de 2000 ml contendo 500 ml do meio líquido enriquecido com pó de celulose a 0,2%.

### 3. Crescimento do fungo.

Para a determinação do micélio seco, nos diversos tempos de crescimento, foram utilizados papéis de filtro com pesos conhecidos e mantidos em estufa a 60°C até peso constante. O micélio coletado no papel de filtro foi filtrado e lavado com água destilada em funil de Büchner, a vácuo. Os papéis de filtro foram colocados novamente na estufa a 60°C até peso constante.

O peso do micélio foi calculado por diferença.

### 4. Obtenção da enzima.

Após o crescimento do fungo no meio líquido de MARKUS <sup>47</sup> contendo 0,2% de celulose (CAMAG) por 11 dias, o meio de cultivo foi filtrado em gaze dupla e logo em seguida foram distribuídos em balões apropriados para serem liofilizados (Cryolizer Freeze Drying Apparatus - New Brunswick Scientific - N.J. - U.S.A.).

#### a) Cromatografia em Sephadex G-100.

O material liofilizado foi suspenso em uma quantidade de água destilada e colocada em uma coluna de Sephadex G-100 (37,5 cm x 2,7 cm) equilibrada, com tampão acetato 5 mM pH 5,4. O material foi eluído com o mesmo tampão. Foram coletados frações de 5,0 ml em um coletor (Ultrorac Fraction Collector L.K.B. 7000).

As frações foram testadas para atividades de  $\beta$ -glucosidase e CM-celulase. As frações que apresentavam atividades máximas foram reunidas numa fração e concentradas a vácuo a temperatura ambiente.

b) Cromatografia por afinidade em celulose.

A fração que apresentava atividade de CM-celulase foi colocada em uma coluna de celulose (Whatmann CF<sub>1</sub>) equilibrada com tampão fosfato 20 mM pH 6,5<sup>31</sup> e eluída com o mesmo tampão. Foram coletadas frações de 5,0 ml. A obtenção da enzima foi feita a temperatura ambiente.

5. Avaliação da atividade enzimática.

a)  $\beta$ -glucosidase:- o sistema de reação continha: 1,0  $\mu$ mol de celobiose, 50  $\mu$ moles de tampão acetato pH 5,4 e quantidades variáveis de proteína para volume final de 1,0 ml. O açúcar liberado foi determinado pelo método da glucose-oxidase<sup>14</sup>. O padrão utilizado foi a D-glucose. Incubação por 30 minutos a 40°C.

b) CM-celulase:- o sistema de reação continha: 1,25 mg de carboximetilcelulose, 50  $\mu$ moles de tampão acetato pH 5,4 e quantidades variáveis de proteína para um volume final de 1,0 ml. O sistema foi incubado a 40°C por 30 minutos. A liberação dos açúcares redutores foi determinado pelo método de SOMOGYI-NELSON<sup>51,69</sup>. O padrão utilizado foi a D-glucose.

c) Xilanase:- Foi utilizado o mesmo sistema para a CM-celulase, substituindo-se o CMC pelo xilano. No controle o substrato foi adicionado após a inativação da enzima.

Em ambos os casos uma unidade foi definida como a quantidade de enzima que libera um nmol de produto por minuto, nas condições do ensaio. A atividade específica foi expressa como unidade de enzima por mg de proteína.

6. Dosagem de proteína.

A dosagem de proteína das frações obtidas das

colunas de Sephadex G-100 e celulose foi realizada pelo método de LOWRY et al <sup>46</sup> tendo como padrão a albumina bovina.

Na eletrofocalização a proteína foi determinado pelo método de WARBURG e CHRISTIAN <sup>73</sup>, medindo-se a absorvância ultravioleta em 260 nm e 280 nm em espectrofotometro Beckmann DU-2.

#### 7. Cromatografia do produto da hidrólise.

A ação  $\beta$ -glucosidásica e CM-celulásica sobre a carboximetilcelulose foi analisada em pH 5,4 a 40°C durante 6 horas.

O sistema de incubação continha: 1,25 mg de carboximetilcelulose, 50  $\mu$ moles de tampão acetato, 5,0  $\mu$ g de proteína ( $\beta$ -glucosidase), 5,8  $\mu$ g de proteína (CM-celulase) para volume final de 1,0 ml.

As amostras foram retiradas de hora em hora. Após a incubação a reação foi interrompida em banho fervente por 5 minutos. A mistura foi deionizada em uma coluna de Amberlite MB-3 e eluída com água bidestilada. Em seguida o eluato foi concentrado a vácuo e o resíduo foi redissolvido em 0,2 ml de água bidestilada.

A cromatografia foi feita em papel Whatmann nº 1 a temperatura ambiente pela técnica descendente utilizando-se o solvente n-butanol, piridina e água (6:4:3 v/v) durante 24 horas. Os açúcares foram detectadas pelo nitrato de prata alcalino <sup>70</sup>.

#### 8. Focalização isoelétrica.

Os pontos isoelétricos das frações enzimáticas

foram determinadas pelo método de focalização isoelétrica em aparelho LKB (Suécia) conforme método descrito por VESTBERG<sup>72</sup>.

A eletrofocalização foi realizada em gradiente de sacarose na faixa de pH 3,5 - 11,0 usando-se coluna de 110 ml de capacidade com o anodo colocado no topo da coluna. A quantidade de proteína eletrofocalizada foi de 500µg para a fração β-glucosidásica e 580 µg para a fração CM-celulásica.

O tempo de eletrofocalização foi de 48 horas com uma voltagem inicial de 500 V aumentando-se para 650 V após algumas horas.

Foram coletados frações de 1,0 ml nos quais foram feitos imediatamente a dosagem de proteína pelo método de WARBURG e CHRISTIAN<sup>73</sup>, a atividade enzimática e a determinação potenciométrica do pH.

#### 9. Eletroforese em gel de poliacrilamida.

As frações β-glucosidásica (50 µg de proteína) e CM-celulásica (58 µg de proteína) foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida a 7,5%<sup>15</sup> com tampão borato de sódio 0,01 M pH 10,0. A eletroforese foi realizada a 5 mA por tubo durante 3 horas em equipamento ORTEC modelo 4200.

Finda a eletroforese o gel foi corado por 2 horas com "Coomassie blue brilliant" 0,25% e descorado com uma solução conforme descrito por WEBER & OSBORN<sup>74</sup>.

#### 10. Determinação do fator "C<sub>1</sub>"

A determinação do componente C<sub>1</sub> da fração CM-

celulásica foi feita medindo-se a liberação de açúcares solúveis em 18 horas e 24 horas de incubação<sup>81</sup>.

A mistura de incubação continha: 20 mg de celulose (Whatmann Cellulose Powder - CF<sub>1</sub>), 40 μ moles de tampão acetato pH 5,4, 2 μ moles de NaN<sub>3</sub>, 37,5 μg de proteína para um volume final de 2,0 ml. Após a incubação as aliquotas foram centrifugadas a 200 x g por minuto.

Os açúcares totais do sobrenadante foram dosados pelo método do fenol-sulfúrico<sup>16</sup> usando-se como padrão a D-glucose.

#### 11. Especificidade das frações.

A especificidade das frações e do extrato bruto foram determinados, incubando-se a mistura enzimática com os diversos polissacarídeos e oligossacarídeos a 40°C por 30 minutos.

A mistura de reação continha: 1,25 mg de polissacarídeo ou 25 μ moles de oligossacarídeos, 5,8 μg de proteína (β-glucosidase) e 3,6 μg proteína (CM-celulase), 50 μ moles de tampão acetato pH 5,4 para volume final de 1,0 ml.

A liberação dos açúcares solúveis foi determinado pelo método de SOMOGYI-NELSON<sup>51,69</sup> para os polissacarídeos e glucose oxidase<sup>14</sup> para os oligossacarídeos.

#### 12. Efeito da concentração do substrato.

A análise do efeito da concentração de substrato foi feito utilizando-se como substrato a carboximetilcelulose e a celobiose.

A mistura reativa continha: 5,8 μg proteína

( $\beta$ -glucosidase) e 3,6  $\mu$ g proteína (CM-celulase), 50  $\mu$ moles tampão acetato pH 5,4 e diferentes concentrações de carboximetilcelulose e celobiose.

A liberação dos açúcares foram analisadas pelo método de SOMOGYI<sup>69</sup> - NELSON<sup>51</sup> para a carboximetilcelulose e glucose oxidase<sup>14</sup> para a celobiose.

### 13. Determinação do peso molecular.

O peso molecular das frações foi determinado em uma coluna de Sephadex G-200 (38,0 cm x 1,0 cm) equilibrada e eluída com tampão acetato 5 mM pH 5,4 conforme descrito por ANDREWS<sup>6</sup>. A quantidade de proteína aplicada foi de 3,2 mg. Os padrões utilizados foram a hemoglobina (Hb1 = 64000; Hb2 = 48000; Hb3 = 32000 e Hb4 = 16000) de peso molecular) e a soro albumina com os pesos moleculares de: (Alb. 1 = 264000 Alb. 2 = 198000 Alb. 3 = 132000 e Alb. 4 = 66000). Foram coletadas frações de 1,0 ml e a dosagem de proteína foi feita em espectrofotômetro Beckmann pelo método de WARBURG e CHRISTIAN<sup>73</sup>.

### REAGENTES

#### 1. Produtos Químicos.

Os reagentes eram pré-análise, provenientes de várias fontes: Sigma, Carlo Erba, Merck, etc. e eram tidos como quimicamente puros.

Sephadex G-100 e G-200 = Pharmacia, Upssala  
Sweden.

Amberlite MB-3 = Mallinckrodt Chemical Works.  
St. Louis - U.S.A.

Extrato de levedura = E. Merck AG. Darmstadt.

Anfolina pH 3,5 - 11,0 = LKB - Bromma-Sweden.

Agar = Oxoid Agar nº 1 - Oxoid Ltd. London.

Padrão albumina = Sigma Chemical Co.

Padrão hemoglobina = Sigma Chemical Co.

## 2. Substratos.

Glicogênio de marisco tipo II (Sigma)

Amido (Merck)

Rafinose, maltose, celobiose, trealose, saca-rose, lactose, melizitose,  $\alpha$ -melibiose,  $\beta$ -melibiose, turanose (Calbiochem, Los Angeles U.S.A.).

Carboximetilcelulose (Carboxymethylcellulose nº C -8758 - Sodium salt - Sigma Chemical Company).

Celulose - (Whatmann CF<sub>1</sub> long fibres - W & R-Balston Ltd.).

Celulose - (CAMAG - chemie Zellulose pulver - Erzeugnisse und adsorptionstechnik AG-Muttenz/Schweiz-Switzerland).

Xilano do caule de Mimosa bracinga (gentilmente cedido pelo Prof. João B.C. Corrêa).

Serragem de cedro, imbuia e araucária. Casca de Arroz.

## 3. Enzima.

D-glucose oxidase (Sigma Chemical Co.).

Peroxidase (Sigma Chemical Co.).

## RESULTADOS

### 1. Curva de liberação da enzima.

O máximo de liberação de ambas as enzimas no meio de cultivo ocorre a partir de 120 horas de crescimento e é estável por mais de 480 horas, usando celulose insolúvel (0,2 %) como fonte de carbono. Fig. 1.

### 2. Efeito da fonte de carbono.

A tabela I ilustra as atividades máximas obtidas com as diversas fontes de carbono. A carboximetilcelulose e a celulose insolúvel mostraram ser as melhores fontes de carbono, sendo que esta última foi utilizada nos experimentos posteriores.

### 3. Obtenção da enzima.

A figura 2 ilustra o perfil de fracionamento da enzima em uma coluna de Sephadex G-100. Observa-se a separação de duas frações distintas, os quais denominamos FI para a fração  $\beta$ -glucosidásica e FII para a fração CM-celulásica.

O fracionamento da fração FII na coluna de celulose permitiu uma melhor purificação, eliminando-se outras proteínas conforme mostra a figura 3. Foi necessário a adição de  $\beta$ -mercaptoetanol numa concentração final de 5 mM à esta fração obtida da coluna de celulose para evitar rápida perda de atividade com o decorrer do tempo. Nestas condições as frações se mantiveram estáveis por mais de 6 meses a 4°C em pH 5,4. (Tabela II).

#### 4. Velocidade inicial da reação.

A atividade da enzima foi linear até tres horas de incubação para ambas as frações.

#### 5. Efeito do pH na atividade enzimática.

Nas condições normais de ensaio o pH ótimo da fração FI variou de 5,2 a 5,6 enquanto que na fração FII o pH ótimo está em torno de 4,8 a 5,6 conforme figuras 4 e 5.

#### 6. Efeito da temperatura na atividade enzimática.

Através das figuras 6 e 7, verifica-se que a temperatura ótima para a atividade enzimática foi em torno de 40°C a 50°C para ambas as frações.

Com relação a estabilidade térmica verificou-se que a fração FII é muito mais sensível a temperaturas superiores a 60°C do que a fração FI. A fração FII mantém 20% da atividade inicial a 60°C enquanto que a fração FI retém 50% da atividade inicial na mesma temperatura. A inativação total ocorria a 100°C.

