

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS  
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS**

Produção de  $\beta$ -1,3-gluconase de *Cellulosimicrobium cellulans* 191  
para lise enzimática da levedura *Kluyveromyces marxianus* var.  
*bulgaricus* e obtenção de  $\beta$ -galactosidase

GISELLE DE ARRUDA RODRIGUES  
Engenheira de Alimentos

Profa. Dra. HÉLIA HARUMI SATO  
Orientadora

Campinas - SP  
2008

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

R618p	<p>Rodrigues, Giselle Arruda Produção de <math>\beta</math>-1,3-glucanase de <i>Cellulosimicrobium cellulans</i> 191 para lise enzimática da levedura <i>Kluyveromyces marxianus</i> var. <i>bulgaricus</i> e obtenção de <math>\beta</math>-galactosidase / Giselle de Arruda Rodrigues. -- Campinas, SP: [s.n.], 2008.</p> <p>Orientador: Hélia Harumi Sato Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos</p> <p>1. Beta-1,3-glucanase. 2. Beta-galactosidade. 3. <i>Kluyveromyces marxianus</i>. 4. Lise de leveduras. I. Sato, Hélia Harumi. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.</p> <p>(cars/fea)</p>
-------	---

Titulo em inglês: Production of beta-1,3-glucanase from *Cellulosimicrobium cellulans* 191 for enzymatic lysis of the yeast *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus* and the production of beta-galactosidade

Palavras-chave em inglês (Keywords): Beta-1,3-glucanase, Beta-galactosidade, *Kluyveromyces marxianus*, Yeast lysis

Titulação: Mestre em Ciência de Alimentos

Banca examinadora: Hélia Harumi Sato

Gabriela Alves de Macedo

Luciana Ferracini dos Santos

Luciana Francisco Fleuri

Programa de Pós Graduação: Programa em Ciência de Alimentos

## **BANCA EXAMINADORA**

Dissertação defendida em        de        de 2008, pela banca examinadora  
constituída pelos professores:

---

*Profa. Dra. Gabriela Alves de Macedo*

---

*Profa. Dra. Luciana Ferracini dos Santos*

---

*Profa. Dra. Luciana Francisco Fleuri*

---

*Profa. Hélia Harumi Sato*  
*Orientadora*

## DEDICATÓRIA

*À minha família:  
Meu esposo, Marcio  
Meus pais, Teresinha e José Antônio  
Meu sobrinho, Caio, luz da minha vida  
Minhas irmãs, Cris e Carol  
Meus sogros, Alício e Dimas*

Dedico.

*“Porque onde estiver o vosso tesouro, aí estará também o vosso coração.”  
(Mateus 6:21)*

## AGRADECIMENTO

À querida Profa. *Hélia*,  
pela confiança, carinho, dedicação, paciência, solicitude e amizade incondicionais.

***“Sábio não é aquele que proclama palavras de sabedoria, mas sim aquele que demonstra sabedoria em seus atos.”(São Gregório)***

A todos os amigos dos Laboratórios de Bioquímica de Alimentos, Bioaromas, Engenharia, Engenharia Química, Fisiologia Vegetal e outros tantos que fiz por aqui: *Haroldo, Joelise, Vânia, Janai, Gaby, Juliana, Fran, Marcela, Laira, Val, Bia, Priscila Becker, Alexandre, Priscila Hoffman, Márcio, Luciana, Fabiano, Carol, Lígia, Nádia, Dani Branta, Dani Orsi, Kaori, Ana Carla, Patrícia Schons, Patrícia Fort, Andréas, Andréa, Tati Pio, Marcos, Geraldo, Andréa Limoeiro, Aline Pires, Dora, Nadir, Fifa, Angélica, Mari, Jane, Hellen, Maria José e Fernanda, Gilberto, Jullyana, Milton e Marcela, Igor, Tati Ramos.*

***“A amizade é um amor que nunca morre.”***  
***(Mário Quintana)***

Aos professores da Banca, pelas sugestões e comprometimento.  
Ao Prof. *Ladaslav Sodek* do Instituto de Biologia, pelos ensinamentos.  
Ao Prof. *Marcelo Alexandre Prado*, pelos conselhos e amizade.  
À querida *D. Brígida* e sua família, que nos acolheu como filhos em Campinas.

A *DEUS*, por tudo.

## ÍNDICE GERAL

1	Introdução .....	1
2	Revisão Bibliográfica .....	3
2.1	Estrutura da parede celular de leveduras .....	3
2.2	Lise da parede celular de leveduras .....	5
2.3	Produção e características da $\beta$ -1,3-glucanase lítica .....	8
2.4	Produção e aplicação da $\beta$ -galactosidase .....	11
2.5	Características da $\beta$ -galactosidase produzida por alguns microrganismos .....	15
3	Material e Métodos .....	22
3.1	Microrganismos utilizados e manutenção .....	22
3.1.1	Microrganismo que lisa levedura .....	22
3.1.2	Microrganismos produtores de $\beta$ -galactosidase .....	22
3.2	Determinação das atividades enzimáticas .....	23
3.2.1	Determinação da atividade de $\beta$ -1,3-glucanase .....	23
3.2.2	Determinação da atividade de protease .....	23
3.2.3	Determinação da atividade de $\beta$ -galactosidase .....	24
3.2.3.1	Determinação da atividade da $\beta$ -galactosidase utilizando o substrato lactose .....	24
3.2.3.2	Determinação da atividade da $\beta$ -galactosidase utilizando o substrato ONPG .....	24
3.2.4	Determinação da atividade de liticase da $\beta$ -1,3-glucanase .....	24
3.2.4.1	Produção de massa celular da levedura <i>Kluyveromyces marxianus</i> var. <i>bulgaricus</i> .....	24
3.2.4.2	Padronização da suspensão da levedura <i>Kluyveromyces marxianus</i> var. <i>bulgaricus</i> para determinação da atividade de liticase .....	25
3.2.4.3	Determinação da atividade de liticase da $\beta$ -1,3-glucanase .....	25
3.3	Seleção da levedura melhor produtora de $\beta$ -galactosidase .....	26
3.3.1	Produção de massa celular da levedura <i>Kluyveromyces</i> sp. .....	26
3.3.2	Padronização da suspensão da levedura <i>Kluyveromyces</i> sp. .....	26
3.3.3	Lise das leveduras <i>Kluyveromyces</i> sp. e determinação da atividade de $\beta$ -galactosidase .....	26

3.4	Produção de $\beta$ -1,3-glukanase pela linhagem <i>Cellulosimicrobium cellulans</i> 191 .....	27
3.4.1	Produção de $\beta$ -1,3-glukanase em frascos agitados .....	27
3.4.2	Produção de $\beta$ -1,3-glukanase em fermentador de 5L .....	27
3.5	Concentração da preparação enzimática bruta de $\beta$ -1,3-glukanase .....	28
3.5.1	Concentração da $\beta$ -1,3-glukanase por liofilização .....	28
3.5.2	Concentração da $\beta$ -1,3-glukanase por ultrafiltração .....	28
3.5.3	Concentração da $\beta$ -1,3-glukanase por fracionamento com sulfato de amônio .....	28
3.5.4	Concentração da $\beta$ -1,3-glukanase em tubos de diálise utilizando adsorventes .....	29
3.5.5	Concentração da $\beta$ -1,3-glukanase com os solventes orgânicos acetona e etanol.....	29
3.6	Purificação parcial da $\beta$ -1,3-glukanase.....	30
3.6.1	Fracionamento da $\beta$ -1,3-glukanase com sulfato de amônio 30% e dessalinização em coluna Sephadex PD10 .....	30
3.6.2	Purificação da $\beta$ -1,3-glukanase em coluna DEAE-Sephacel® .....	30
3.7	Estudo da influência de diferentes compostos na estabilidade da $\beta$ -1,3-glukanase a 45°C, 50°C e 55°C .....	31
3.8	Extração da $\beta$ -galactosidase intracelular de <i>Kluyveromyces marxianus</i> var. <i>bulgaricus</i> por diferentes métodos.....	31
3.8.1	Extração da $\beta$ -galactosidase intracelular de <i>Kluyveromyces marxianus</i> var. <i>bulgaricus</i> por permeabilização com solventes orgânicos .....	32
3.8.2	Extração da $\beta$ -galactosidase intracelular de <i>Kluyveromyces marxianus</i> var. <i>bulgaricus</i> utilizando-se $\beta$ -1,3-glukanase de <i>Cellulosimicrobium cellulans</i> 191 .....	32
3.8.3	Extração da $\beta$ -galactosidase intracelular de <i>Kluyveromyces marxianus</i> var. <i>bulgaricus</i> por ultrasonicação utilizando-se tratamento preliminar das leveduras com $\beta$ -1,3-glukanase de <i>Cellulosimicrobium cellulans</i> 191.....	32
3.9	Aplicação da $\beta$ -1,3-glukanase bruta e purificada na lise da levedura <i>Kluyveromyces marxianus</i> var. <i>bulgaricus</i> e formação de protoplasto .....	33
3.10	Estudo da influência da temperatura e do pH na atividade e estabilidade da $\beta$ -galactosidase da preparação enzimática bruta de <i>Kluyveromyces marxianus</i> var. <i>bulgaricus</i> .....	34
3.10.1	Determinação da temperatura ótima e pH ótimo de atividade da $\beta$ -galactosidase bruta através de planejamento experimental .....	34
3.10.2	Determinação do pH e da temperatura de estabilidade da $\beta$ -galactosidase.....	35

3.11	Produção e purificação da $\beta$ -galactosidase de <i>Kluyveromyces marxianus</i> var. <i>bulgaricus</i> .....	35
3.11.1	Produção de $\beta$ -galactosidase de <i>Kluyveromyces marxianus</i> var. <i>bulgaricus</i> .....	35
3.11.2	Fracionamento da $\beta$ -galactosidase com sulfato de amônio 60% .....	36
3.11.3	Purificação da $\beta$ -galactosidase em coluna DEAE-Sephacel® .....	36
4	Resultados e Discussão .....	37
4.1	Seleção da levedura melhor produtora de $\beta$ -galactosidase .....	37
4.2	Produção de $\beta$ -1,3-glucanase pela linhagem <i>Cellulosimicrobium cellulans</i> 191 .....	38
4.2.1	Produção de $\beta$ -1,3-glucanase em frascos agitados .....	38
4.2.2	Produção de $\beta$ -1,3-glucanase em fermentador de 5L .....	39
4.3	Concentração da $\beta$ -1,3-glucanase de <i>Cellulosimicrobium cellulans</i> 191 .....	40
4.3.1	Concentração da $\beta$ -1,3-glucanase por liofilização .....	40
4.3.2	Concentração da $\beta$ -1,3-glucanase por ultrafiltração .....	41
4.3.3	Concentração da $\beta$ -1,3-glucanase por fracionamento com sulfato de amônio .....	43
4.3.4	Concentração da $\beta$ -1,3-glucanase em tubos de diálise utilizando adsorventes .....	45
4.3.5	Concentração da $\beta$ -1,3-glucanase com os solventes orgânicos acetona e etanol .....	47
4.4	Purificação da $\beta$ -1,3-glucanase .....	48
4.4.1	Fracionamento da preparação enzimática bruta de <i>Cellulosimicrobium cellulans</i> 191 com sulfato de amônio 30% e dessalinização em coluna Sephadex PD10 .....	48
4.4.2	Purificação da $\beta$ -1,3-glucanase em coluna DEAE-Sephacel® .....	48
4.5	Estudo da influência de diferentes compostos na estabilidade da $\beta$ -1,3-glucanase a 45°C, 50°C e 55°C .....	54
4.6	Extração da $\beta$ -galactosidase intracelular de <i>Kluyveromyces marxianus</i> var. <i>bulgaricus</i> por diferentes métodos .....	56
4.6.1	Extração da $\beta$ -galactosidase intracelular de <i>Kluyveromyces marxianus</i> var. <i>bulgaricus</i> por permeabilização com solventes orgânicos .....	56
4.6.2	Extração da $\beta$ -galactosidase intracelular de <i>Kluyveromyces marxianus</i> var. <i>bulgaricus</i> utilizando-se $\beta$ -1,3-glucanase de <i>Cellulosimicrobium cellulans</i> 191 .....	58



4.6.3	Extração da $\beta$ -galactosidase intracelular de <i>Kluyveromyces marxianus</i> var. <i>bulgaricus</i> por ultrasonicação utilizando-se tratamento preliminar das leveduras com $\beta$ -1,3-glucanase de <i>Cellulosimicrobium cellulans</i> 191.....	59
4.7	Aplicação da $\beta$ -1,3-glucanase na formação de protoplasto e lise da levedura <i>Kluyveromyces marxianus</i> var. <i>bulgaricus</i> .....	62
4.8	Estudo da influência da temperatura e do pH na atividade e estabilidade da $\beta$ -galactosidase de <i>Kluyveromyces marxianus</i> var. <i>bulgaricus</i> .....	69
4.8.1	Determinação do pH e temperatura ótima de atividade da preparação enzimática bruta de $\beta$ -galactosidase através de planejamento experimental.....	69
4.8.2	Determinação da temperatura e do pH de estabilidade da $\beta$ -galactosidase.....	74
4.9	Purificação da $\beta$ -galactosidase de <i>Kluyveromyces marxianus</i> var. <i>bulgaricus</i> .....	76
5	Conclusões.....	80
6	Referências Bibliográficas.....	83
7	Anexos.....	95

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Produção de $\beta$ -galactosidase por diferentes linhagens de leveduras do gênero <i>Kluyveromyces</i> .....	37
Tabela 2. Produção de $\beta$ -1,3-glucanase e protease pela linhagem <i>Cellulosimicrobium cellulans</i> 191 em frascos agitados e em fermentador. ....	39
Tabela 3. Concentração da preparação enzimática bruta produzida pela linhagem <i>Cellulosimicrobium cellulans</i> 191 por liofilização. ....	41
Tabela 4. Concentração da preparação enzimática bruta produzida pela linhagem <i>Cellulosimicrobium cellulans</i> 191 por ultrafiltração .....	42
Tabela 5. Concentração da preparação enzimática bruta de $\beta$ -1,3-glucanase por fracionamento sucessivo com sulfato de amônio seguido de diálise. ....	43
Tabela 6. Concentração da preparação enzimática bruta de $\beta$ -1,3-glucanase por fracionamento sucessivo com sulfato de amônio sem diálise. ....	44
Tabela 7. Concentração da $\beta$ -1,3-glucanase da preparação enzimática bruta produzida por <i>Cellulosimicrobium cellulans</i> 191 utilizando-se tubos de diálise e diferentes polímeros para a adsorção de água. ....	46
Tabela 8. Concentração da protease da preparação enzimática bruta produzida por <i>Cellulosimicrobium cellulans</i> 191 utilizando-se tubos de diálise e diferentes polímeros para a adsorção de água. ....	46
Tabela 9. Concentração da $\beta$ -1,3-glucanase e protease da preparação enzimática bruta produzida por <i>Cellulosimicrobium cellulans</i> 191 utilizando-se os solventes orgânicos acetona e etanol. ....	48
Tabela 10. Purificação da $\beta$ -1,3 glucanase de <i>Cellulosimicrobium cellulans</i> 191. ....	49
Tabela 11. Purificação da protease de <i>Cellulosimicrobium cellulans</i> 191. ....	50
Tabela 12. Extração da $\beta$ -galactosidase intracelular de <i>Kluyveromyces marxianus</i> var. <i>bulgaricus</i> utilizando-se $\beta$ -1,3-glucanase de <i>Cellulosimicrobium cellulans</i> 191 e tratamento com ultrasonicador. ....	60
Tabela 13. Planejamento fatorial composto central $2^2$ codificado para o estudo do efeito do pH e temperatura na atividade da $\beta$ -galactosidase bruta da levedura <i>Kluyveromyces marxianus</i> var. <i>bulgaricus</i> .....	70
Tabela 14. Valores decodificados utilizados no planejamento fatorial composto central $2^2$ para estudo do efeito do pH e temperatura na atividade da $\beta$ -galactosidase bruta da levedura <i>Kluyveromyces marxianus</i> var. <i>bulgaricus</i> .....	70
Tabela 15. Análise dos efeitos principais e interação das variáveis temperatura e pH na atividade da $\beta$ -galactosidase bruta da levedura <i>Kluyveromyces marxianus</i> var. <i>bulgaricus</i> . ....	71

Tabela 16. Análise de variância no estudo do efeito das variáveis pH e temperatura na atividade da $\beta$ -galactosidase bruta da levedura <i>Kluyveromyces marxianus</i> var. <i>bulgaricus</i> .....	72
Tabela 17. Purificação da enzima $\beta$ -galactosidase produzida pelo microrganismo <i>Kluyveromyces marxianus</i> var. <i>bulgaricus</i> . .....	77

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Purificação da $\beta$ -1,3-glucanase de <i>Cellulosimicrobium cellulans</i> 191 em coluna DEAE-Sephacel® .....	49
Figura 2. Influência de diferentes compostos na estabilidade da $\beta$ -1,3-glucanase após tratamento a 45°C, 50°C e 55°C .....	54
Figura 3. Influência de diferentes concentrações de cisteína na estabilidade da $\beta$ -1,3-glucanase da preparação enzimática bruta durante tratamento a 45°C, 50°C e 55°C.....	55
Figura 4. Extração da $\beta$ -galactosidase intracelular de <i>Kluyveromyces marxianus</i> var. <i>bulgaricus</i> utilizando-se diferentes concentrações dos solventes orgânicos tolueno e etanol. ....	57
Figura 5. Aplicação de diferentes preparações enzimáticas de $\beta$ -1,3-glucanase para a formação de protoplastos de <i>Kluyveromyces marxianus</i> var. <i>bulgaricus</i> .....	63
Figura 6. Efeito do $\beta$ -mercaptoetanol na formação de protoplastos da levedura <i>Kluyveromyces marxianus</i> var. <i>bulgaricus</i> utilizando-se preparação purificada de $\beta$ -1,3-glucanase de <i>Cellulomonas cellulans</i> 191.....	64
Figura 7. Sequência de lise dos protoplastos de células da levedura <i>Kluyveromyces marxianus</i> var. <i>bulgaricus</i> após a adição de água destilada ao meio.....	67
Figura 8. Superfície de resposta e curva de contorno para estudo do efeito do pH e da temperatura na atividade da $\beta$ -galactosidase da linhagem <i>Kluyveromyces marxianus</i> var. <i>bulgaricus</i> .....	73
Figura 9. Efeito da temperatura na estabilidade da $\beta$ -galactosidase bruta da linhagem <i>Kluyveromyces marxianus</i> var. <i>bulgaricus</i> .....	74
Figura 10. Efeito do pH na estabilidade da $\beta$ -galactosidase bruta da linhagem <i>Kluyveromyces marxianus</i> var. <i>bulgaricus</i> .....	75
Figura 11. Purificação da $\beta$ -galactosidase de <i>Kluyveromyces marxianus</i> var. <i>bulgaricus</i> em coluna DEAE-Sephacel® em FPLC. ....	77

## QUADROS

Quadro 1. Características da $\beta$ -galactosidase de alguns microrganismos .....	15
--	----

## RESUMO

A enzima  $\beta$ -1,3-glucanase da bactéria *Cellulosimicrobium cellulans* 191 é capaz de lisar a parede celular de diversas leveduras dentre elas as linhagens de *Kluyveromyces* sp., produtoras da enzima intracelular  $\beta$ -galactosidase.

Este trabalho visou a produção de  $\beta$ -1,3-glucanase lítica de *Cellulosimicrobium cellulans* 191 para obtenção das preparações enzimáticas bruta concentrada e purificada com alta atividade lítica para aplicação na obtenção de protoplastos de leveduras e lise das células de *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus* para extração de  $\beta$ -galactosidase.

A  $\beta$ -1,3-glucanase extracelular foi produzida pela bactéria *Cellulosimicrobium cellulans* 191 em meio otimizado composto de 10g/L de parede celular de levedura, 2,0g/L de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; 0,2g/L de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  em tampão fosfato 0,2M, pH 7,5 como descrito por SCOTT e SCHEKMAN (1980) e modificado por SOARES (2002). Foi obtida maior produção da  $\beta$ -1,3-glucanase na fermentação do microrganismo em frascos aletados a 30°C, 200rpm por 24 horas do que em fermentador contendo o mesmo meio a 30°C, 1,5vvm por 24 horas, obtendo-se 0,724 e 0,351U/mL, respectivamente. Os sobrenadantes dos meios fermentados em frascos agitados e em fermentador de 5L apresentaram atividade de 0,120 e 0,064U/mL de protease, respectivamente.