#### 7. Inativação térmica.

A fração enzimática II submetida a inativação térmica a 65°C na ausencia de substrato verificou-se que a enzima mantinha 63% de sua atividade (Figura 8), o que não ocorria quando a mesma era submetida a aquecimento em presença de CMC (Figura 7) observando-se o efeito antagônico com relação as demais enzimas normalmente descritas.

Quando o substrato era o xilano a enzima perdia a ação catalítica em 15 minutos (Figura 8).

#### 8. Especificidade das frações.

Na determinação da especificidade das fra-

ções enzimáticas frente a vários polissacarídeos e oligosacarídeos, foi constatado que a fração FI apresentava atividade sobre os polissacarídeos mas não apresentava atividade sobre os oligossacarídeos com exceção da celobiose. A fração FII apresentava atividade somente sobre os polissacarídeos, conforme Tabela III. Constatou-se também que o extrato bruto e a fração FII não possuía atividade sobre a celulose bruta, sugerindo que a fração não possui o componente  $C_1$ .

#### 9. Cromatografia em papel do produto da hidrólise.

Observa-se pelas figura 9, que a fração FI hidrolisa a carboximetilcelulose convertendo-a diretamente em glucose. Por outro lado a fração FII hidrolisa a carboximetilcelulose em celobiose para em seguida convertê-la em glucose (Fig.10). Verifica-se também leves traços de oligossacarídeos remanescentes na origem.

#### 10. Focalização isoelétrica.

Os resultados da eletrofocalização mostram que a fração FI apresenta 3 picos de proteína e uma só atividade com o ponto isoelétrico em pH 3,9 (fig. 11).

A fração FII apresenta 2 picos de proteína e uma só de atividade com o ponto isoelétrico em pH 11,6 (Fig. 12).

#### 11. Eletroforese em gel de poliacrilamida.

A análise eletroforética das frações mostrou a presença de mais de uma banda de proteína, porém verificou-se que certa quantidade de proteína permanecia na origem da coluna de gel. Figura 13.

## 12. Efeito da concentração de substrato.

O efeito da concentração de carboximatilcelulose das atividades enzimáticas das frações FI e FII está indicada na figura 14. Os valores de  $V_{max}$  (nmoles /mg/min) para a fração FI foi de 444 e para a fração FII foi de 625. Os valores de  $K_m$  das frações FI e FII foi de 4,0 g/l e 5,0 g/l respectivamente.

Utilizando-se a celobiose como substrato obtivemos o  $K_m$  aparente de  $7,14 \times 10^{-4} M$  para a fração FI e  $1,67 \times 10^{-3} M$  para a fração FII e a  $V_{max}$  foi de 2857 nmoles para a fração FI e 200 nmoles para a fração FII (Fig. 15 e 16).

## 13. Determinação do peso molecular por filtração em gel.

Conforme a figura 17, o peso molecular da fração FI é superior a 264000 enquanto que a fração FII apresentou peso molecular em torno de 70000.

TABELA I - EFEITO DAS FONTES DE CARBONO.

FONTES DE CARBONO	ATIVIDADE ESPECÍFICA
AMIDO	1,70
ARAUCÁRIA	11,0
ARROZ	18,0
BRACATINGA	7,70
CEDRO	2,20
CMC	30,0
CELOBIOSE	2,30
CELULOSE	39,0
IMBUIA	2,30
GLUCOSE	3,00

Crescimento no meio líquido de MARKUS com fontes de carbono na concentração de 0,2% e a 28°C com agitação por 11 dias.

Atividade específica em nmoles de produto por minuto por mg de proteína.

TABELA II - ISOLAMENTO DAS FRAÇÕES ENZIMÁTICAS

ETAPAS DE PURIFICAÇÃO	VOL. (ml)	PROTEÍNAS TOTALS (mg)	CM-CELULASE		β-GLUCOSIDASE		PURIFICAÇÃO (vezes)	
			U.Totais	A.Esp.	U.Totais	A.Esp.	CM - Celulase	β-Glucosidase
MEIO LIOFILIZADO	11,0	37,5	6149	164	9053	241	0	0
SEPHADEX G-100								
Fração FI	35,0	2,5	1855	742	7943	3136	4,5	13,0
Fração FII	65,0	18,6	4420	237	2015	108	1,4	0,4
CELULOSE								
Fração FII	50,0	4,8	3400	708	--	--	4,3	--
ELETROFOCALI- ZAÇÃO								
Fração FI	5,0	0,155	80	516	--	--	0,9	--
Fração FII	11,0	0,24	385	160	--	--	1,6	--

TABELA III - ESPECIFICIDADE DAS FRAÇÕES

SUBSTRATOS	VELOCIDADE RELATIVA		
	EXTRATO BRUTO	FRAÇÃO FI	FRAÇÃO FII
CMC	100	100	100
AMIDO	5	8,9	21,2
GLICOGÊNIO	10	3,6	17,5
XILANO	165	32,1	167,5
RAFINOSE	0	0	0
MELIZITOSE	0	0	0
TREALOSE	0	0	0
CELOBIOSE	85	114	0
MALTOSE	0	0	0
SACAROSE	0	0	0
LACTOSE	0	0	0
$\beta$ MELIBIOSE	0	0	0
$\alpha$ MELIBIOSE	0	0	0
TURANOSE	0	0	0

Sistemas de incubação: 3,2  $\mu$ g proteína (EB); 5,8  $\mu$ g proteína (FI); 3,6  $\mu$ g proteína (FII); 50  $\mu$ moles de tampão acetato pH 5,4; 1,25 mg de polissacarídeos ou 25  $\mu$ moles de oligossacarídeos. Volume final de 1,0 ml.

Incubação a 40°C por 30 minutos.

EB = 100% = 1141 de atividade específica

FI = 100% = 1886 de atividade específica

FII = 100% = 4284 de atividade específica

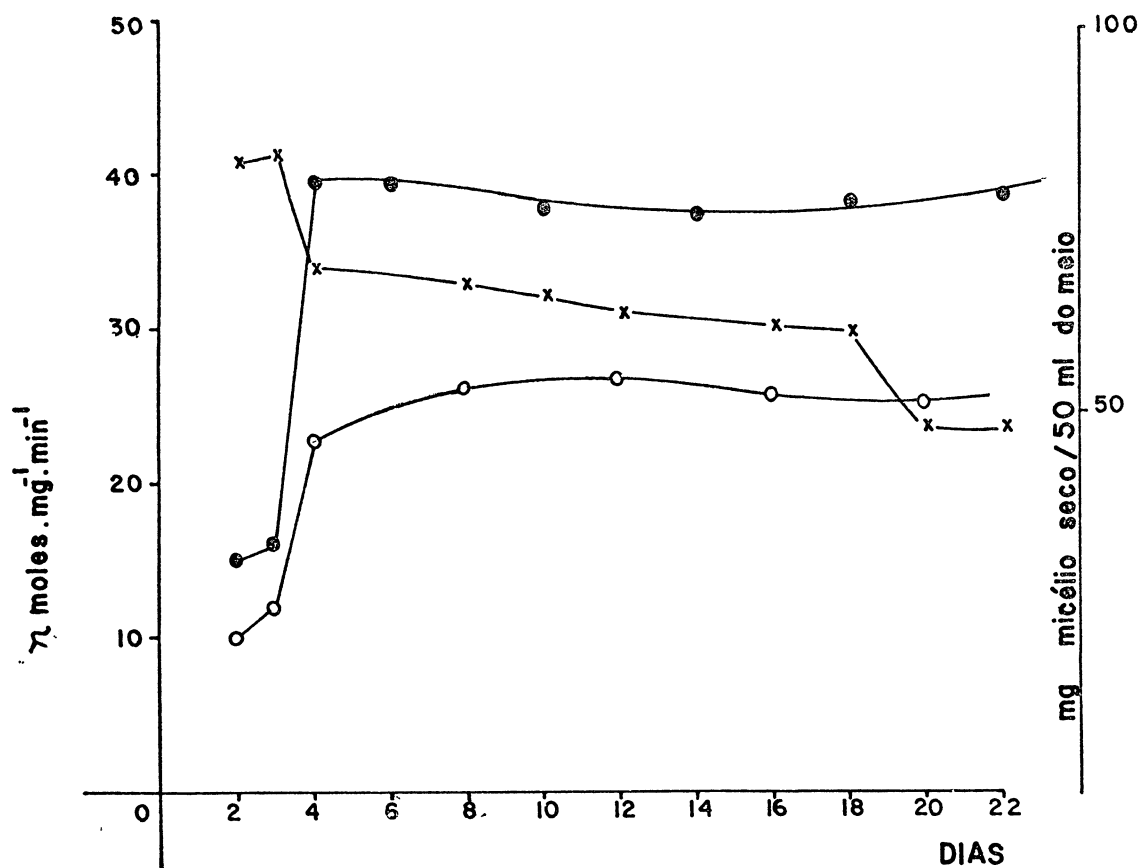


Figura 1 - Curva de liberação da enzima.

Meio líquido contendo 0,2% de celulose, pH 5,8, temperatura de 28°C com agitação. Ensaio conforme descrito em Materiais e Métodos.

x---x---x    mg de micélio  
 ○—○—○    cm-celulase  
 ●—●—●    xilanase

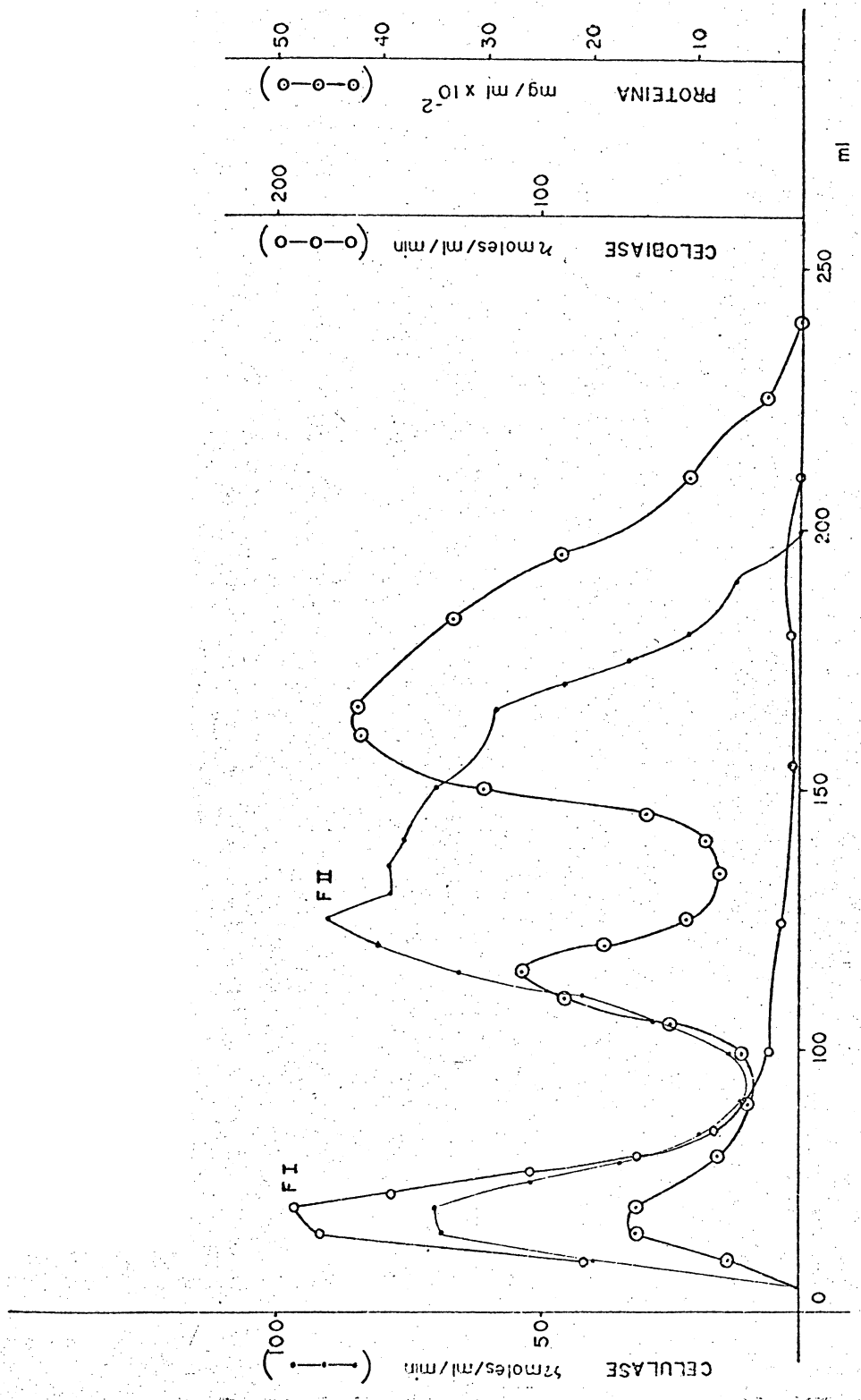


Figura 2 - Perfil de eluição da  $\alpha$ -celulase e  $\beta$ -glucosidase por cromatografia em Sephadex G-100

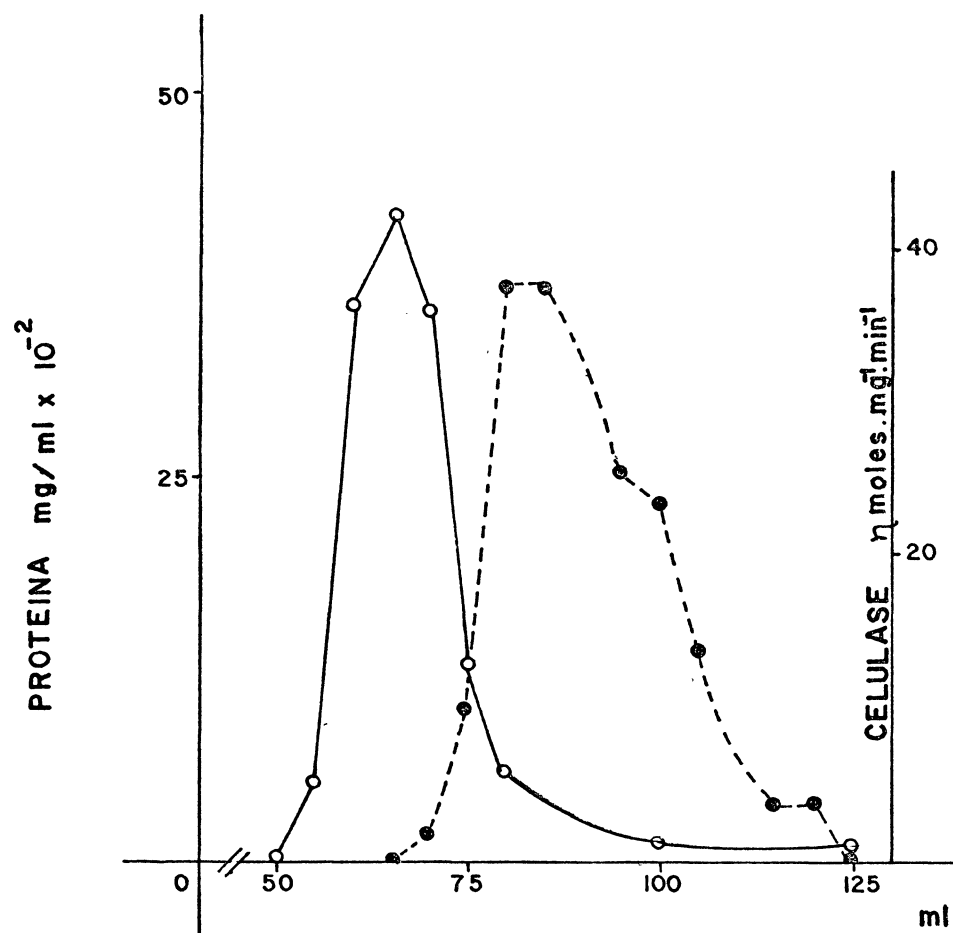


Figura 3 - Perfil de eluição da fração FII por cromatografia em coluna de celulose. Ensaio conforme descrito em Materiais e Métodos.

○—○—○ proteína  
●—●—● celulase

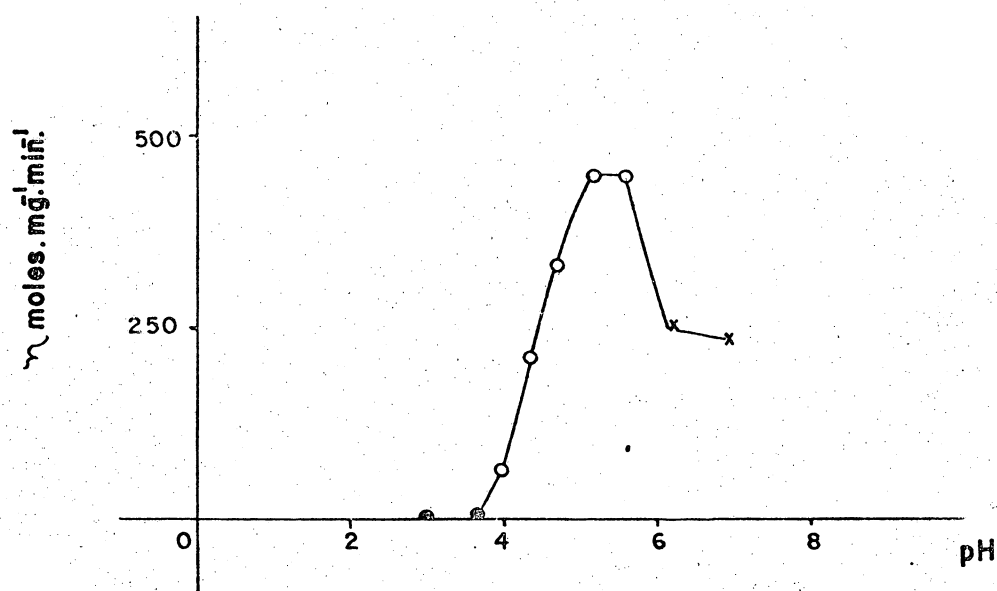


Figura 4 - Efeito do pH na atividade enzimática da fração FI (Sephadex).

Sistema: 5,0  $\mu$ g de proteína, 50  $\mu$ moles do respectivo tampão, 1,25 mg de CMC para um volume final de 1,0 ml.

Incubação a 40°C por 30 minutos.

- tampão Glicina/HCl - (3,0 - 3,7)
- tampão ácido acético/acetato de sódio (4,0 - 5,6)
- x—x tampão imidazol/HCl - (6,2 - 7,0)

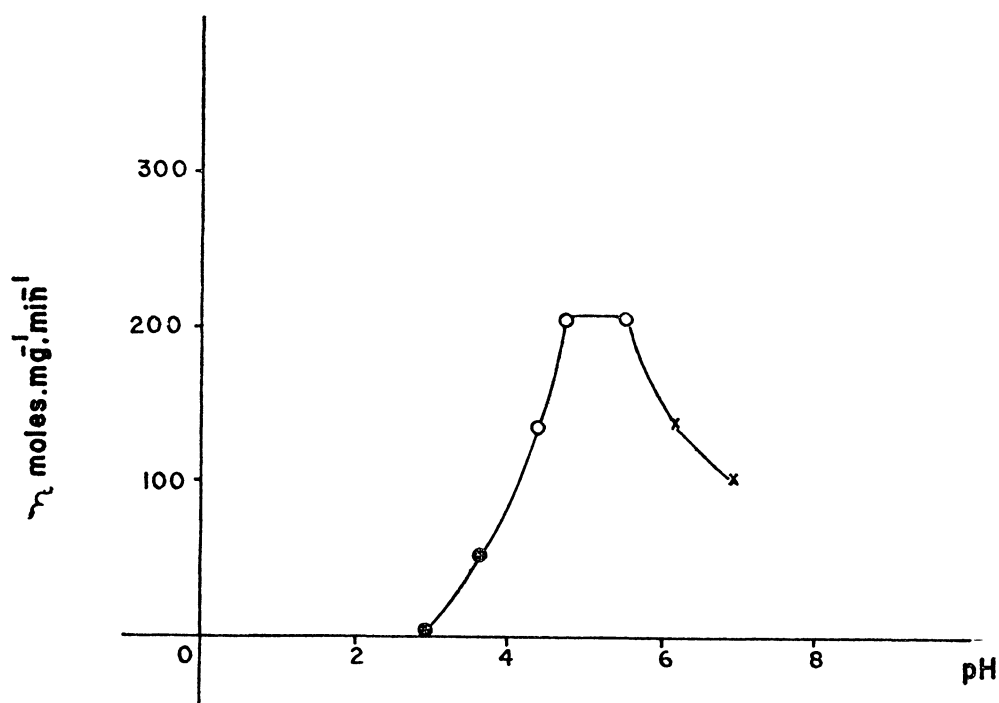


Figura 5 - Efeito do pH na atividade enzimática da fração FII (Celulose).

Sistema de incubação: 5,8  $\mu\text{g}$  de proteína, 50  $\mu\text{moles}$  do respectivo tampão, 1,25 mg CMC para volume final de 1,0 ml.

Incubação de 30 minutos a 40°C.

- tampão glicina/HCl (3,0 - 3,7)
- tampão acetato de sódio/ácido acético (4,0 - 5,6)
- x—x tampão imidazol/HCl (6,2 - 7,0).

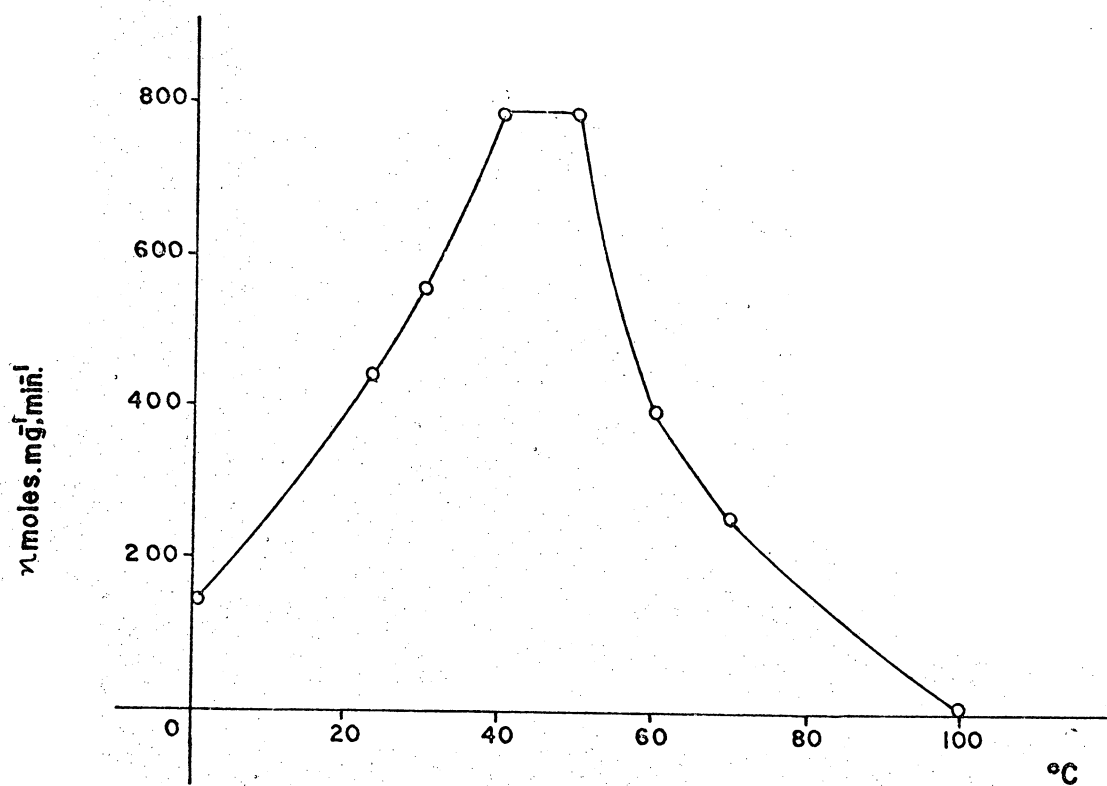


Figura 6 - Efeito da temperatura na atividade enzimática da fração FI (Sephadex).

Sistema de incubação: 5,0  $\mu\text{g}$  de proteína, 50  $\mu\text{moles}$  de tampão acetato pH 5,4, 1,25 mg CMC para volume final de 1,0 ml.

Incubação de 30 minutos para cada temperatura.