Foi estudada a influência dos compostos sacarose (10mM), lactose (10mM), maltose (10mM), glicerol (10mM), gelatina (125mg/mL), albumina de ovo (125mg/mL), sulfato de amônio (10mM), EDTA (10mM),  $\beta$ -mercaptoetanol (10mM) e cisteína (10mM) na preservação da atividade de  $\beta$ -1,3-glucanase da preparação enzimática bruta a 45°C, 50°C e 55°C, no entanto, nenhum dos compostos testados aumentou a estabilidade da enzima.

Foi testada a concentração da preparação enzimática bruta de  $\beta$ -1,3-glucanase por liofilização, ultrafiltração, fracionamento com sulfato de amônio, pela remoção de água com carboximetilcelulose (CMC) e precipitação com os solventes orgânicos acetona e etanol. A concentração da preparação enzimática bruta de  $\beta$ -1,3-glucanase utilizando-se sacos de diálise e CMC em pó para a adsorção da água mostrou-se como o método mais

eficiente, sendo que a enzima foi concentrada 6,38 vezes com manutenção de 96% da atividade inicial. A preparação enzimática bruta de  $\beta$ -1,3-gluconase foi purificada aproximadamente 2 vezes por fracionamento com sulfato de amônio 30% de saturação.

A  $\beta$ -1,3-gluconase da preparação enzimática bruta foi purificada aproximadamente 6,66 vezes através de fracionamento com sulfato de amônio a 30% de saturação, dessalinização em coluna de exclusão Sephadex PD10 e cromatografia em coluna de troca iônica DEAE-Sephacel<sup>®</sup>, com rendimento de 18%.

Dentre as linhagens das leveduras *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus*, *Kluyveromyces marxianus* var. *lactis*, *Kluyveromyces drosophilarium*, *Kluyveromyces marxianus* NRRL7571, *Kluyveromyces marxianus* NRRL1196, a primeira foi selecionada como maior produtora da enzima  $\beta$ -galactosidase.

As preparações enzimáticas bruta concentrada e purificada de  $\beta$ -1,3-gluconase apresentaram capacidade de lisar as células de *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus* a 37°C. Para a formação de protoplastos foi utilizado 0,1U de  $\beta$ -1,3-gluconase por mL de suspensão de levedura equivalente a 1,3mg de massa celular seca, durante 1 hora a 37°C.

A extração da  $\beta$ -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus* foi testada pelos métodos químico (solventes orgânicos), enzimático ( $\beta$ -1,3-gluconase) e físico (ultrasonicação). O método de pré-tratamento enzimático e posterior aplicação de ultrasonicação apresentou melhores resultados seguido pelos métodos de permeabilização com etanol 50%,  $\beta$ -1,3-gluconase purificada, ultrasonicação, permeabilização com tolueno 20% e  $\beta$ -1,3-gluconase bruta, obtendo-se, respectivamente, atividades de  $\beta$ -galactosidase (massa celular seca) iguais a 25,13U/mg/min; 14,00U/mg/min; 13,11U/mg/min; 10,95U/mg/min; 10,75U/mg/min e 7,25U/mg/min utilizando-se lactose como substrato.

A  $\beta$ -galactosidase bruta apresentou atividade ótima em pH 7,0 e 32°C e mostrou-se estável na faixa de 30 a 35°C após 3 horas em pH 7,0 e na faixa de pH entre 6,5 e 7,5 após 3 horas a 35°C.

A  $\beta$ -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus* foi purificada 2,3 vezes após fracionamento com sulfato de amônio a 60% de saturação, diálise e cromatografia em coluna de troca iônica DEAE-Sephacel<sup>®</sup>, com rendimento de 31%.

As preparações enzimáticas bruta e purificada da  $\beta$ -glucanase lítica da bactéria *Cellulosimicrobium cellulans* podem ser utilizadas na obtenção de protoplastos de leveduras e extração de enzimas intracelulares de leveduras.

## SUMMARY

The enzyme  $\beta$ -1,3-glucanase from the bacteria *Cellulosimicrobium cellulans* 191 is capable of lysing the cell wall of various yeasts including strains of *Kluyveromyces* sp., producers of the intracellular enzyme  $\beta$ -galactosidase.

This work aimed to produce lytic  $\beta$ -1,3-glucanase from *Cellulosimicrobium cellulans* 191 in order to obtain crude, concentrated and purified enzyme preparations with high lytic activity, for application in the obtaining of yeast protoplasts and in the lysis of *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus* to extract  $\beta$ -galactosidase.

Extracellular  $\beta$ -1,3-glucanase was produced by the bacteria *Cellulosimicrobium cellulans* 191 in an optimised culture medium composed of 10g/L yeast cell wall, 2.0g/L  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  and 0.2g/L  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  in 0.2M phosphate buffer, pH 7.5. The production of  $\beta$ -1,3-glucanase from the microorganism was greater in flasks with flaps incubated at 30°C and 200rpm for 24 hours than in a fermenter containing the same medium and incubated at 30°C and 1.5vvm for 24 hours, obtaining yields of 0.724U/mL and 0.351U/mL, respectively. The supernatants from the media fermented in the shaken flasks and in the 5L fermenter presented protease activities of 0.120U/mL and 0.064U/mL, respectively.

The influences of sucrose (10mM), lactose (10mM), maltose (10mM), glycerol (10mM), gelatine (125mg/mL), egg albumin (125mg/mL), ammonium sulphate (10mM), EDTA (10mM),  $\beta$ -mercaptoethanol (10mM) and cysteine (10mM) in the preservation of the  $\beta$ -1,3-glucanase activity of the crude enzyme preparation at 45°C, 50°C and 55°C, were studied, but none of the compounds tested increased the stability of the enzyme.

Concentration of the crude  $\beta$ -1,3-glucanase preparation was tested using freeze drying, ultrafiltration, ammonium sulphate fractionation, by the removal of water using carboxymethylcellulose (CMC) and by precipitation with the organic solvents acetone and ethanol. Concentration of the crude  $\beta$ -1,3-glucanase preparation using dialysis bags and powdered CMC to adsorb the water was shown to be the most efficient method, the enzyme being concentrated 6.38 times with 96% maintenance of the initial activity. The crude  $\beta$ -



1,3-glucanase preparation was purified about two-fold by ammonium sulphate fractionation at 30% saturation.

The  $\beta$ -1,3-glucanase of the crude enzyme preparation was purified about 6.66 times using ammonium sulphate fractionation at 30% saturation, desalting in a Sephadex PD10 exclusion column and ion exchange column chromatography using DEAE-Sephacel<sup>®</sup>, with an 18% yield.

Of the following yeast strains, *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus*, *Kluyveromyces marxianus* var. *lactis*, *Kluyveromyces drosophilarium*, *Kluyveromyces marxianus* NRRL7571 and *Kluyveromyces marxianus* NRRL1196, the first one was selected as the greatest producer of the enzyme  $\beta$ -galactosidase.

The crude, concentrated and purified  $\beta$ -1,3-glucanase preparations were capable of lysing the cells of *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus* at 35°C. In order to form protoplasts a  $\beta$ -1,3-glucanase preparation with 0.1U activity was used per mL yeast suspension equivalent to 1.3mg dry cell mass, for 1 hour at 35°C.

Physical (ultrasound), chemical (organic solvents) and enzymatic ( $\beta$ -1,3-glucanase) methods were tested for their efficiency in extracting  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus*. The method using an enzymatic pre-treatment followed by the application of ultrasound gave the best results, followed by methods of permeabilization by ethanol 50%, purified  $\beta$ -1,3-glucanase, ultrasonication, toluene 20% and crude  $\beta$ -1,3-glucanase, obtaining  $\beta$ -galactosidase activities (dry cell mass) of, respectively, 25.13U/mg/min, 14.00U/mg/min, 13.11U/mg/min, 10.95U/mg/min, 10.75U/mg/min and 7.25U/mg/min using lactose as the substrate.

The crude  $\beta$ -galactosidase preparation showed optimum activity at pH 7.0 and 32°C and was stable in the range from 30-35°C after 3 hours at pH 7.0 and between pH 6.5 and 7.5 after 3 hours at 35°C.

The  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus* was purified 2.3 fold after ammonium sulphate fractionation at 60% saturation, dialysis and ion exchange column chromatography on DEAE-Sephacel<sup>®</sup>, with a 31% yield.

The crude and purified lytic  $\beta$ -glucanase preparations of *Cellulosimicrobium cellulans* bacteria can be used to obtaining yeast protoplasts and extraction of intracellular enzymes of yeasts.

## 1 INTRODUÇÃO

A parede celular de leveduras tem sido descrita como uma das paredes mais resistentes e rígidas de todos os microrganismos; composta por uma estrutura complexa, formada por vários biopolímeros (HUNTER e ASENJO, 1988), dentre eles glucanas, proteínas, mananas e pequena quantidade de quitina (PHAFF, 1971). A parede celular de leveduras possui função de proteção física, manutenção da estabilidade osmótica, suporte para enzimas, ligantes de compostos, adesão célula-célula, permeabilidade como barreira seletiva (STRATFORD, 1994) e força mecânica (KLIS, 1994).

As enzimas que lisam a parede celular de levedura tem inúmeras aplicações como, por exemplo, na preparação de protoplastos, obtenção de enzimas intracelulares, lise de leveduras patogênicas e extração de pigmentos, glucanas e ácidos nucléicos.

A linhagem de *Cellulosimicrobium cellulans* 191 produz as enzimas  $\beta$ -1,3-glucanase, protease e quitinase que lisam, respectivamente,  $\beta$ -glucana, mananaproteínas e quitina da parede celular de leveduras. A  $\beta$ -1,3-glucanase purificada (45 kDa) de *C. cellulans* 191 é capaz de romper a parede celular de inúmeras leveduras como *Saccharomyces cerevisiae* KL 88, *Saccharomyces capensis*, *Kluyveromyces drosophilum*, *Candida glabrata*, *Debaromyces vanriji*, *Hansenula mrakki* e *Pichia membranaefaciens* (FLEURI, 2006). A protease purificada (55 kDa) de *C. cellulans* 191 também atua na lise da parede celular de leveduras. A  $\beta$ -1,3-glucanase pode ser produzida em meio otimizado contendo compostos de baixo custo, parede celular de levedura comercial e sais (FLEURI, 2006), enquanto a protease lítica pode ser produzida em meio de cultivo otimizado contendo levedura seca e sais (SANTOS, 2004).