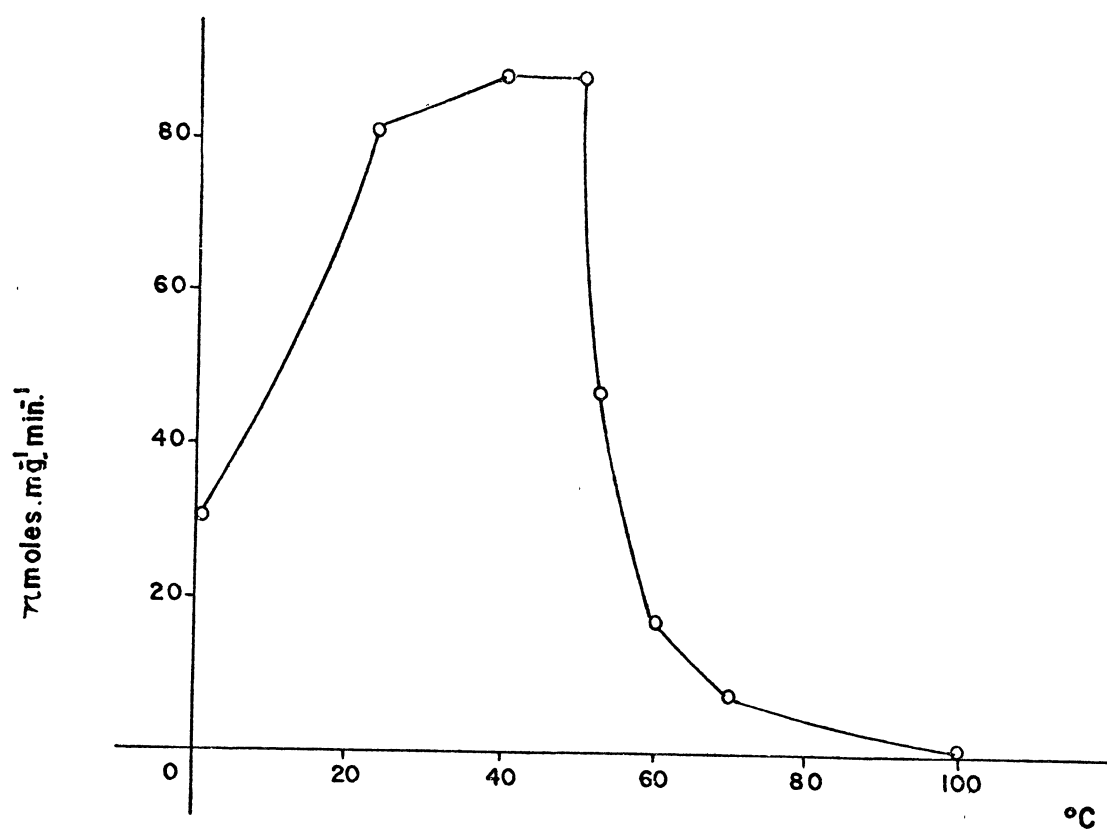


Figura 7 - Efeito da temperatura na atividade enzimática da fração FII (Celulose).

Sistema de incubação: 5,8 μg de proteína, 50 μmoles tampão acetato pH 5,4, 1,25 mg CMC para volume final de 1,0 ml.

Incubação de 30 minutos para cada temperatura.

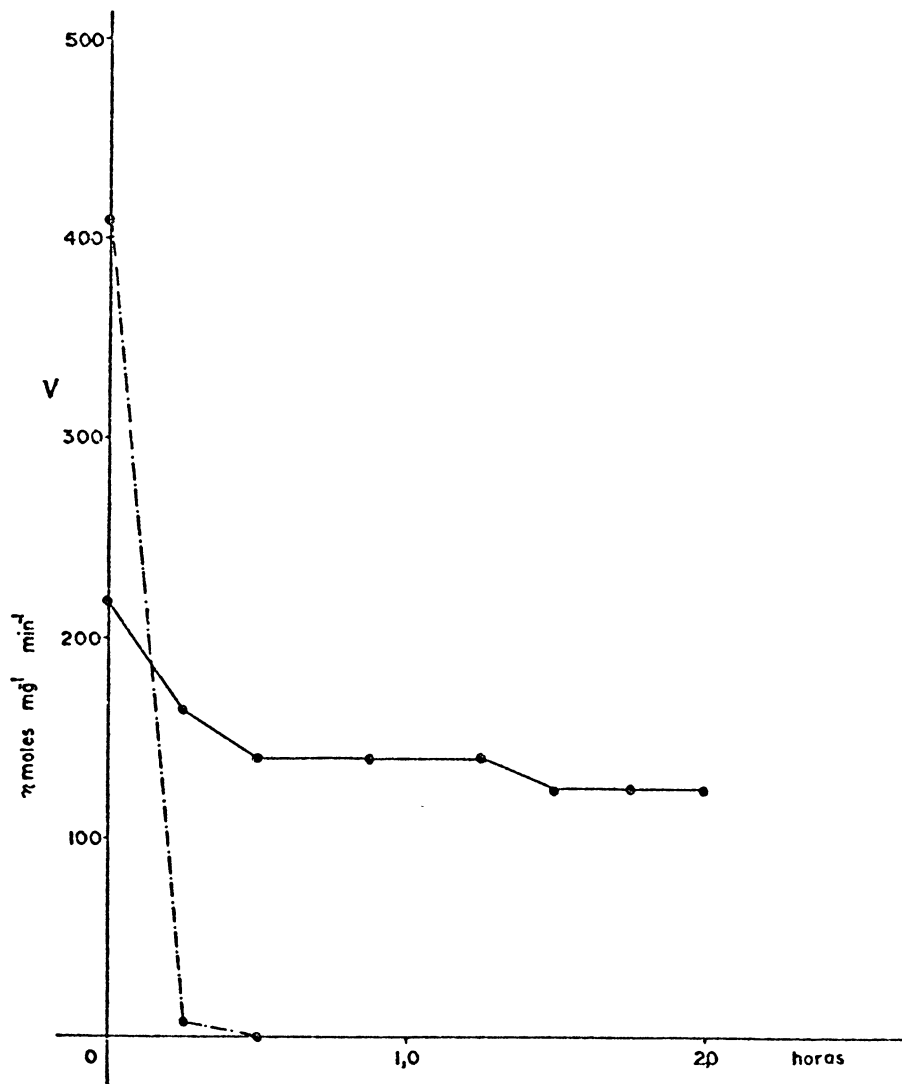


Figura 8 - Inativação térmica a 65°C da fração FII

Sistema de inativação: 1,0 ml da fração FII (Sephadex) mantido em tampão acetato 5 mM pH 5,4, foi incubado a 65°C e foram retiradas aliquotas de 0,1 ml nos tempos indicados para determinação da atividade.

Sistema de incubação:

5,8 μg de proteína, 50 μmoles de tampão acetato pH 5,4, 1,25 mg de CMC ou xilano para volume final de 1,0 ml.

● — ● — ● xilanase  
 ● — ● — ● celulase

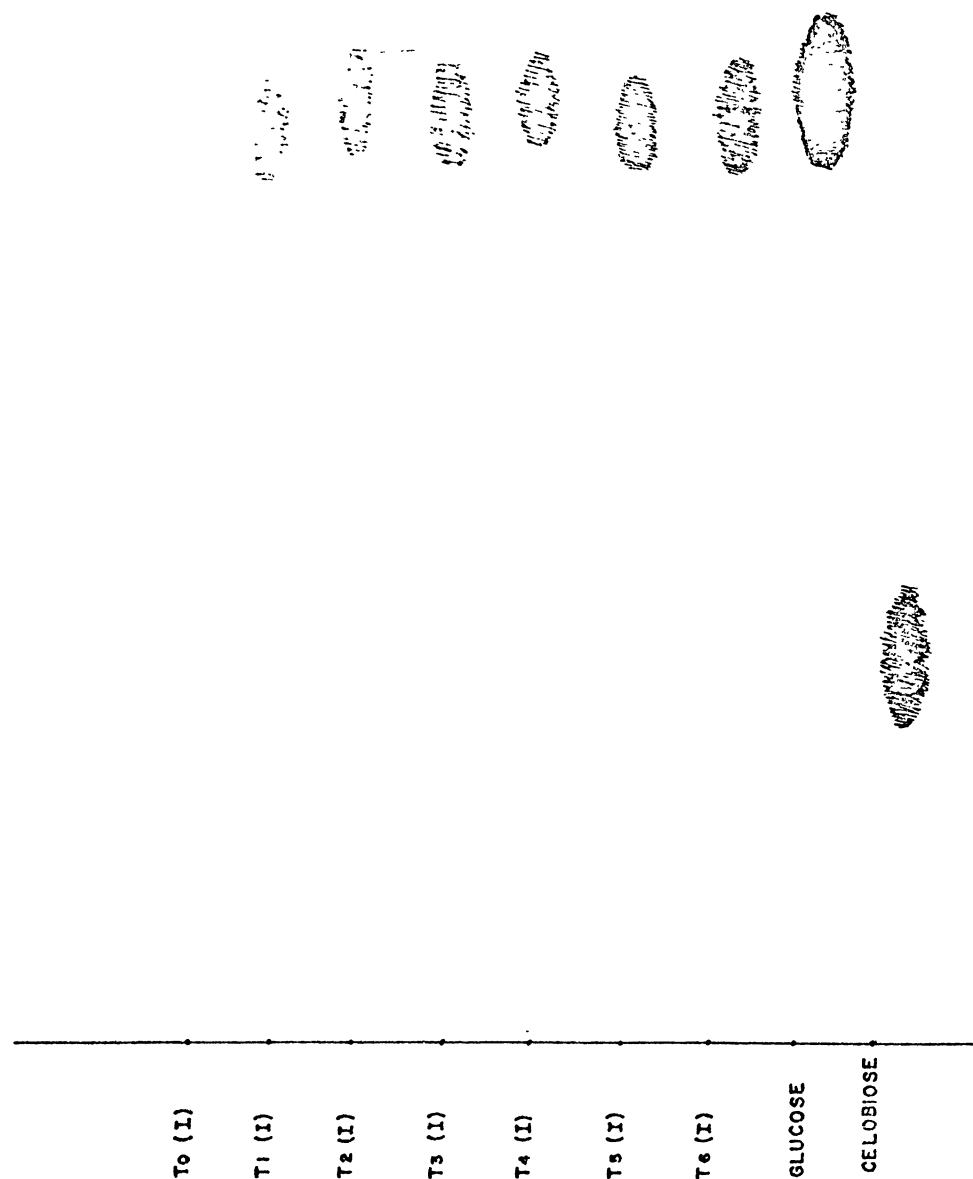


Figura 9 - Cromatografia do produto da hidrólise da fração FI. (Sephadex).

Sistema de incubação: 1,25 mg CMC, 50  $\mu$ moles tampão acetato pH 5,4, 5,0  $\mu$ g de proteína para volume final de 1,0 ml.

Incubação a 40°C nos diversos tempos.

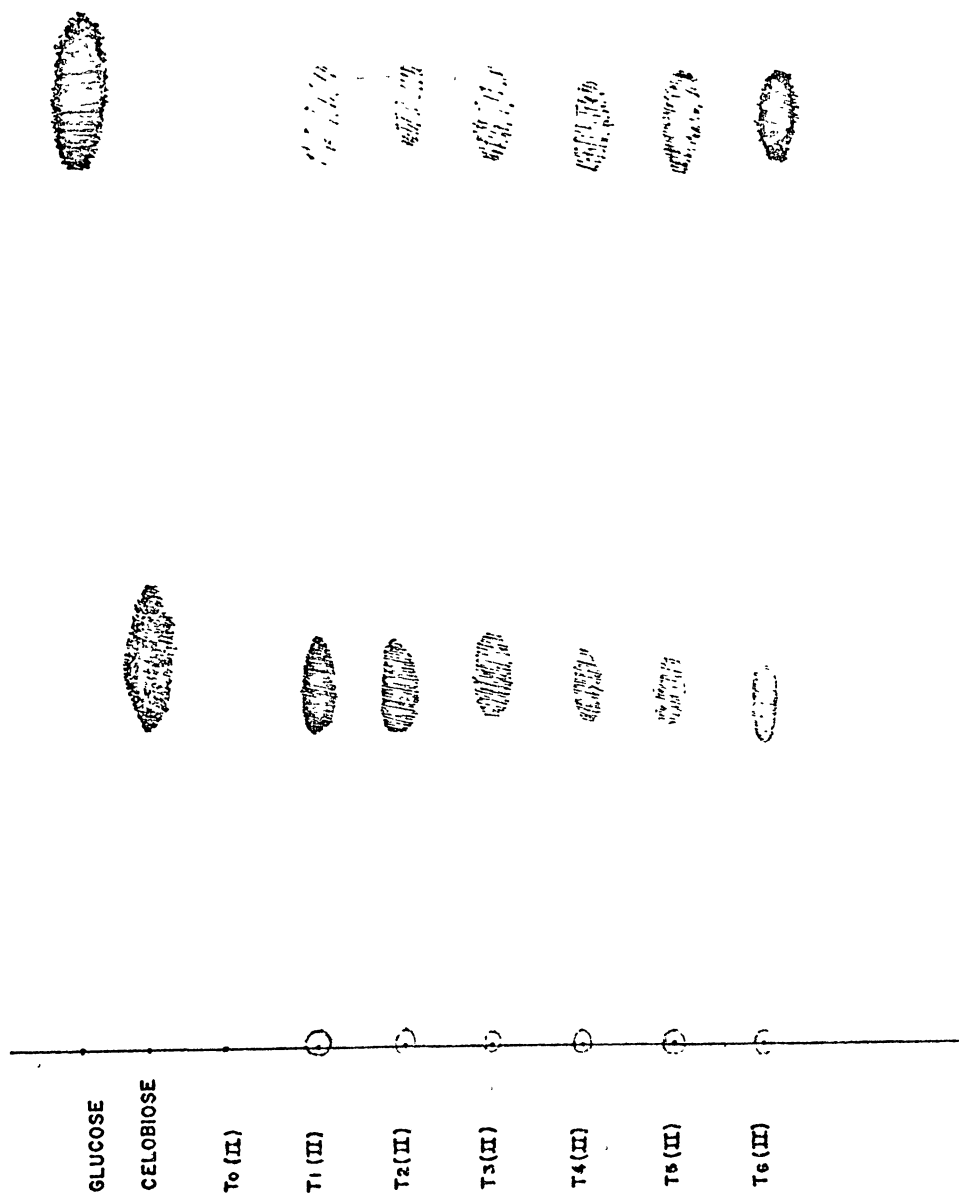


Figura 10 - Cromatografia do produto da hidrólise da fração FII. (Sephadex).

Sistema de incubação: 1,25 mg de CMC, 50  $\mu$ moles tampão acetato pH 5,4, 5,8  $\mu$ g proteína para volume final de 1,0 ml.

Incubação a 40°C nos diversos tempos.

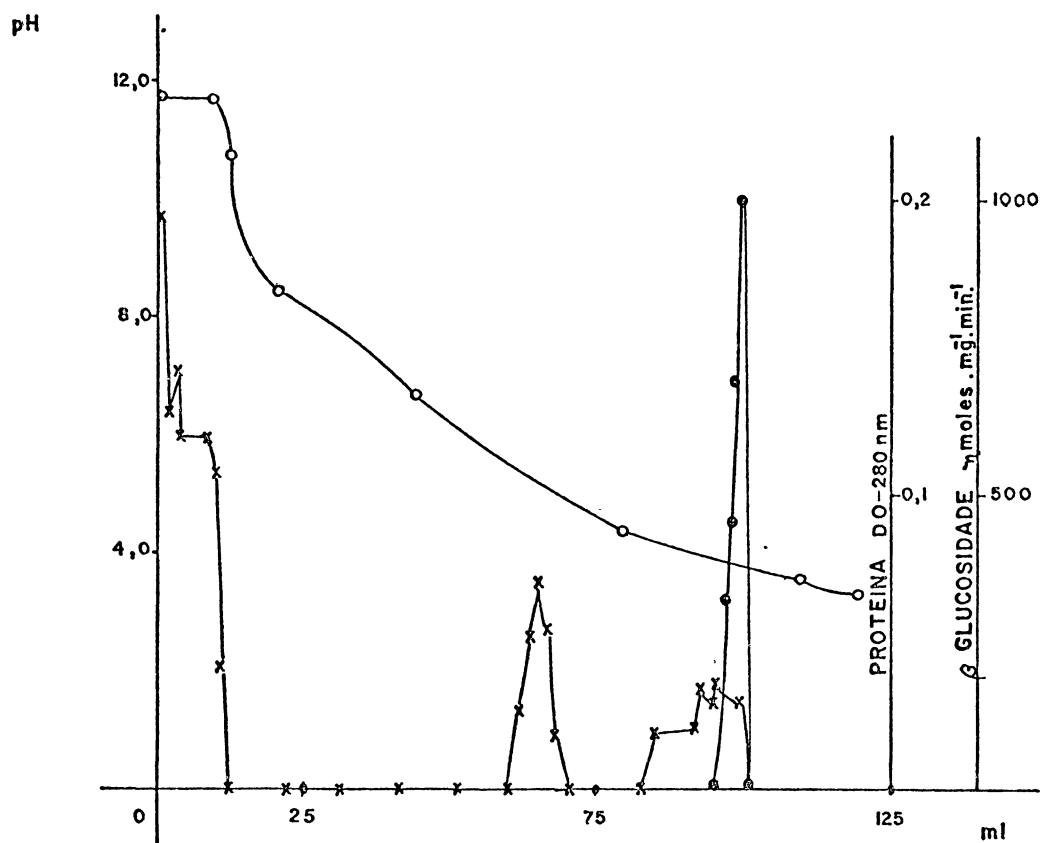


Figura 11 - Focalização isoelétrica da fração FI.

Sistema: gradiente de sacarose, 500  $\mu$ g pro-  
teína, anfolina pH 3,5 - 11,0.

Tempo de eletrofocalização - 48 horas a 4°C.

○—○—○ - pH  
x—x—x - Proteína  
●—●—● - β-glucosidase

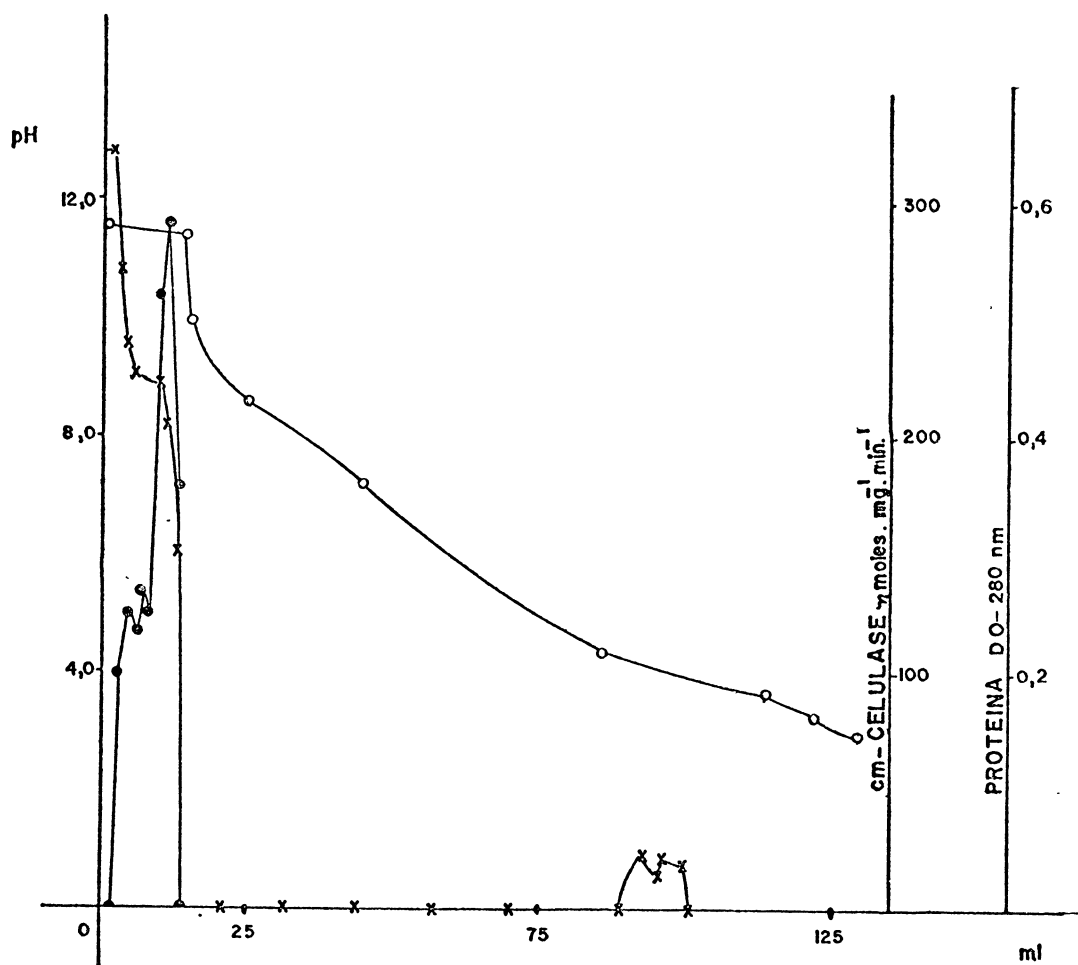


Figura 12 - Focalização isoeétrica da fração FII.

Sistema: gradiente de sacarose, 580  $\mu\text{g}$  proteí  
na e anfolina pH 3,5 - 11,0.

Tempo de eletrofocalização - 48 horas a 4°C.

●—●—● - CM-celulase

○—○—○ - pH

x—x—x - proteína

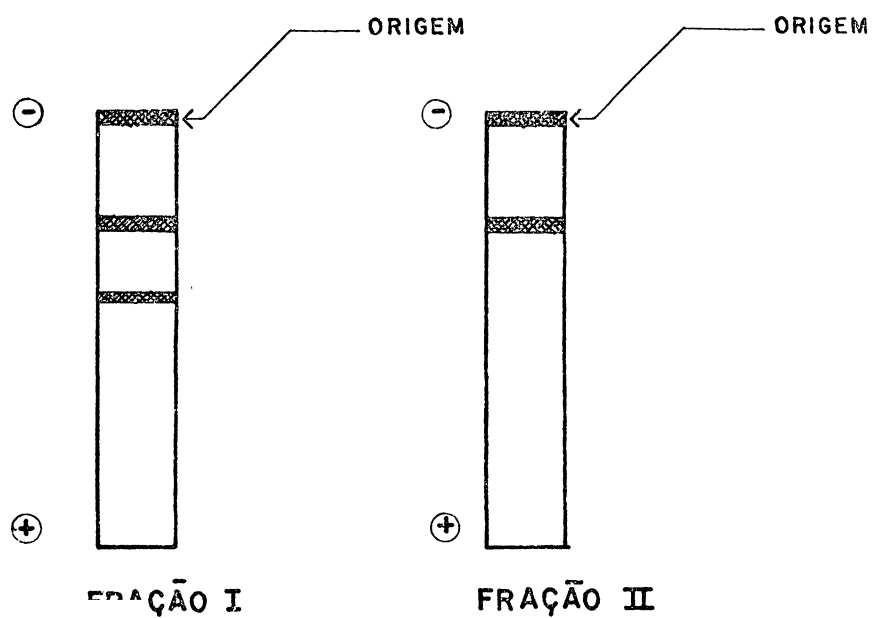


Figura 13 - Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida.

Concentração do gel = 7,5%

Tampão borato 0,01 m pH 10,0

Quantidade de proteína aplicada

Fração FI = 50 $\mu$ g
Fração FII = 53 $\mu$ g

Tempo de corrida - 3 horas com 5 mA por tubo.

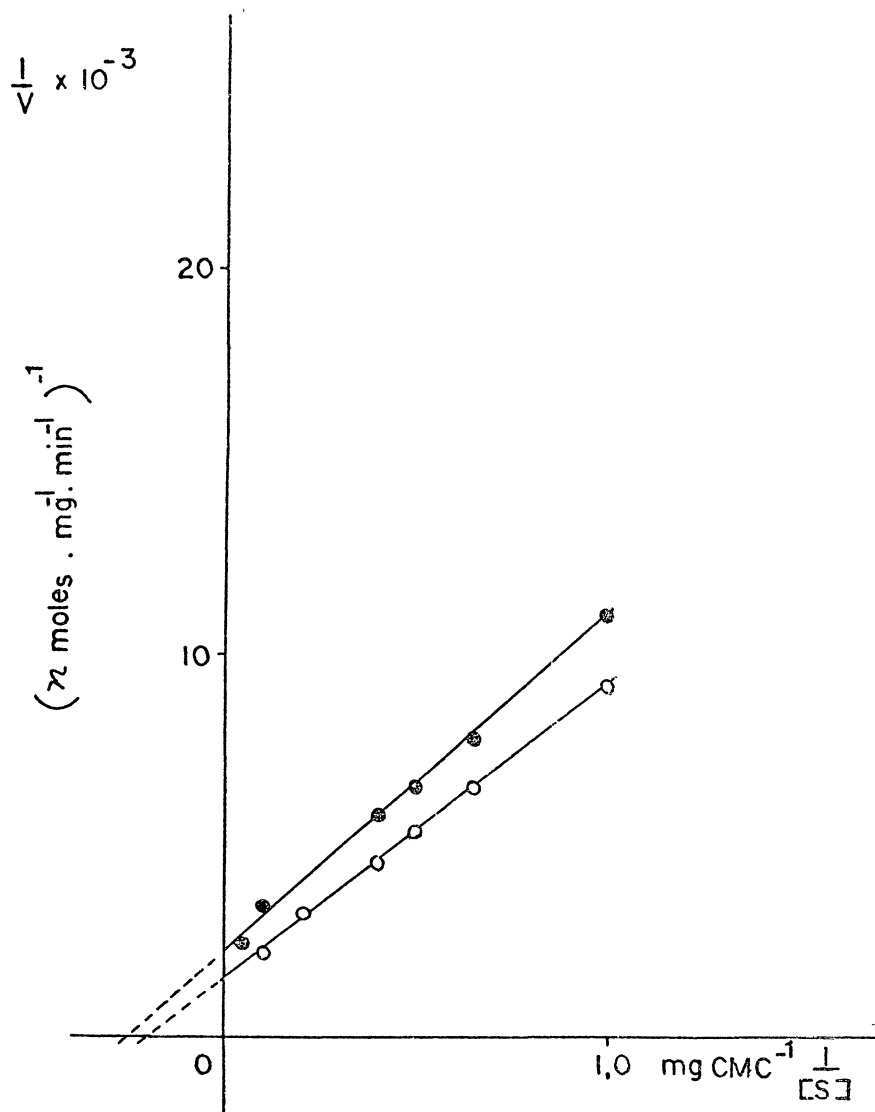


Figura 14 - Efeito da concentração de carboximetilcelulose.