Os principais componentes dos sistemas líticos capazes de romper células de leveduras são as enzimas  $\beta$ -1,3-glucanase, proteases e quitinases (HUNTER e ASENJO, 1988). No entanto, KITAMURA *et al.* (1974), SAEKI *et al.* (1994) e FERRO (2002) verificaram que a enzima  $\beta$ -1,3-glucanase possuía uma alta afinidade pela glucana de levedura e foi capaz, sozinha, de lisar células viáveis de leveduras sem a necessidade de um segundo componente lítico, a protease alcalina. Mais recentemente, FLEURI (2006),

verificou que a  $\beta$ -1,3-glucanase de *Cellulosimicrobium cellulans* 191 era capaz de lisar células de *Saccharomyces cerevisiae*, sem a necessidade de protease.

As enzimas líticas, além de serem uma ferramenta para estudos de composição de parede celular de leveduras possuem um grande potencial de aplicação para o rompimento controlado e seletivo da parede celular de leveduras (ANDREWS e ASENJO, 1987). Podem ser utilizadas como reagentes no preparo de protoplastos de leveduras (HUNTER e ASENJO, 1988). São essenciais na fusão de células e na engenharia genética (KITAMURA, 1982) e podem ser utilizadas na produção de extrato de levedura para ração animal, proteína de levedura de grau alimentício e carboidratos funcionais de parede celular (RYAN e WARD, 1988). As enzimas líticas também podem ser usadas no controle de microrganismos patogênicos como a *Candida albicans* (MOLINA *et al.*, 1989). Além de serem utilizadas na extração de enzimas ou como pré-tratamento para ruptura mecânica da célula para aumentar a eficiência e diminuir o requerimento de energia (HUNTER e ASENJO, 1988).

Dentre algumas enzimas de interesse tecnológico, a  $\beta$ -galactosidase se destaca pela capacidade de hidrolisar a lactose em glicose e galactose, o que permite a produção de alimentos com baixo teor deste dissacarídeo beneficiando pessoas que possuem intolerância à lactose. Produtos lácteos com baixo teor de lactose, contendo 70% ou mais deste açúcar hidrolisado pela enzima  $\beta$ -galactosidase de leveduras ou fungos, têm sido largamente aceitos para aliviar os sintomas da intolerância à lactose, cuja condição limita a ingestão diária de alimentos lácteos por grandes segmentos da população mundial. Medidas alternativas recentemente propostas para preparação de leite e derivados para indivíduos com a intolerância à lactose incluem a suplementação do leite com culturas lácticas, tratamento do leite com células de leveduras sonicadas ou permeabilizadas como fonte de  $\beta$ -galactosidase ou o uso dessa enzima para hidrolisar a lactose em leite estocado em condições de refrigeração (SOMKUTI e HOLSINGER, 1997).

Este trabalho visou a produção de preparações bruta concentrada e purificada de  $\beta$ -1,3-glucanase de *Cellulosimicrobium cellulans* 191 para preparação de protoplastos de *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus*, lise da levedura e extração da  $\beta$ -galactosidase.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Estrutura da parede celular de leveduras

A parede celular de leveduras é uma estrutura extremamente dinâmica, e é responsável pela proteção da célula contra rápidas mudanças no potencial osmótico externo (KOLLAR *et al.*, 1997; LIPKE e OVALLE, 1998).

A parede celular da levedura é organizada em duas camadas compostas por quatro macromoléculas principais: mananaproteína,  $\beta$ -1,3-glucana,  $\beta$ -1,6-glucana e quitina; compreendendo de 20 a 30% da massa seca da levedura (VALENTIN *et al.*, 1987; KIM e YUN, 2006).

As glucanas são componentes essenciais, responsáveis pela força mecânica, forma e elasticidade da parede celular de leveduras. O complexo  $\beta$ -1,3-glucana-quitina é o maior constituinte da parede interna e estrutura fibrosa da parede. Na superfície externa da parede celular estão as mananaproteínas, as quais são arranjadas densamente e são responsáveis pela permeabilidade a solutos. As ligações de  $\beta$ -1,6-glucana unem os componentes externos e internos da parede. E todos estes componentes são ligados covalentemente em forma de complexos macromoleculares, os quais são organizados em módulos unitários ao redor da molécula de  $\beta$ -1,3-glucana. A quitina encontra-se em menor quantidade e suas cadeias estão ligadas a  $\beta$ -1,3 e  $\beta$ -1,6-glucanas. Os componentes são ligados por interações não covalentes na camada glucana-quitina e ligações cruzadas covalentes na camada de mananaproteína, incluindo pontes dissulfeto entre essas moléculas (SALAZAR e ASENJO, 2007).

A parede celular da levedura *Saccharomyces cerevisiae* é uma estrutura complexa de polissacarídeos formada por glucana, um polímero de  $\beta$ -1,3 e  $\beta$ -1,6 glicose (48-60%); mananaproteínas (20-23%); pequena quantidade de quitina um polímero de  $\beta$ -1,4-N-acetilglicosamina (0,6-2,7%) (FLEET, 1985; HARTLAND *et al.*, 1994; KLIS, 1994), fosfato, lipídios e proteínas (BACON *et al.*, 1966; MANNERS *et al.*, 1973).

A camada externa da parede celular de levedura é composta de mananaproteínas ligadas covalentemente às cadeias de  $\beta$ -1,6-glucana e corresponde a aproximadamente 30% da massa seca da parede celular (MACWILLIAM, 1970). A camada interna é composta de

$\beta$ -1,3-glucana e compreende aproximadamente 50-60% da massa seca da parede celular (SUPHANTAKIRA *et al.*, 2003).

As mananoproteínas são responsáveis pela proteção da célula contra danos externos e pela porosidade da parede celular (BACON *et al.*, 1970). Já a camada de glucana é responsável pela integridade estrutural da parede celular perante choques mecânicos e desequilíbrio osmótico (ZLOTNIK *et al.*, 1984).

A  $\beta$ -1,3-glucana é composta por moléculas lineares de cerca de 1500 resíduos de glicose, dos quais 40 a 50 resíduos estão envolvidos em ligações através do carbono C-6 com moléculas de  $\beta$ -1,6-glucana e quitina (KAPTEYN *et al.*, 1999).

As glucanas representam de 50 a 60% da parede celular da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, e além da glicose, contém traços de manose e nitrogênio. Análises estruturais revelaram a presença de 80 a 85% de ligações do tipo  $\beta$ -1,3; 8 a 12% de ligações  $\beta$ -1,6 e 3-4% cadeias laterais unidas por ligações tipo C1, C2 e C3. A massa molecular da glucana foi estimada em 250 kDa (FLEET e MANNERS, 1976).

A camada de glucana não é quimicamente uniforme e sua estrutura física é anisotrópica, composta de duas frações. Uma principal, álcali insolúvel, formada por ligações  $\beta$ -1,3 com ramificações de monômeros ligados por ligações  $\beta$ -1,6 (3-6%). Observações ao microscópio mostraram que esta é agregada a microfibrilas voltadas para o interior da superfície da parede celular (KOPECKÁ *et al.*, 1974; MANNERS *et al.*, 1973). A outra fração de glucana é álcali-solúvel e possui estrutura química similar, mas com maior número de ligações  $\beta$ -1,6. Esta última é ligada à pequena quantidade de manana formando uma camada de mananoproteína, e corresponde à glucana amorfa, na qual a glucana fibrilar está embebida (HUNTER e ASENJO, 1988). A manana e a proteína são sempre encontradas juntas na parede celular. A manana é encontrada na superfície externa da parede (BALLOU, 1982).

BACON *et al.* (1969) observaram a presença de uma membrana interna, composta de quitina e glucana e que, quando intacta, atua como uma membrana permeável

prevenindo a perda da fração solúvel da glucana. A maior parte da quitina da parede celular de leveduras está localizada na região da cicatriz de brotamento (BACON *et al.*, 1966).

A composição molecular da parede celular não é fixa. A parede celular possui uma estrutura dinâmica e pode ter ajustes consideráveis na composição e estrutura durante o ciclo celular em resposta às condições de desenvolvimento, como oxigênio, nutrientes, temperatura e pH (KAPTEYN *et al.*, 1999; KAPTEYN *et al.*, 2000; KLIS, 1994; POPPOLO e VAI, 1999).

## **2.2 Lise da parede celular de leveduras**

As enzimas de leveduras podem ser extraídas por métodos químicos, mecânicos e enzimáticos.

Durante a extração de enzimas utilizando o método químico, ocorre a permeabilização da parede celular de células viáveis de leveduras. A parede celular é alterada permitindo que pequenas moléculas como substratos, produtos ou coenzimas transitem livremente. Agentes químicos podem romper estruturas da parede celular permitindo a passagem de solutos de baixo peso molecular para dentro ou fora das células, incluindo a lactose e seus produtos de hidrólise. Agentes permeabilizantes atuam nas membranas celulares pela diminuição do conteúdo de fosfolipídeos que as compõem (SISO *et al.*, 1994).

Os métodos físicos são empregados para a ruptura da parede celular de leveduras. Estes métodos não são indicados quando se deseja um processo seletivo, pois uma vez rompida a parede celular, todo seu conteúdo é extravasado, o que pode provocar a degradação do composto de interesse pela ação das próprias enzimas contidas no meio (SALAZAR *et al.*, 2007).