Sistema de incubação: 5,8  $\mu\text{g}$  de proteína (FI):  
 3,6  $\mu\text{g}$  de proteína (FII); 50  $\mu\text{moles}$   
 de tampão acetato pH 5,4; concentrações  
 variáveis de carboximetilcelulose para  
 um volume final de 1,0 ml.

Incubação a 49°C por 30 minutos.

- |         |     |           |       |
|---------|-----|-----------|-------|
| 1. Km - | FI  | - 4,0 g/l | ●—●—● |
| 2. Km - | FII | - 5,0 g/l | ○—○—○ |

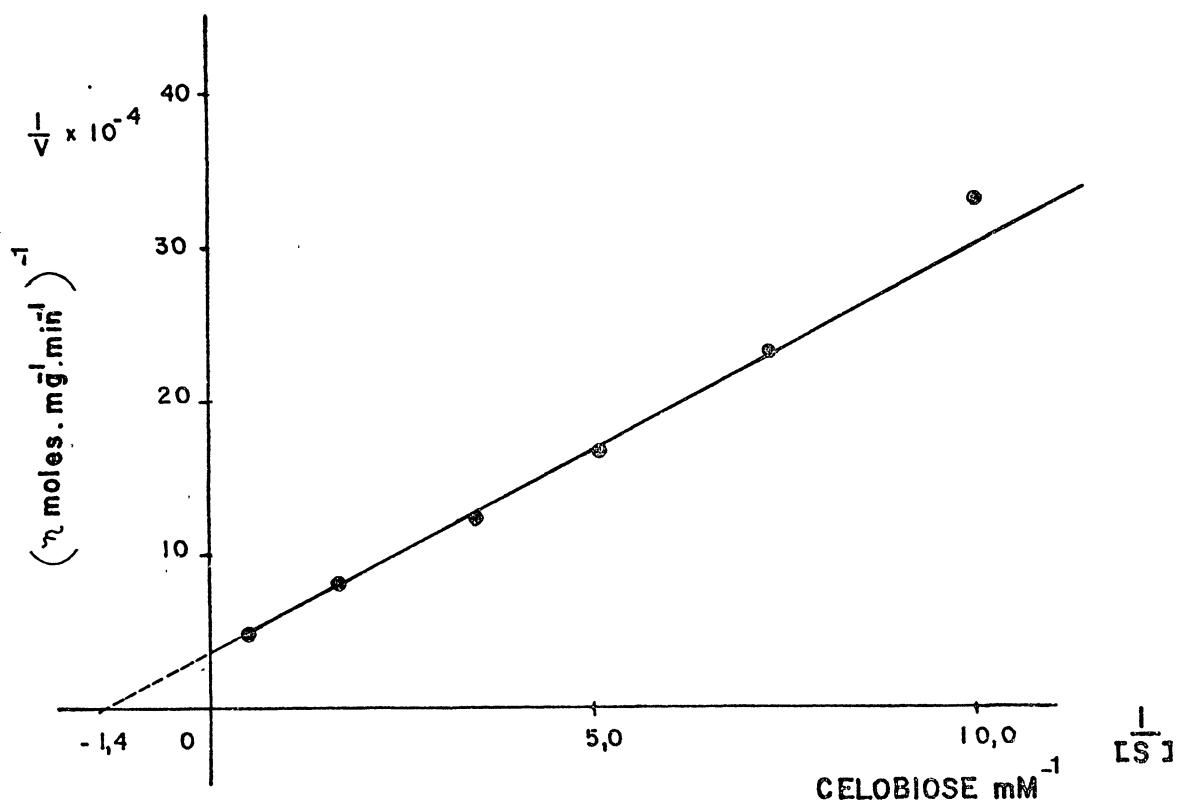


Figura 15 - Efeito da concentração de celobiose na fração FI.

Sistema: 5,8  $\mu\text{g}$  de proteína, 50  $\mu\text{moles}$  tampão acetato pH 5,4. e celobiose em várias concentrações para volume final de 1,0 ml.

Incubação por 30 minutos a 40°C.

$K_m = 7,14 \times 10^{-4} \text{M}$ .

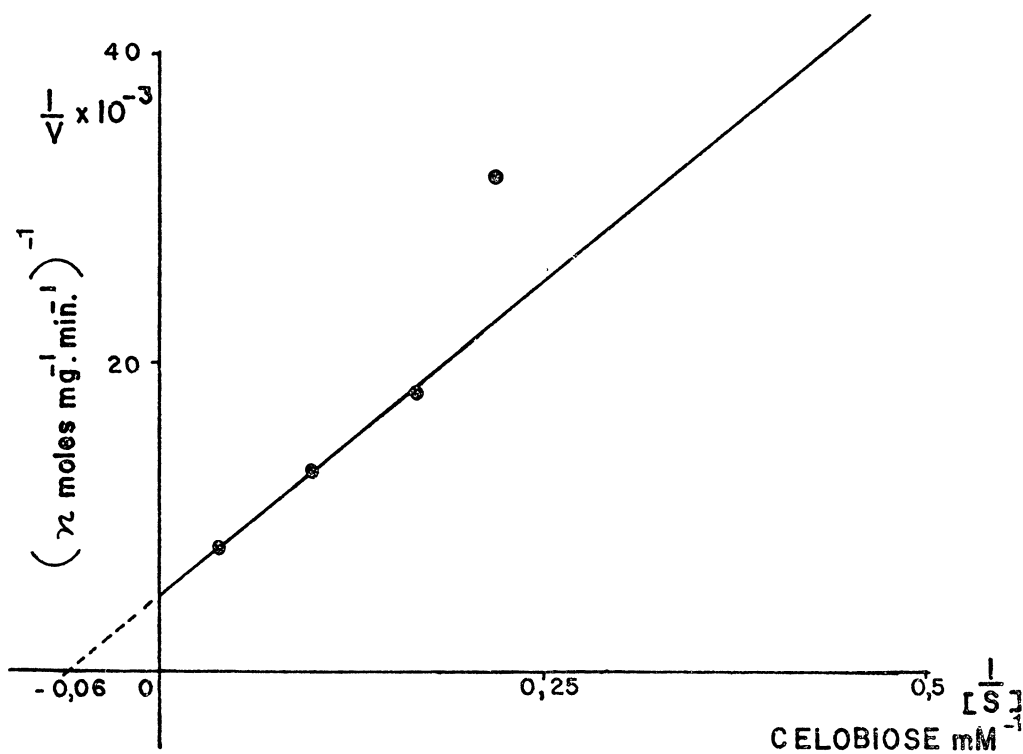


Figura 16 - Efeito da concentração de celobiose na fração FII.

Sistema: 3,6 μg proteína, 50 μmoles tampão acetato pH 5,4 e celobiose em várias concentrações para volume final de 1,0 ml.

Incubação por 30 minutos a 40°C.

$$K_m = 1,67 \times 10^{-3} \text{ M.}$$

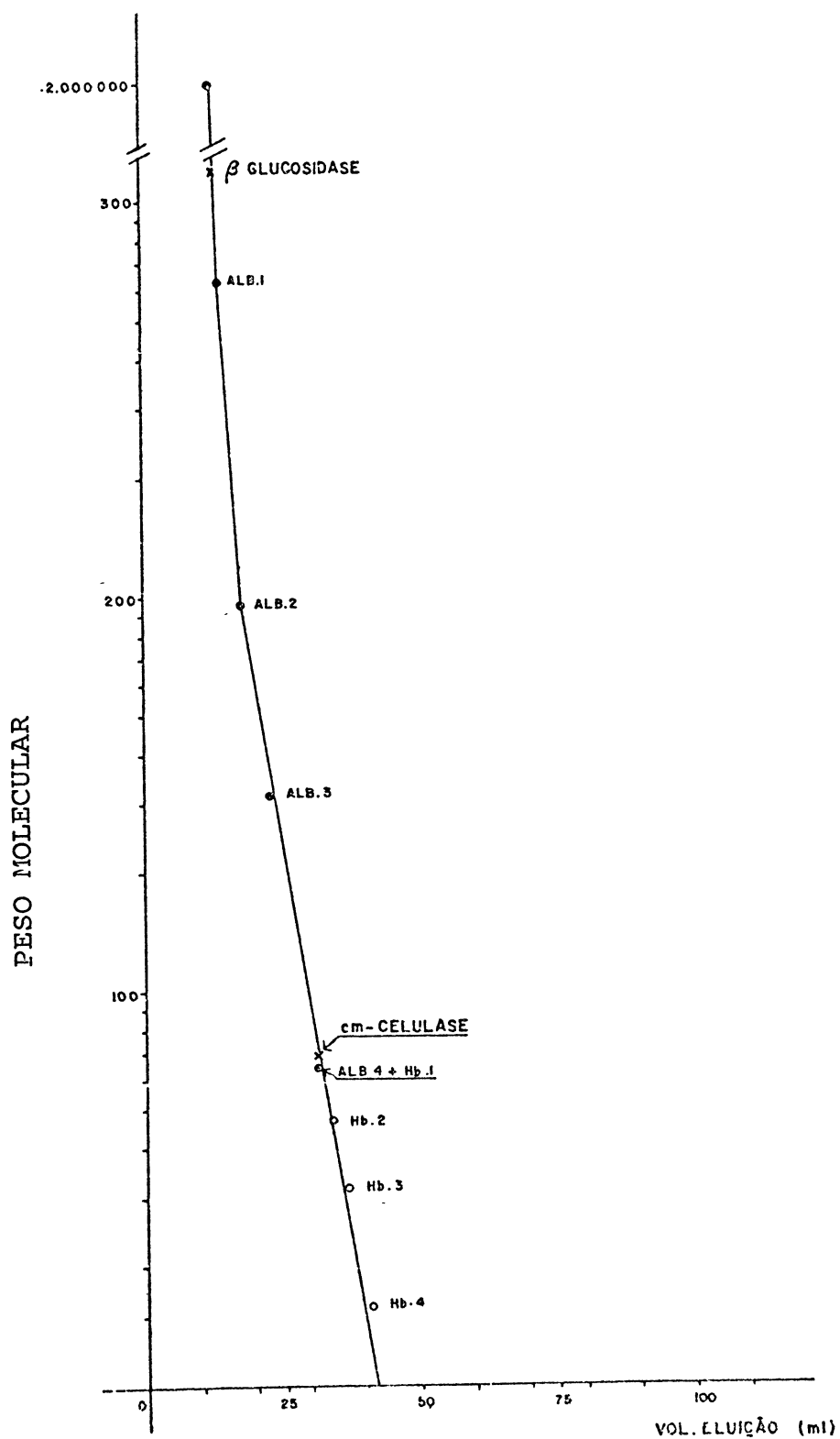


Figura 17 - Determinação do Peso Molecular aparente da CM-celulase e  $\beta$ -glucosidase em Sephadex G-200.

HEMOGLOBINA - Hb.1 - P.M. =  $64 \times 10^3$  - Hb.2 - P.M. =  $48 \times 10^3$   
 Hb.3 - P.M. =  $32 \times 10^3$  - Hb.4 - P.M. =  $16 \times 10^3$   
 ALBUMINA - Alb. 1 - P.M. =  $264 \times 10^3$  - Alb. 2 - P.M. =  $198 \times 10^3$   
 Alb. 3 - P.M. =  $132 \times 10^3$  - Alb. 4 - P.M. =  $66 \times 10^3$

## DISCUSSÃO

As enzimas celulolíticas em presença de determinadas fontes de carbono tem suas atividades aumentadas conforme podemos verificar pela tabela I. A celulose em pó foi a fonte de carbono mais efetiva testada para indução da celulase de Polyporus circinatus. A liberação da enzima no meio de cultura ocorre a partir de 48-72 hs de cultivo, quando ocorre também a autólise das células, mantendo constante a sua atividade além de 3 semanas de cultivo. Não houve muita variação no pH do meio de cultivo. Estes dados estão de acordo com a maioria dos trabalhos encontrados na literatura (12,57,60,63,64,75). Foi utilizado o meio de cultivo de 11 dias por apresentar teor de amiloglucosidase diminuída <sup>50</sup>

A fração FII (tabela III) apresentou grande atividade xilanásica e isto sugeria que a enzima em análise poderia ser uma xilanase em vez de celulase, contudo, esta fração quando incubada a 65°C por 15 minutos perdia totalmente a atividade sobre o xilano mantendo a ação hidrolítica sobre a carboximetilcelulose.

Em estudos recentes observou-se que algumas celulases do Trichoderma viride <sup>65</sup> e Irpex lacteus <sup>41</sup> apresentavam atividade xilanásica. KANDA et al <sup>41</sup> mostraram que a atividade xilanásica era intrínseca em relação a celulase homogênea do Irpex lacteus.

A celulase do Aspergillus niger descrito por CLARKE e STONE <sup>13</sup>, não tinha a capacidade de hidrolisar o xilano. Em contraste, o manano era hidrolizado pela enzima deste fungo.