Os sistemas enzimáticos que lisam a parede celular de leveduras são uma mistura de diferentes enzimas, incluindo  $\beta$ -1,3-glucanases (lítica e não lítica), proteases,  $\beta$ -1,6-glucanases, mananases e quitinases, as quais agem sinergisticamente para lisar a parede celular de leveduras (ZOMER *et al.*, 1987; ASENJO *et al.*, 1985; SALAZAR e ASENJO,

2007). A lise enzimática celular se inicia com a ação da protease sobre a camada externa de mananaproteína da parede. A protease hidrolisa a estrutura protéica liberando as proteínas das mananas e expondo a superfície de glucana que se localiza abaixo. Então as glucanases atacam a camada interna da parede solubilizando a glucana. *In vitro*, estas enzimas não puderam lisar as leveduras na ausência de agentes redutores como ditioneitol ou  $\beta$ -mercaptoetanol porque os danos às pontes dissulfeto entre os resíduos de manose e proteínas da parede são necessários para a exposição apropriada da camada interna de glucana. Quando a ação combinada da protease e glucanase abre um espaço suficientemente grande na parede celular, a membrana plasmática e seu conteúdo são extrusados como um protoplasto. Em tampões osmóticos contendo 0,55-1,2M de sacarose ou manitol, o protoplasto permanece intacto, mas em tampões diluídos a membrana é lisada imediatamente, liberando as proteínas citoplasmáticas e organelas. Entretanto, as proteínas liberadas da parede celular e do citoplasma podem ser hidrolisadas pelas proteases contidas no sistema lítico ou nas próprias células de leveduras (SALAZAR e ASENJO, 2007).

Foi sugerido que a camada de glucana que compõe a parede das células de leveduras não está diretamente acessível à endo- $\beta$ -1,3-glucanase purificada e componentes protéicos externos previnem a quebra destes polímeros na célula inteira. As proteases atuam de modo sinérgico com a  $\beta$ -1,3-glucanase e a ação primária das proteases sobre os componentes da superfície permitiria a solubilização subsequente da camada interna de glucana, conduzindo à lise celular (GACTO *et al.*, 2000).

Porém, KITAMURA *et al.* (1974), SAEKI *et al.* (1994), FERRO (2002) e FLEURI (2006) verificaram que as  $\beta$ -1,3-glucanases são capazes de lisar a parede celular de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* sem a necessidade de proteases.

As enzimas  $\beta$ -1,3-glucanases, proteases e quitinases são produzidas por fungos, bactérias e plantas superiores, algas e moluscos (YAMAMOTO e NAGASAKI, 1975). E podem atuar lisando a parede celular de leveduras (BACON *et al.*, 1970; DOI *et al.*, 1973; NAGASAKI *et al.*, 1976; OBATA *et al.*, 1977; YAMAMOTO *et al.*, 1988) e fungos (DONZELLI *et al.*, 2005; JAYUS *et al.*, 2005, MONTEIRO e ULHOA, 2006; SUN *et al.*, 2005; THEODORE e PANDA, 1994).



Vários microrganismos produzem enzimas extracelulares que lisam a parede celular de leveduras. Estes microrganismos exibem uma atividade predatória contra leveduras e outras células microbianas e têm sido isolados de diversos ambientes. Enzimas capazes de lisar células de leveduras têm sido encontradas em organismos como as bactérias *Cytophaga johnsonii* (BACON *et al.*, 1970), *Arthrobacter luteus* (DOI *et al.*, 1973), *Flavobacterium dormitator* var. *glucanolyticae* (NAGASAKI *et al.*, 1976), *Oerskovia* sp CK (OBATA *et al.*, 1977), *Rarobacter faecitabidus* (YAMAMOTO *et al.*, 1988) e *R. incanus* (GOTO-YAMAMOTO *et al.*, 1993). Estas bactérias têm sido isoladas a partir do lodo ativado de sistemas de tratamento de água de indústrias de alimentos e bebidas alcoólicas (HASUO *et al.*, 1984). Do ponto de vista comercial, a bactéria mais importante é a *Arthrobacter luteus*, posteriormente classificada como *Oerskovia xanthineolytica* por SCOTT e SCHEKMAN (1980) e atualmente denominada *Cellulosimicrobium cellulans*. Um sistema lítico de *Rhizoctonia solani* também está comercialmente disponível (Kitalase), contendo atividade de  $\beta$ -1,3-endoglucanase, protease, pectinase e amilases (SALAZAR e ASENJO, 2007).

A  $\beta$ -1,3-glucanase purificada de *Cellulosimicrobium cellulans* 191, de massa molecular igual a 45 kDa, foi capaz de romper a parede celular de inúmeras leveduras como *Saccharomyces cerevisiae* KL 88, *Saccharomyces capensis*, *Kluyveromyces drosophilum*, *Candida glabrata*, *Debaromyces vanriji*, *Hansenula mrakki* e *Pichia membranaefaciens* sem necessidade de proteases e quitinases. A quitinase purificada de *Cellulosimicrobium cellulans* 191 não foi capaz de lisar a parede celular de *S. cerevisiae* (FLEURI, 2006).

SANTOS (2004) estudou a produção de protease lítica de *Cellulosimicrobium cellulans* 191. Foi obtida maior produção de protease em meio composto de 8% de células de levedura seca; 0,2g/L de  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ; 2,0g/L  $(NH_4)_2SO_4$  e em tampão fosfato 0,15M, pH 8,0 após 24 horas de fermentação a 27°C e agitação de 150rpm. A protease foi purificada em coluna de DEAE-Sepharose Fast Flow e a massa molecular estimada em 55 kDa por SDS-PAGE. A protease purificada apresentou capacidade de lisar células de *S. cerevisiae*.

### 2.3 Produção e características da $\beta$ -1,3-glucanase lítica

A  $\beta$ -1,3-glucana é o componente encontrado em maior quantidade na parede celular de leveduras. A composição e a estrutura da parede celular das leveduras variam com as espécies. A parede celular de leveduras é também afetada pela composição do meio e as condições da cultura (KIM *et al.*, 2004).

As enzimas que lisam a parede celular são valiosas ferramentas para a área de biotecnologia, com várias aplicações em medicina, indústria de alimentos e agricultura e ainda, para obtenção de produtos intracelulares de leveduras ou bactérias. A diversidade do seu potencial de aplicações tem conduzido ao desenvolvimento de sistemas líticos enzimáticos com características específicas, capazes de satisfazer os requerimentos de cada aplicação em particular. Desde que a enzima lítica, lisozima, foi descoberta, muitas investigações têm contribuído para a elucidação dos mecanismos de ação e outros aspectos básicos destas enzimas. Atualmente, a produção de proteínas recombinantes por engenharia genética tem promovido e expandido a área de aplicações das enzimas líticas. As enzimas que lisam a parede celular de leveduras têm aplicação biotecnológica na preparação de protoplastos, fusão celular e transformação de leveduras, na extração de proteínas recombinantes, enzimas, pigmentos intracelulares, lipídeos e ácidos nucleicos. Além disso, essas enzimas possuem um potencial de aplicação na produção de extrato de levedura, no tratamento de massa celular de leveduras de indústrias de fermentação para a preparação de ração animal, na obtenção de glucanas da parede celular e no pré-tratamento de leveduras para lise mecânica (HUNTER e ASENJO, 1988). Segundo SALAZAR e ASENJO (2007), a maior aplicação destas enzimas líticas tem sido para a extração de ácidos nucleicos de microrganismos susceptíveis e formação de protoplastos para transformação celular. As  $\beta$ -1,3-glucanases e as proteases líticas têm sido utilizadas na elucidação da estrutura, composição e mecanismo da síntese da parede celular de leveduras (KOLLÁR *et al.*, 1995; KOLLÁR *et al.*, 1997; KAPTEYN *et al.*, 1999; MRSA e TANNER, 1999; MRSA *et al.*, 1999). Outras aplicações são baseadas nas propriedades antimicrobianas destas enzimas (SALAZAR e ASENJO, 2007).

FERRO (2002) estudou a produção de uma  $\beta$ -1,3-glucanase de *Cellulosimicrobium cellulans* YLM B191-1 em meio composto de 15g de levedura seca; 2,0g de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; 13,6g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 4,2g de KOH; 0,2g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0,001g de  $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ; 1mg de biotina e 1mg de tiamina por litro. A massa molecular da  $\beta$ -1,3-glucanase foi estimada em 17,1 kDa através de eletroforese em SDS-PAGE. A preparação bruta de  $\beta$ -1,3-glucanase apresentou pH ótimo de atividade da faixa de 4,5 a 5,5 a 55°C, idêntico à enzima purificada e temperatura ótima de atividade na faixa de 50 a 60°C em pH 5,5. A enzima mostrou-se estável por 4 horas em pH 5,5 a 45°C e por 1 hora em pH 6,5 a 55°C, mas foi inativada após 1 hora de tratamento térmico a 60°C. Os tratamentos das células de *S. cerevisiae* ATCC 26602 com a preparação bruta e purificada de  $\beta$ -1,3-glucanase provocaram alterações na superfície celular da levedura. A  $\beta$ -1,3-glucanase purificada de *Cellulosimicrobium cellulans* YLM-B191-1 apresentou atividade ótima na faixa de pH similar às  $\beta$ -1,3-glucanases purificadas de *Rhizopus chinensis* R-69 (YAMAMOTO e NAGASAKI, 1975), de *Trichoderma longibrachiatum* (TANGARONE *et al.*, 1989), de *Trichoderma harzanium* (NORONHA e ULHOA, 1996; THRANE *et al.*, 1997) e de *Rarobacter faecitabidus* (SHIMOI *et al.*, 1991).

A  $\beta$ -1,3-glucanase de *Arthrobacter* sp., descrita por DOI *et al.* (1973), apresentou atividade ótima na faixa de pH 5,5 a 6,5 enquanto a enzima da preparação Zymolyase, do microrganismo *Arthrobacter luteus*, apresentou atividade ótima de lise de células viáveis de leveduras em pH 7,5 a 35°C (KITAMURA e YAMAMOTO, 1972; KITAMURA *et al.*, 1974).

As  $\beta$ -1,3-glucanases de linhagens de *Oerskovia* sp que lisam a parede celular de leveduras apresentam atividade ótima na faixa de pH 5,0 a 8,0. OBATA *et al.* (1977) descreveram três  $\beta$ -1,3-glucanases de *Oerskovia* sp CK, às quais denominou F0, F1 e F2. A enzima F0 mostrou atividade ótima em pH 6,5 a 50°C e a enzima F2 em pH 7,5 e 35°C. SCOTT e SCHEKMAN (1980) relataram que a  $\beta$ -1,3-glucanase de *Oerskovia xanthineolytica* mostrou atividade ótima no pH 6,0, enquanto que a  $\beta$ -1,3-glucanase de *Oerskovia xanthineolytica* LL-G109 estudada por VENTOM e ASENJO (1991) apresentou atividade ótima em pH 6,0 e 8,0, utilizando-se os substratos laminarina e glucana de

levedura, respectivamente. SAEKI *et al.* (1994) verificaram que a atividade máxima de  $\beta$ -1,3-glucanase de *Oerskovia xanthineolytica* TK-1 sobre a glucana de levedura foi em pH 5,5, sobre a curdlana foi entre pH 5,0 e 6,5 e sobre a laminarina em pH 7,5.

Uma  $\beta$ -1,3-glucanase lítica de *Cellulomonas cartae* 191 foi purificada por ultrafiltração em membrana de exclusão de 10 kDa e cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-Sephrose equilibrada em tampão acetato de sódio 0,01M pH 5,5. A enzima apresentou massa molecular de 57 kDa em gel de eletroforese SDS-PAGE. A linhagem *Cellulomonas cartae* 191 foi capaz de lisar a levedura *Saccharomyces cerevisiae* e também o fungo *Penicillium digitatum* causador do mofo verde em frutas cítricas (SOARES, 2002).

ESCUREDO *et al.* (1997) purificaram uma  $\beta$ -1,3-glucanase de *Oerskovia xanthineolytica*, aproximadamente 23 vezes, com rendimento de 12,3%, em dois passos cromatográficos. O sobrenadante do meio de cultivo foi concentrado através de precipitação com sulfato de amônio, dialisado contra tampão Tris-HCl 20mM, pH 8,5 e purificado em colunas HR16/10 Q-Sephrose FF.

FARCADE *et al.* (2006) estudaram o efeito do pré-tratamento das células de *Kluyveromyces lactis* NCIM 3566 em soluções tampão de diferentes valores de pH seguido de ultrassonicação para extração de  $\beta$ -galactosidase. Foi obtido atividade de  $95 \pm 3$ U/mL através do tratamento das células em pH 4,4 durante 6 horas seguido de ultrassonicação a 120 watts por 40 minutos, enquanto que utilizando somente o tratamento ultrasônico a 120 watts por 50 minutos foi obtido  $7,2 \pm 0,6$ U/mL.

FLEURI (2006) obteve maior produção de  $\beta$ -1,3-glucanase (1,14U/mL) através da fermentação de *Cellulosimicrobium cellulans* 191 em meio de cultivo contendo 10g/L de parede celular de levedura, 2g/L de  $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$ ; 0,2g/L de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  e tampão fosfato 0,2M, pH 7,5; temperatura de 30°C e 200rpm de agitação em frascos aletados. A enzima foi purificada 11,9 vezes através de cromatografia em coluna de troca iônica DEAE-Sephadex A50 equilibrada em tampão fosfato 0,01M, com rendimento de 25%. A  $\beta$ -1,3-glucanase apresentou massa molecular de 45 kDa. A enzima purificada, na concentração 0,1U de

atividade de glucanase por mL de suspensão de levedura, foi capaz de lisar as leveduras *Saccharomyces cerevisiae* KL-88, *Saccharomyces capensis*, *Debaromyces vanriji*, *Pachysolen tannophilus*, *Kluyveromyces drosophilum*, *Candida glabrata*, *Hansenula mrakii* e *Picchia membranaefaciens*. As linhagens *Debaromyces vanriji*, *Pachysolen tannophilus* e *Hansenula mrakii* mostraram-se mais sensíveis, enquanto as linhagens *Saccharomyces cerevisiae* KL-88, *Saccharomyces capensis* e *Candida glabrata* mostraram-se mais resistentes à ação enzimática da  $\beta$ -1,3-glucanase.

SALAZAR *et al.* (2006) induziram a mutação do microrganismo *O. xanthineolytica* para aumentar as propriedades líticas da  $\beta$ -1,3-glucanase. A  $\beta$ -1,3-glucanase purificada da linhagem mutante apresentou melhor atividade lítica quando comparada com a enzima do microrganismo selvagem. A atividade lítica foi medida a 37°C pela redução da densidade óptica a 660nm de uma suspensão de *S. cerevisiae* nos primeiros 120 segundos sendo definida por unidade de DO/min/mg de proteína. A  $\beta$ -1,3-glucanase da linhagem selvagem apresentou uma taxa de lise próxima a 50mU de DO/min/mg enquanto a  $\beta$ -1,3-glucanase da linhagem mutante apresentou uma taxa acima de 60mU de DO/min/mg, ambas com uma concentração de  $\beta$ -1,3-glucanase de 1,2 $\mu$ g/mL.

As  $\beta$ -1,3-D-glucanases de vegetais têm sido relacionadas à atividade antimicrobiana (HINTON e PRESSEY, 1980; MAUCH *et al.*, 1988; CHAMBERS *et al.*, 1993; MISHRA *et al.*, 1997; GLANDORF *et al.*, 1997; ZHANG e YUEN, 2000).

## 2.4 Produção e aplicação da $\beta$ -galactosidase

A lactose é um dissacarídeo que possui 70% da doçura da sacarose. A  $\beta$ -galactosidase ou lactase (E.C. 3.2.1.23) catalisa a hidrólise da lactose em galactose e glicose (BECERRA *et al.*, 2002). É uma das enzimas mais importantes em processamento de alimentos (PANESAR *et al.*, 2006). Estima-se que, dependendo do grupo populacional, de 3 a 70% das pessoas são intolerantes à lactose (JOHNSON *et al.*, 1993). A intolerância à lactose é comum entre adultos da maior parte da população, exceto aqueles do norte da Europa e parte da África, devido ao desaparecimento após a infância da maior parte ou toda  $\beta$ -galactosidase das células intestinais. A lactose que não é completamente digerida e

absorvida no intestino delgado pode ser convertida pelas bactérias em produtos tóxicos e causar flatulência, dor abdominal e diarreia (NOVALIN, 2005). A deficiência de lactase pode também ser causada pela injúria da mucosa intestinal provocada por doenças como gastroenterite infecciosa, infecções parasitárias, doença celíaca, viroses tropicais, enterites induzidas por drogas e doença de Crohn (BÜLLER e GRAND, 1990; BÜLLER, 1991).

A hidrólise da lactose é utilizada tecnologicamente para evitar a cristalização da lactose em produtos lácteos. Preparações enzimáticas de  $\beta$ -galactosidase do tipo ácida (*Aspergillus*) ou neutra (*Kluyveromyces*) são capazes de promover um mínimo de 30% de hidrólise da lactose, o que é requerido para prevenir a cristalização deste açúcar (MAHONEY e WILDER, 1987).

Vários outros microrganismos são capazes de produzir a  $\beta$ -galactosidase, dentre eles leveduras, como *Debaryomyces hansenii*, *Geotrichum candidum*, *Kluyveromyces marxianus*, *Yarrowia lipolytica*, *Candida zeylanoides* (LOPANDIC *et al.*, 2006); fungos, como *Talaromyces thermophilus* CBS 236.58 (NAKKHARAT e HALTRICH, 2006), *Penicillium multicolor* (FLOOD e KONDO, 2004) e bactérias, como *Lactobacillus plantarum*, *L. acidophilus* e *L. pentosus* (CEBECI e GÜRAKAN, 2003).

As  $\beta$ -galactosidases utilizadas industrialmente são obtidas de linhagens de leveduras *Kluyveromyces fragilis*, *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces marxianus* e dos fungos *Aspergillus niger* e *Aspergillus oryzae* (FINOCCHIARO *et al.*, 1980; RYDER, 1989; ZADOW, 1992). Todavia, segundo RAMANA RAO (1997) existem dois microrganismos principais produtores de  $\beta$ -galactosidase: leveduras (*Kluyveromyces* sp.) e fungos (*Aspergillus niger* e *Aspergillus oryzae*). A *Escherichia coli* também é produtora da  $\beta$ -galactosidase, mas como o microrganismo é patogênico, a enzima não é usada diretamente em alimentos. Normalmente as enzimas de fungos são utilizadas para hidrolisar a lactose de produtos com baixos valores de pH, como o soro do leite ácido. E as enzimas produzidas pelas leveduras são utilizadas para produtos com valores de pH próximos ao neutro, como o leite ou soro doce (HARJU, 1977).

Apesar de bactérias, fungos e leveduras serem considerados fontes comerciais potenciais de  $\beta$ -galactosidase, a levedura *Kluyveromyces fragilis* é o organismo mais utilizado para este propósito. Ainda que algumas bactérias exibam alta atividade de  $\beta$ -galactosidase, elas apresentam relativamente baixo crescimento celular; e os fungos, por outro lado, apresentam grande crescimento celular, porém baixa atividade de  $\beta$ -galactosidase (WIERZBICKI e KOSIKOWSKI, 1971).

BRODSKY e GROOTWASSINK (1986) extraíram uma  $\beta$ -galactosidase intracelular a partir da biomassa de *Kluyveromyces fragilis* em um processo de baixo custo para utilização na indústria. A suspensão celular de levedura 180g/L em tampão fosfato 0,1M foi tratada com metil paraben 0,4% e a permeabilização foi completada com tratamento térmico a 50°C de 0,5-1 hora, obtendo-se 90% de atividade da  $\beta$ -galactosidase. A  $\beta$ -galactosidase apresentou atividade ótima entre pH 5,6-6,0 compatível com a hidrólise de lactose em produtos alimentícios a base de leite.

A aplicação da  $\beta$ -galactosidase traz efeitos benéficos na assimilação de certos alimentos que contenham lactose, dentre eles: produção de alimentos para pessoas intolerantes à lactose (JOHNSON *et al.*, 1993), possibilitando a utilização da lactose como fonte de energia; formação de galacto-oligossacarídeos durante a hidrólise de lactose favorecendo o crescimento da microflora bacteriana intestinal (CURDA *et al.*, 2006; MAHONEY, 1998; SHIN *et al.*, 1998); melhoria das características tecnológicas e sensoriais de alimentos que contenham lactose hidrolisada do leite ou do soro de leite (BECERRA e GONZÁLEZ-SISO, 1996; RYDER, 1989; ZADOW, 1992); incremento na solubilidade (evitando a cristalização da lactose e da textura arenosa de sorvetes e leite condensado ou produtos pulverizados); aumento do poder adoçante; formação de monossacarídeos mais facilmente fermentáveis (SHAH *et al.*, 1993); abaixamento do ponto de congelamento de sorvetes (aumentando a maciez e a cremosidade); (BALDWIN e CAMPBELL, 1994) aumento da biodegradabilidade do soro de leite no qual a lactose tenha sido hidrolisada (SZCZODRAK, 2000); síntese de lactulose a partir de lactose e frutose (KIM *et al.*, 2006) e gal-sorbitol a partir de galactose e sorbitol (KLEWICK, 2007).