A maioria das celulases dos fungos possuem

pH ótimo na faixa de 4,5 a 7,0 <sup>9,21,22,31,44,53,55,56,62,68,75,79</sup> com exceção de algumas celulases do Aspergillus niger <sup>36,38</sup> que possuem pH ótimo entre 2,3 a 4,0. O pH ótimo da fração FI e FII do Polyporus circinatus (figuras 4 e 5) variou de 5,2 a 5,6 e de 4,8 a 5,6 respectivamente, estando em concordância com a maioria das citações.

A temperatura ótima foi de 40°C a 50°C para ambas as frações FI e FII (figuras 6 e 7), sendo semelhante a de outros trabalhos citados na literatura <sup>1,22,36,38,44,62</sup>. A enzima é estável a temperatura de 4°C em pH 4,8 a 5,6 por mais ou menos 6 meses e é estável a temperatura ambiente pelo menos por 96 horas.

HURST et al <sup>36</sup> verificaram que a celulase do Aspergillus niger era estável a 25°C numa faixa de pH entre 1 a 9.

O fracionamento do filtrado de cultura de dois fungos celulolíticos, Trichoderma koningii <sup>30,77</sup> e Trichoderma viride <sup>8,64</sup> indicam que pelo menos tres tipos de funções diferentes de enzimas são necessários para hidrolisar a celulose altamente ordenada. Estudos de REESE et al <sup>60</sup> revelaram que tres tipos de enzimas, denominadas "C<sub>1</sub>", "Cx" e  $\beta$ -glucosidase (celobiase), agem sinergisticamente na degradação da celulose nativa <sup>64,77</sup>. Investigações recentes demonstraram que a enzima "C<sub>1</sub>" do Trichoderma viride <sup>8</sup> e Trichoderma koningii são provavelmente  $\beta$ -1,4-glucano celobiosilhidrolase.

No fracionamento do filtrado de cultura do Polyporus circinatus, se observou a presença de no mínimo duas frações com atividade sobre a celobiose e carboximetilcelulose, porém nenhuma das frações apresentava atividade sobre a celulose. Portanto, o componente "C<sub>1</sub>" postulado

por REESE et al<sup>60</sup> não foi detectado no sistema enzimático do fungo.

Na análise do produto de hidrólise da enzima sobre a CM-celulose (figuras 9 e 10), a fração FI revelou desde os primeiros estágios da reação a presença de glucose enquanto que a fração FII apresentou primeiro a celobiose que gradualmente era convertido em glucose, devido a presença de traços de  $\beta$ -glucosidase (FI) na fração FII.

HIRAYANA et al<sup>33</sup> observaram que a  $\beta$ -glucosidase altamente purificada da Pyricularia oryzae, crescida em meio contendo celulose como fonte de carbono, degradava os  $\beta$ -glucooligossacarídeos e  $\beta$ -1,4-glucanos solúveis como a carboximetilcelulose, fornecendo unidades de glucose da parte não redutora. A fração I do P.circinatus está em concordância com a  $\beta$ -glucosidase da P. oryzae, enquanto que a fração FII está de acordo com a  $\beta$ -glucosidase do T.viride. A  $\beta$ -glucosidase do Trichoderma viride<sup>65</sup>, primeiro rompe as unidades de celobiosil dos terminais não redutores das carboximetilcelulose e de oligossacarídeos para depois fornecer a glucose. Contudo, BERGHEM et al<sup>9</sup> verificaram que a  $\beta$ -glucosidase do Trichoderma viride era incapaz de hidrolisar a carboximetilcelulose.

A eletrofocalização das frações FI e FII apresentam como ponto isoelétrico o pH em torno de 3,9 e 11,65 respectivamente. Confirmando os resultados obtidos na eletrofocalização, na análise eletroforética em gel de poliacrilamida das frações, observou-se que na fração FII uma das proteínas permaneceu na origem da coluna de gel devido ao seu ponto isoelétrico ser em torno de 11,65.

AHLGREN et al<sup>1,2</sup> trabalhando com enzimas do Aspergillus niger, Aspergillus oryzae, Stereum sanguinolentum, Fomes annosus e Chrysosporium lignorum, postularam que, com poucas exceções o ponto isoelétrico das enzimas

variavam numa faixa de pH 3,9 a 4,7. A  $\beta$ -1,4-glucano celobiosilhidrolase do Trichoderma viride<sup>10</sup> possuía um alto teor de amino ácidos (21,0%) em contraste com o baixo teor de amino ácidos básicos (5,5%) e este fato era consistente com o baixo ponto isoelétrico da enzima que era em torno de pH 3,79.

Usando-se como substrato a carboximetilcelulose o Km das frações FI e FII do Polyporus circinatus foram de 4,0 g/l e 5,0 g/l respectivamente enquanto que usando a celobiose como substrato o Km foi de  $7,0 \times 10^{-4}$  M para a fração FI e  $1,0 \times 10^{-3}$  para a fração FII.

ALMIN et al<sup>4</sup> verificaram que o Km para os diferentes endo 1,4- $\beta$ -glucanases do Sporotrichium pulverulentum, usando-se CM-celulose como substrato, variava entre 2 a 9 g/l. Outros autores<sup>3,18,28,35</sup> publicaram que os valores de Km para as endo  $\beta$ -1,4-glucanases de diferentes fontes e pureza, usando-se carboximetilcelulose como substrato, variavam de menos de 0,07 g/l a 44 g/l.

SHOEMAKER et al<sup>67</sup> estudando as endoglucanases do Trichoderma viride, observaram que pela análise da sedimentação equilibrada o peso molecular das endoglucanases II, III e IV foram de 37200, 52000 e 49000 respectivamente. HIRAYAMA et al<sup>33</sup> estudando a  $\beta$ -glucosidase da Pyricularia oryzae, observaram que esta enzima possuía um peso molecular de aproximadamente 240000.

O sistema celulásico do Botryodiplodia theobromae Pat. estudado por UMEZURIKE<sup>71</sup> apresentava cinco celulasas cujos pesos moleculares variavam de 4.800 a 48.000 e quatro  $\beta$ -glucosidasas com pesos moleculares entre 45.000 a 380.000. As formas moleculares predominantes de  $\beta$ -glucosidase e celulasas nos filtrados pareciam ser

afetados pela idade das culturas. A celulase com menor peso molecular era a enzima predominante nas culturas jovens porém estava ausente em culturas velhas.

A fração FI estudada possui um peso molecular acima de 264000 enquanto que a fração FII apresenta um peso molecular em torno de 70.000.

Tendo em vista a baixa produção da enzima é a ausência do componente "C<sub>1</sub>" necessária para uma hidrólise mais efetiva da celulose nativa, a possibilidade do uso da enzima produzida pelo fungo produtor de galactose oxidase para fins industriais é muito restrita.

## RESUMO

A enzima celulolítica tem a sua atividade aumentada em presença de determinadas fontes de carbono. A celulose em pó foi a fonte de carbono mais efetiva.

A liberação da enzima, usando-se celulose como fonte de carbono, ocorre a partir do 5º dia e permanece constante por 3 semanas.

O fracionamento do meio de cultura liofilizado em Sephadex G-100 apresentou 2 frações, uma fração com atividade de  $\beta$ -glucosidase e uma fração com atividade de CM-celulase.

A temperatura ótima foi em torno de 40°C a 50°C para ambas as frações e o pH ótimo foi em torno de 5,2 a 5,6 para a fração FI e em torno de pH 4,8 a 5,6 para a fração FII.

A eletrofocalização apresentou como ponto isoelétrico o pH em torno de 3,9 para a fração FI e 11,65 para a fração FII.

Tanto a fração FI e FII são específicas somente para polissacarídeos com exceção da fração FI que tem especificidade também sobre o oligossacarídeo celobiose.

O peso molecular da fração FII foi estimado em torno de 70.000 enquanto que a fração FI apresenta um peso molecular superior a 264.000.

## AGRADECIMENTOS

- Em especial à Dra. KAZUKO HISHIDA DO NASCIMENTO pela orientação e assistência prestadas à execução desta tese.
- À Coordenação do Curso de Pós-Graduação da U.F.Pr.
- Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudo.
- Ao CARLOS KEMMELMEIER pelo incentivo e apoio.
- Ao RAUL C. PECCIOLI FILHO pela execução dos gráficos.
- À FINEP pelo apoio financeiro.
- Aos colegas e amigos que direta ou indiretamente prestaram colaboração.

## BIBLIOGRAFIA

- 1 - AHLGREN, E.; ERICKSSON, K.E.; VESTEBERG, O. Characterization of Cellulases and Related Enzymes by Isoelectric Focusing, Gel filtration and Zone Electrophoresis. Acta Chem. Scand. 21: 937-944; 1967.
- 2 - AHLGREN, E. & ERIKSSON, K.E. Characterization of Cellulases and Related Enzymes by Isoelectric Focusing, Gel filtration and Zone Electrophoresis. Acta Chem. Scand. 21: 1193-1200, 1967.
- 3 - ALMIN, K.E.; ERIKSSON, K.E.; JANSSON, E. Enzyme Degradation of Polymers. Biochem. Biophys. Acta. 139: 248-253, 1967.
- 4 - ALMIN, K.E., ERIKSSON, K.E.; PETTERSSON, B. Extracellular Enzyme System Utilized by the fungus. Sporotrichium pulverulentum (Chrysosporium lignorum) for the Breakdown of Cellulose. Europ J. Biochem. 51: 207 - 211, 1975.
- 5 - AMARAL, D.; KELLY, F.; HORECKER, B.L. Galactose oxidase of Polyporus circinatus. In: Colowick, S.P. ; and Kaplan, N.O. (ed.) - Methods in Enzymology. Vol. IX. New York. Academic Press. 1966. p. 87-92.
- 6 - ANDREWS, P. The Gel Filtration Behaviour of Proteins related to their Molecular Weights over a Wide range Biochem. J. 96: 595-605, 1965.
- 7 - AVIGAD, G.; AMARAL, D.; ASENSIO, C.; HORECKER, B.L. The D-galactose oxidase of Polyporus circinatus. J. Biol. Chem. 237: 2736-2743, 1962.

- 8 - BERGHEM, E.R. & PETERSSON, L.G. The Mechanism of Enzymatic Cellulose Degradation - Europ. J. Biochem. 37: 21-30, 1973.
  
- 9 - BERGHEM, L.E.R. & PETERSSON, L.G. The mechanism of Enzymatic Cellulose Degradation. Europ. J. Biochem. 46: 295-305, 1974.
  
- 10 - BERGHEM, L.E.R.; PETERSSON, G.; AXIÖ-FREDRIKSSON, U. B. The Mechanism of Enzymatic Cellulose Degradation - Europ. J. Biochem. 53: 55-62, 1975.
  
- 11 - BERGHEM, L.E.R.; PETERSSON, L.G.; AXIÖ-FREDRIKSSON, U. The Mechanism of Enzymatic Cellulose Degradation. Europ. J. Biochem. 61: 621-630, 1976.
  
- 12 - BUCHT, B. & ERIKSSON, K.E. Extracellular Enzyme System Utilized by the Rot Fungus Stereum sanguinolentum for the breakdown of Cellulose - Arch. Biochem. Biophys. 124: 135-141, 1968.
  
- 13 - CLARKE, A.E. & STONE, B.A. Properties of a  $\beta$ -(1-4) Glucan Hydrolase from Aspergillus niger. Biochem. J. 96: 802-807, 1965.
  
- 14 - DAHLQVIST, A. A determination of maltase and isomaltase activities with a glucose-oxidase reagent. Biochem. J. 80: 547-51, 1961.
  
- 15 - DAVIS, B.J. Disc electrophoresis. Part. II. Ann. N.Y. Acad. Sci. 121: 404-427, 1964.
  
- 16 - DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A. SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal. Chem. 28: 350-356, 1956.

- 17 - ENZYME NOMENCLATURE - International Union of Biochemistry. Elsevier Publishing Co., Amsterdam, 1972.
- 18 - ERIKSSON, K.E. & HALLMARK, B.H. Kinetic Studies of the Action of Cellulase upon Sodium Carboxymethyl Cellulose. Arch.Biochem.Biophys. 133: 233-237, 1969.
- 19 - ERIKSSON, K.E. & RZEDOWSKI, W. Extracellular enzyme system utilized by the fungus Chrysosporium lignorum for the breakdown of cellulose. Arch. Biochem. Biophys. 129: 683-688, 1969.
- 20 - ERIKSSON, K.E. & RZEDOWSKI, W. Extracellular Enzyme System Utilized by the fungus Chrysosporium lignorum for the breakdown of Cellulose. Arch. Biochem. Biophys. 129:689-695, 1969.
- 21 - ERIKSSON, K.E. & PETTERSSON, B. Extracellular Enzyme System Utilized by the fungus Sporotrichium pulverulentum (Chrysosporium lignorum) for the Breakdown of Cellulose - Europ. J. Biochem. 51: 193-206, 1975.
- 22 - ERIKSEN, J. & GOKSØYR, J. Cellulases from Chaetomium thermophile var. dissitum. Europ. J. Biochem. 77: 445-450, 1977.
- 23 - FAITH, W.T.; NEUBECK, C.E.; REESE, E.T. Production and applications of enzymes. In: Ghose, T.K.; Fiechter, A. Advances in Biochemical Engineering. vol. 1. Berlin. Springer - Verlag. 1971. p. 77-111.
- 24 - GEBARA, MUNIF Degradação enzimática da hemicelulose A. de Mimosa bracinga. Curitiba, 1977. 33 p. Tese de mestrado. Universidade Federal do Paraná.