As leveduras que fermentam a lactose, *Kluyveromyces marxianus*, *Kluyveromyces lactis* e *Kluyveromyces fragilis* são importantes para a indústria por suas aplicações para obtenção de biomassa, etanol, enzimas e proteínas de microrganismos (INCHAURRONDO *et al.*, 1994; INCHAURRONDO *et al.*, 1998; KIERS *et al.*, 1998). A linhagem *Kluyveromyces marxianus* oferece grandes vantagens em relação às demais linhagens como bom crescimento, aceitabilidade por ser um microrganismo seguro e maior produção de  $\beta$ -galactosidase que as outras leveduras quando a lactose é utilizada como substrato (BELEM e LEE, 1998).

A produção de  $\beta$ -galactosidase aumenta durante a fase de crescimento de levedura (INCHAURRONDO *et al.*, 1994). A enzima é sintetizada na presença do indutor lactose, a produção máxima é obtida no início da fase estacionária de crescimento, após a qual, a quantidade de enzima diminui (RANZI *et al.*, 1987).



## 2.5 Características da $\beta$ -galactosidase produzida por alguns microrganismos

A enzima  $\beta$ -galactosidase é produzida por animais, vegetais e microrganismos. O **Quadro 1** ilustra as características bioquímicas de  $\beta$ -galactosidases de alguns microrganismos.

**Quadro 1.** Características da  $\beta$ -galactosidase de alguns microrganismos

	Microrganismo	pH ótimo	T <sup>a</sup> ótima (°C)	substrato	Referência
<i>Fungos</i>	<i>Aspergillus niger</i>	3,0 – 4,0	55 – 60	o-NPG	JURADO <i>et al.</i> (2002)
	<i>Aspergillus niger</i>	3,2 – 4,0	-	o-NPG	BAHL e AGRAWAL (1969)
	<i>Aspergillus oryzae</i> (enzima purificada)	5,0	50-55	Lactose/ o-NPG	PARK <i>et al.</i> (1979)
	<i>Aspergillus oryzae</i> (extrato enzimático bruto)	5,0	55-60	Lactose/ o-NPG	PARK <i>et al.</i> (1979)
	<i>Aspergillus psychrolactophilus</i> linhagem F2	8,0	10	o-NPG	NAKAGAWA <i>et al.</i> (2006)
<i>Leveduras</i>	<i>Kluyveromyces fragilis</i>	6,6	37	o-NPG	JURADO <i>et al.</i> (2002)
	<i>Kluyveromyces lactis</i>	6,9 – 7,3	35	o-NPG	JURADO <i>et al.</i> (2002)
	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	6,8	37	o-NPG	O'CONNELL e WALSH (2007)
	<i>Kluyveromyces marxianus</i> IBM3	7,5	45 – 50	o-NPG	BRADY <i>et al.</i> (1995)
	<i>Kluyveromyces marxianus</i> CBS 6556	-	37	o-NPG	RECH <i>et al.</i> (1999)
	<i>Kluyveromyces marxianus</i> (resistente à cicloheximida)	6,6 - 7,0	57	o-NPG	RAJOKA <i>et al.</i> (2004b)
	<i>Saccharomyces lactis</i>	7,2	-	o-NPG	BIERMANN e GLANTZ (1968)
	<i>Saccharomyces fragilis</i>	6,7 - 6,9	30	o-NPG	CAPUTO <i>et al.</i> (1948)
	<i>Saccharomyces fragilis</i>	6,5	37	lactose	WENDORFF e AMUNDSON (1971)

**Quadro 1.** Características da  $\beta$ -galactosidase de alguns microrganismos (continuação)

	Microrganismo	pH ótimo	T <sup>a</sup> ótima (°C)	substrato	Referência
<i>Bactérias</i>	<i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i> subsp. <i>rittmannii</i>	6,0	65	o-NPG	GUL-GUVEN <i>et al.</i> (2007)
	<i>Bacillus subtilis</i>	6,5	50	o-NPG	ANEMA (1964)
	<i>Escherichia coli</i>	7,3	37	o-NPG	JURADO <i>et al.</i> (2002)
	<i>Escherichia coli</i>	7,0	-	o-NPG	ANDERSON e RICKENBERG (1960)
	<i>Lactococcus bulgaricus</i>	7,0	55	o-NPG	ITOH <i>et al.</i> (1980)
	<i>Lactococcus murinus</i> CNRZ 313	7,0	45	o-NPG	NADER DE MACIAS <i>et al.</i> (1983)
	<i>Paracolobactrum aerogenoides</i>	7,0	-	o-NPG	ANDERSON e RICKENBERG (1960)
	<i>Pediococcus species</i>	6,5	45	o-NPG	BHOWMIK e MARTH (1990)
	<i>Streptococcus cremoris</i> H	7,0	65	o-NPG	JAGOTA <i>et al.</i> (1981)
	<i>Streptococcus lactis</i>	7,0	37	o-NPG	CITTI <i>et al.</i> (1965)
	<i>Streptococcus thermophilus</i>	7,1	55	o-NPG	GREENBERG e MAHONEY (1982)
	<i>Streptococcus thermophilus</i>	6,6 – 7,0	57	o-NPG	RAO e DUTTA (1981)
	<i>Streptococcus thermophilus</i>	7,0 – 8,0	57	o-NPG	SOMKUTI e STEINBERG (1979)
	<i>Thermoanaerobium</i> sp. 2905	5,0	80	lactose	ULEZLO <i>et al.</i> (2001)
<i>Thermoanaerobium</i> sp. 2905	6,0	75	p-NPG	ULEZLO <i>et al.</i> (2001)	

CAPUTO *et al.* (1948) estudaram a  $\beta$ -galactosidase produzida pela levedura *Saccharomyces fragilis* e verificaram que para a atividade máxima desta enzima em preparações parcialmente purificadas foi necessário a presença dos íons magnésio, manganês e potássio. O íon zinco atuou de forma contrária, como agente inibidor. A  $\beta$ -galactosidase de *Saccharomyces fragilis* apresentou pH ótimo de atividade entre 6,7 e 6,9 e temperatura ótima de 30°C.

A  $\beta$ -galactosidase intracelular da bactéria *Escherichia coli* apresenta atividade ótima em pH 7,3 e 37°C, e é afetada por íons de metais alcalinos. A enzima tem sido extensivamente estudada como um sistema modelo, mas não é utilizada diretamente em alimentos porque o microrganismo não é considerado seguro para a saúde. Já a hidrólise da

lactose do leite e de produtos lácteos pela  $\beta$ -galactosidase de leveduras como a linhagem *Kluyveromyces* sp. e pelo fungo *Aspergillus fungi* são aceitáveis. As enzimas fúngicas são mais utilizadas em soros ácidos uma vez que seu pH ótimo de atividade está entre 3,5-4,5. As enzimas de leveduras são utilizadas em leite e soro doce porque seu pH ótimo se situa entre 6,5-7,0 (JURADO *et al.*, 2002).

As  $\beta$ -galactosidases fúngicas, que são indicadas para hidrólise da lactose em soro ácido são, na maioria, inibidas pela galactose. Este tipo de inibição ocorre relativamente menos em  $\beta$ -galactosidases de bactérias e leveduras (PANESAR *et al.*, 2007).

COHN e MONOD (1953) verificaram que o íon potássio é um ativador mais eficiente que o íon sódio da atividade da  $\beta$ -galactosidase de *Escherichia coli* em presença do substrato lactose. E, quando o substrato é o ONPG ocorre o inverso (PASTORE e PARK, 1979). ANDERSON e RICKENBERG (1960) observaram que as  $\beta$ -galactosidases produzidas pelas bactérias *Paracolobactrum aerogenoides* e *Escherichia coli* foram ativadas pelo íon sódio mais eficientemente que o potássio quando foi utilizado o ONPG como substrato.

ANEMA (1964) purificou e estudou as propriedades da  $\beta$ -galactosidase produzida por *Bacillus subtilis*. A enzima foi purificada por fracionamento com sulfato de amônio e precipitação com acetona. A  $\beta$ -galactosidase apresentou atividade ótima a 50°C e pH 6,5.

BIERMANN e GLANTZ (1968) purificaram e caracterizaram a  $\beta$ -galactosidase de *Saccharomyces lactis*. A enzima foi purificada 78,6 vezes por fracionamento com sulfato de amônio, cromatografia em coluna de Sephadex G-100 e DEAE-Sephadex A-50. A enzima purificada apresentou atividade ótima em pH 7,2.

BAHL e AGRAWAL (1969) purificaram e caracterizaram a  $\beta$ -galactosidase extracelular de *Aspergillus niger* e verificaram que a enzima apresenta atividade ótima na faixa de pH 3,2 e 4,0 e estabilidade entre pH 2,8 e 3,9.

WENDORFF e AMUNDSON (1971) caracterizaram a  $\beta$ -galactosidase extracelular de *Saccharomyces fragilis* e verificaram que a enzima é estável em pH 6,0-7,0. E que, em

condições de refrigeração e em solução tampão permaneceu estável por mais de 3 meses, porém a 51°C perdeu 96% da atividade em 10 minutos. O pH ótimo para hidrólise da lactose foi 6,5 a 37°C.

BORGLUM e STERNBERG (1972) estudaram as propriedades da  $\beta$ -galactosidase extracelular do fungo *Aspergillus niger* e verificaram que a enzima apresenta atividade ótima em pH 3,5-4,0 e 60°C quando se utiliza lactose como substrato. Na mesma temperatura, porém, utilizando ONPG como substrato o pH ótimo se situa entre 3,5 e 4,5.

MORISI *et al.* (1973) compararam a  $\beta$ -galactosidase livre e imobilizada de *Escherichia coli* e de leveduras e verificaram que a enzima bacteriana apresentou pH ótimo de atividade entre 6,6 e 7,5 e  $\beta$ -galactosidase de leveduras entre 6,0 e 7,0.