- 25 - GHOSE, T.K. Cellulase biosynthesis and hydrolysis of cellulosic substances. In: Ghose, T.K.; Fiechter, A.; Blakebrough, N. (ed.). Advances in Biochemical Engineering. Vol. 6 - Berlin. Springer - Verlag. 1977. p. 39-76.
- 26 - GUM, Jr., E.K. & BROWN, R.D. Comparison of four purified extracellular 1,4- $\beta$ -D-Glucan cellobiohydrolase enzymes from Trichoderma viride. Biochem. Biophys. Acta. 492: 225-231, 1977.
- 27 - HÅKANSSON, V.; FÅGERSTAM, L.; PETTERSON, G. & ANDERSSON, L. Purification and Characterization of a low molecular weight 1,4- $\beta$ -Glucan Glucanohydrolase from the Cellulolytic Fungus Trichoderma viride. QM 9414, Biochem. Biophys. Acta. 524: 335-392, 1978.
- 28 - HALLIWELL, G. The Action of Cellulolytic Enzymes from Myrothecium verrucaria - Biochem. J. 79: 185-192, 1961.
- 29 - HALLIWELL, G. Hydrolysis of Fibrous Cotton and Re-precipitated Cellulose by Cellulolytic Enzymes from Soil Micro-Organisms. Biochem. J. 95: 270-281, 1965.
- 30 - HALLIWELL, G. & RIAZ, M. The Formation of Short Fibres from Native Cellulose by Components of Trichoderma koningii Cellulase. Biochem. J. 116: 35-42, 1970.
- 31 - HALLIWELL, G. & GRIFFIN, M. Affinity Chromatography of the Cellulase System of Trichoderma koningii. Biochem. J. 169: 713-715, 1978.
- 32 - HARTIG, R. Die Zersetzungsercheinungen des holzes de madelbäume und der Eiche. 1878. Berlin. In: De-

- can, C.G. - Deterioration of wood by lower fungi. Developments in Industrial Microbiology. New York - SIM, Plenum Press, 1960. p. 147-156.
- 33 - HIRAYAMA, T.; HORIE, S; NAGAYAMA, H. & MATSUDA, K. Studies on Cellulases of a Phytopathogenic Fungus Pyricularia oryzae Cavara. J. Biochem. (Tokyo) 84: 27-37; 1978.
- 34 - HORTON, J.C. & KEEN, N.T. Regulation of Induced Cellulase Synthesis in Pyrenochaeta terrestris Gorenz et al. by Utilizable Carbon Compounds. Can.J.Microbiol. 12: 209-220, 1966.
- 35 - HULME, M.A. Viscosimetric Determination of Carboxymethylcellulase in Standard International Units. Arch. Biochem. Biophys. 147: 49-54, 1971.
- 36 - HURST, P.L.; NIELSON, J.; SULLIVAN, P.A. & SHEPHERD, M.G. Purification and Properties of a Cellulase from Aspergillus niger. Biochem. J. 165: 33-41, 1977.
- 37 - IWASAKI, T.; HAYASHI, K. & FUNATSU, M. Biochemical Studies on Cellulase. J. Biochem. (Tokyo) 57: 467-477, 1965.
- 38 - IKEDA, R.; YAMAMOTO, T.; FUNATSU, M. Purification and some Physical Properties of Acid Cellulase from Aspergillus niger. Agric. Biol. Chem. 37:1153-1159, 1973.
- 39 - JONES, T.H.D., RENOBATES, M.; PON, N. Cellulase Released During the Germination of Dictyostelium discoideum spores. J. Bacteriol 137: 752-757, 1979.

- 40 - KANDA, T.; WAKABAYASHI, K.; & NISIZAWA, K. Purification and Properties of an Endo-Cel lulase of Avicelase Type from Irpex lacteus (Polyporus tulipiferae). J. Biochem (Tokyo) 79:977-988, 1976.
- 41 - KANDA, T.; WAKABAYASHI, K. & NISIZAWA, K. Xylanase Activity of an Endo Cellulase of Carboxymethyl-Cel lulase Type from Irpex lacteus (Poplyporus tulipi-ferae). J. Biochem. (Tokyo) 79:989-995, 1976.
- 42 - KANDA, T.; NAKAKUBO, S.; WAKABAYASHI, K. & NISIZAWA, K. Purification and Properties of an Exo-Cellu- lase of Irpex lacteus (Polyporus tulipiferae) J. Biochem. (Tokyo) 84: 1217-1226, 1978.
- 43 - KEMMELMEIER, C. & ZANCAN, G.T. Studies on the Taxo- nomy of a mold Producing Galactose.-oxidase II. Arg. Biol. Tecnol. 21: 75-85, 1978.
- 44 - KING, N.J. The Extracellular Enzyme of Coniophora cerebella. Biochem. J. 100: 784-800, 1966.
- 45 - LI, L.H.; FLORA, R.M.; KING, K.W. Individual Roles of Cellulase Components Derived from Trichoderma vi ride. Arch. Biochem. Biophys. 111: 439-447, 1965.
- 46 - LOWRY, O.H.; ROSENBROUGH, N.J.; FARR, L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol rea- gent. J. Biol. Chem. 193: 265-275, 1961.
- 47 - MARKUS, Z.; MILLER, G.; AVIGAD, G. Effect of Cultu- re Conditions on the Production of D-Galactose oxi- dase by Dactylum dendroides. Appl. Microbiol. 13: 686-693, 1965.

- 48 - MITCHERLICH, E.      Zusammensetzung der Wand der Pflanzenzelle. Bericht über die zur Bekanntmachung geeigneten Verhandlungen der Königlich-Preussischen Akademie der Wissenschaften zu Berlin. 1850: 102-110. In: Bradley, L.A.; Rettger, L.F. Studies on Aerobic Bacteria Commonly concerned in the Decomposition of Cellulose. J. Bacteriol. 13:321-345, 1927.
- 49 - NAKAYAMA, M.; TOMITA, D.Y.; SUZUKI, H., NISIZAWA, K. Partial Proteolysis of Some Cellulase Components from Trichoderma viride and the Substrate Specificity of the Modified Products. J. Biochem. (Tokyo). 79: 955-966, 1976.
- 50 - NEGRÃO, O.L.      Produção e Caracterização de Glucoamilase de Polyporus circinatus. Curitiba, 1978. 50 p. Tese de Mestrado. Universidade Federal do Paraná.
- 51 - NELSON, N.A.      A Photometric adaptation of the Somogyi Method for the determination of glucose. J. Biochem., 153: 376-380, 1944.
- 52 - NOBLES, M.K. & MADHOSINGH, C.      Dactylium dendroides (Bull.) Fr. Misnamed as Polyporus circinatus Fr. Biochem. Biophys. Res. Comm. 12: 146-147, 1963.
- 53 - NOGUCHI, S.; SHIMURA, G.; KAWAI, M.; SUGA, Y. & SAMEJIMA, H.      Properties of Partially Purified Cellulolytic and Plant Tissue Macerating Enzymes of Irpepex lacteus Fr. in Special reference to their application. Agric. Biol. Chem. 42: 339-345, 1978.
- 54 - OKADA, G.; NISIZAWA, K.; SUZUKI, H.      Cellulase Components from Trichoderma viride. J. Biochem. (Tokyo) 63: 591-607, 1968.

- 55 - OLUTIOLA, P.O. A Cellulase Complex in Culture Filtrates of Penicillium citrinum. Can.J.Microbiol. 22: 1153-1159, 1976.
- 56 - OLUTIOLA, P.O. Cellulolytic Enzyme in Culture Filtrates of Aspergillus Clavatus. J.Gen.Microbiol. 102: 27-31, 1977.
- 57 - PETTERSSON, G.; COWLING, E.B.; PORATH, J. Studies on Cellulolytic Enzymes. Biochem. Biophys. Acta. 67: 1-8, 1963.
- 58 - POPPOFF, L. Über die Sumpfgasgärung - Arch. Gesam. Physiol. 10: 113-146, 1875. In: Bradley, L.A.; Retger, L.F. Studies in Aerobic Bacteria Commonly concerned in the Decomposition of Cellulose - J. Bacteriol. 13: 321-345, 1927.
- 59 - POWER, J.B. & COCKING, E.C. A simple method for the Isolation of Very large numbers of leaf Protoplasts by using Mixtures of Cellulase and Pectinase. Biochem. J. 111: 33 p., 1969.
- 60 - REESE, E.T.; LIU, R.G.U; SEVINSON, H.S. The Biological degradation of soluble Cellulose Derivatives and its relationships to the mechanism of Cellulose hydrolysis. J. Bacteriol. 59: 485-497, 1950.
- 61 - ROESNESS, P.A. Cellulolytic Enzymes During Morphogenesis in Dictyostelium descoideum. J.Bacteriol. 96: 639-645, 1968.
- 62 - SAMPATHNARAJANAN, A. & SHANMUGASUDARAN, E.R.B. Studies on Cellulase of the Cotton Wilt Pathogen Fusarium vasinfectum ATK Mycopathologia e Mycologia applicata 41: 223-232, 1970.

- 63 - SAUNDERS, P.R.; SIU, G.H.; GENEST, R.N. A Cellulolytic Enzyme Preparation from Myrothecium verrucaria. J. Biol. Chem. 174: 697-703, 1948.
- 64 - SELBY, K. & MAITLAND, C.C. The Cellulase of Trichoderma viride. Biochem. J. 104: 706-724, 1967.
- 65 - SHIKATA, S. & NISIZAWA, K. Purification and Properties of an exo-Cellulase Component of Novel Type from Trichoderma viride. J. Biochem. (Tokyo) 78: 499-512, 1975.
- 66 - SHOEMAKER, S.P. & BROWN, Jr., R.D. Enzymic Activities of Endo-1,4- $\beta$ -D-Glucanases purified from Trichoderma viride. Biochem. Biophys. Acta. 523: 146, 1978.
- 67 - SHOEMAKER, S.P. & BROWN, Jr. R.D. Characterization of Endo-1,4- $\beta$ -D-Glucanases Purified from Trichoderma viride. Biochem. Biophys. Acta. 523:147-161, 1978
- 68 - SOMKUTI, G.A.; BABEL, F.J.; SOMBUTI, A. Cellulolysis by Mucor pusillus. Appl. Microbiol. 17: 888-892. 1969.
- 69 - SOMOGYI, M.A. A new reagent for the determination of Sugars. J. Biol. Chem. 160: 61-68, 1945.
- 70 - TREVELYAN, W.E.; PROCTER, D.P.; HARRISON, J.S. Detection of Sugar on paper chromatograms. Nature, 166: 444-445, 1950.
- 71 - UMERIZUKE, G.M. The Cellulolytic Enzymes of Betryodiplodia theobromae Pat. Biochem. J. 177: 9-19, 1979.

- 72 - VESTEBERG, O. Isoelectric focusing of proteins. In: Colowick, S.P.; Kaplan, N.O. Methods in Enzymology Vol. XXII. New York. Academic Press. 1971. p. 389-412.
- 73 - WARBURG, O. & CHRISTIAN, W. Isolierung und Kristallisation des Gärungsferments Enolase. Biochem. Z. 310: 384-421, 1941.
- 74 - WEBER, K. & OSBORN, M. The Reliability of Molecular Weight Determination by Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis. J. Biol.Chem. 244:4406-4412, 1969.
- 75 - WHITAKER, D.R. Purification of Myrothecium verrucaria Cellulase. Arch. Biochem. Biophys. 43: 253-268, 1953.
- 76 - WISEMAN, A, Enzyme utilization in industrial processes. In: Wiseman, A. Handbook of enzyme biotechnology Chichester. Ellis Horwood Ltda. 1975.p.248.
- 77 - WOOD, T.M. Cellulolytic Enzyme System of Trichoderma koningii. Biochem. J. 109: 217-227, 1968.
- 78 - WOOD, T.M.. The Cellulase of Fusarium solani. Biochem. J. 115: 457-464, 1969.
- 79 - WOOD, T.M. The Cellulase of Fusarium solani. Biochem. J. 121: 353-362, 1971.
- 80 - WOOD, T.M. & McCRAE, I. The Purification and Properties of the C<sub>1</sub> Component of Trichoderma Koningii Cellulase. Biochem. J. 128: 1183-1192, 1972.

81 - WOOD, T.M. & McCRAE, S.I. The Cellulase of Trichoderma koningii Biochem. J. 171:61-72, 1978.