SORENSEN e CRISAN (1974) estudaram a produção de  $\beta$ -galactosidase termoestável por 54 linhagens de fungos termofílicos filamentosos representando 15 espécies de 12 gêneros. Quatro linhagens de *Mucor pusillus* se destacaram como maiores produtoras de  $\beta$ -galactosidase termoestável apresentando 0,81-0,95U/mg de proteína. A termoestabilidade das  $\beta$ -galactosidas de *Mucor pusillus* e *Kluyveromyces fragilis* foram comparadas e apesar da enzima de levedura apresentar atividade três vezes maior, 96% desta atividade se perdia em 10 minutos a 60°C, enquanto a  $\beta$ -galactosidase do fungo perdia apenas 27% da atividade após o mesmo tratamento.

DECLÉIRE *et al.* (1987) verificaram que a concentração mínima de solvente para a permeabilização de células de *Kluyveromyces bulgaricus* foram 10% de n-butanol, 20% de propanol, 30% de isopropanol ou terc-butanol, 40% de etanol ou acetona e 70% de dimetilsulfóxido. A extração máxima de  $\beta$ -galactosidase (2,25- 2,35U/mg de massa seca) foi obtida após tratamento das células de *Kluyveromyces bulgaricus* com 30% de isopropanol, 40% de terc-butanol e 70% de etanol durante 3 minutos a 25°C, resfriamento rápido a 5°C por 5 minutos em banho de gelo, seguido de centrifugação para a separação do sobrenadante livre de células.

PARK *et al.* (1979) purificaram a  $\beta$ -galactosidase extracelular do fungo *Aspergillus oryzae* através de fracionamento com sulfato de amônio e cromatografia em colunas de DEAE-celulose e DEAE-Sephadex-A50. A enzima purificada apresentou atividade ótima em pH 5,0 e 50°C, entretanto a enzima do extrato enzimático bruto mostrou temperatura ótima de atividade a 55°C. A enzima mostrou maior estabilidade na faixa de pH 3,5 a 8,0. A  $\beta$ -galactosidase bruta hidrolisou com eficiência a lactose do soro ácido, sendo obtido 83% de hidrólise da lactose após 72h a 55°C, mas a atividade da enzima foi marcadamente reduzida em leite de vaca devido ao pH mais alto.

MAHONEY e WHITAKER (1978) extraíram a  $\beta$ -galactosidase de *Kluyveromyces fragilis* através de tratamento da suspensão celular de levedura (200mg/mL) em tampão fosfato pH 7,0 contendo 0,1mM MnCl<sub>2</sub>, 0,5mM MgSO<sub>4</sub>, 0,5mM de ditioneitol e 0,02% de azida sódica e 2% de tolueno durante 20 horas a 37°C. O sobrenadante livre de células apresentou 225U de  $\beta$ -galactosidase/mL e atividade específica de 15,2U/mg de proteína, utilizando substrato ONPG.

A  $\beta$ -galactosidase de *Streptococcus cremoris* H foi purificada por fracionamento com sulfato de amônio 40-60% de saturação. Nesse processo somente 10% da proteína foi recuperada da solução enzimática e mais de 50% da enzima do extrato bruto foi perdida, indicando que a enzima foi facilmente desnaturada. A enzima foi purificada aproximadamente 2,6 vezes e apresentou atividade ótima a 65°C e pH 7,0. Íons Mn<sup>2+</sup> ativaram a enzima (JAGOTA *et al.*, 1981).

RAO e DUTTA (1981) purificaram a  $\beta$ -galactosidase de *Streptococcus thermophilus* até homogeneidade através da precipitação com acetona (1:1,5), fracionamento com sulfato de amônio 50% de saturação, filtração em gel Sephadex G-200 e cromatografia de troca iônica em coluna DEAE-Sephadex A-50, com recuperação de 25% da enzima. A preparação enzimática purificada exibiu um pH ótimo de atividade entre 6,0-7,0 e temperatura ótima de 57°C. A enzima se manteve estável em pH 6,8-7,0. A  $\beta$ -galactosidase apresentou massa molecular estimada em 600 kDa. Os autores observaram que a  $\beta$ -galactosidase de *Streptococcus thermophilus* mostrou-se mais ativa e apresentou temperatura ótima de atividade mais alta que a enzima de *Kluyveromyces fragilis*.

PIVARNICK e RAND (1992) estudaram o efeito da concentração do íon potássio, força iônica do tampão e da qualidade da água na atividade de  $\beta$ -galactosidase de *Kluyveromyces lactis*. A atividade da enzima foi testada utilizando lactose em tampão fosfato de potássio 0,02M pH 6,5 e em leite reconstituído, como substratos. A atividade enzimática testada em leite reconstituído e lactose, em condições similares, resultaram em atividades 4,3 e 6,6U/mL de  $\beta$ -galactosidase, respectivamente. O aumento da concentração de fosfato de potássio para 0,1M resultou na diminuição de 20% da atividade de  $\beta$ -galactosidase. A adição de íons potássio, como KCl 0,5M, na preparação enzimática resultou em aumento da atividade em ambos os sistemas com grande impacto: 160% usando o leite reconstituído e 120% utilizando a lactose como substrato.

FLORES *et al.* (1994) relataram que etanol 40% foi efetivo para a permeabilização das células da levedura *Kluyveromyces lactis* CBS 683 e extração de  $\beta$ -galactosidase na faixa de temperatura de 5 a 30°C, mas não a 37°C devido à desnaturação da enzima.

BRADY *et al.* (1995) verificou que a  $\beta$ -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* permaneceu estável por pelo menos 8 horas a 30°C e apresentou pH ótimo de atividade igual a 7,5.

KREFT e JELEN (2000) estudaram a atividade e estabilidade da  $\beta$ -galactosidase das culturas de *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* 11842 lisadas por tratamento em ultrasonicador e relacionaram com a atividade hidrolítica da lactose na presença de íons Na<sup>+</sup> e K<sup>+</sup>. Após ultrasonicação das culturas em tampões contendo Na<sup>+</sup> ou K<sup>+</sup> em diversos valores de pH, as preparações enzimáticas foram submetidas a diferentes temperaturas, utilizando lactose como substrato. A hidrólise foi monitorada por crioscopia. A  $\beta$ -galactosidase das culturas sonicadas em tampão K<sup>+</sup> apresentaram atividade e estabilidade mais alta que aquelas tratadas com tampão Na<sup>+</sup>. A  $\beta$ -galactosidase apresentou maior atividade em pH 6,0-7,0. A estabilidade não foi afetada na faixa de pH 6,0-7,0 em temperaturas abaixo de 56°C. O tratamento da enzima a 61°C por 60 minutos, na presença de íons K<sup>+</sup>, causou perda de 70% na atividade em pH 6,0-7,0, enquanto na presença de íons Na<sup>+</sup> a atividade foi perdida quase completamente.

RAJOKA *et al.* (2004b) estudaram a cinética de produção de  $\beta$ -galactosidase por uma linhagem mutante da levedura *Kluyveromyces marxianus* NIGBE Y-1 resistente à cicloheximida. Na fermentação do microrganismo em meio de cultivo contendo 2g/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 5g/L  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 1g/L de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 10g/L de glicose e 3g/L de extrato de levedura foi obtido maior produção de enzima após 48 horas a 35°C. O extrato enzimático foi parcialmente purificado por precipitação com sulfato de amônio a 4°C e diálise, com aumento da atividade específica de aproximadamente 12 vezes e recuperação de 67%. A  $\beta$ -galactosidase purificada apresentou atividade ótima em pH 6,6 - 7,0 e a 57°C.

PANESAR *et al.* (2007) estudaram a permeabilização de células de *Kluyveromyces marxianus* utilizando-se os solventes benzeno, n-butanol, n-propanol, Triton X-100, isopropanol, tolueno, etanol e acetona e obtiveram melhor resultado utilizando etanol. Foi obtido  $\beta$ -galactosidase 1510 IU/g de massa celular seca após tratamento das células de leveduras com etanol 50% na concentração final a 25°C por 15 minutos utilizando o substrato lactose. Segundo os autores, a diferença entre as concentrações ótimas dos agentes para permeabilização das células de leveduras varia entre as diferentes linhagens de leveduras e das condições do processo de permeabilização utilizadas.

O'CONNELL e WALSH (2007) estudaram a produção da  $\beta$ -galactosidase da enzima da levedura *Kluyveromyces marxianus* DSM5418 em meio contendo 10% de lactose, 0,3%  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (p/v), 0,5% de extrato de levedura (p/v) e 0,3% NaOH 5N (v/v) em pH 4,5. A suspensão de levedura foi submetida a tratamento com sonificador e o sobrenadante contendo 9,56U/mL de atividade de  $\beta$ -galactosidase foi utilizado como extrato enzimático bruto. O microrganismo *Kluyveromyces marxianus* DSM5418 demonstrou ser um grande produtor da enzima. A  $\beta$ -galactosidase foi purificada em coluna de filtração em gel, troca iônica e cromatografia em hidroxilapatita. A  $\beta$ -galactosidase purificada apresentou atividade ótima em pH 6,8 e temperatura de 37°C. A  $\beta$ -galactosidase bruta apresentou alta estabilidade quando exposta a condições intestinais simuladas *in vitro* por 4 horas.

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Microrganismos utilizados e manutenção**

Todas as linhagens de microrganismos foram obtidas da coleção de culturas do Laboratório de Bioquímica de Alimentos do Departamento de Ciência de Alimentos, da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

##### **3.1.1 Microrganismo que lisa levedura**

A linhagem de bactéria *Cellulosimicrobium cellulans* 191, que lisa a parede celular de leveduras, isolada de lodo de usina de fermentação alcoólica por FERRO (2002), foi utilizada para produção de  $\beta$ -1,3-glucanase.

A linhagem *Cellulosimicrobium cellulans* 191 foi mantida em tubos inclinados em ágar BHI contendo 0,5% de levedura seca por litro de água destilada. Após incubação a 30°C por 24 horas, adicionou-se camada de vaselina esterilizada. As culturas foram mantidas a 4°C e repicadas a cada três ou quatro meses de armazenamento.

##### **3.1.2 Microrganismos produtores de $\beta$ -galactosidase**

As linhagens das leveduras *Kluyveromyces marxianus* var. *lactis*, *Kluyveromyces drosophilarium*, *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus*, *Kluyveromyces marxianus* NRRL7571, *Kluyveromyces marxianus* NRRL1196 foram testadas quanto à produção de  $\beta$ -galactosidase.

As linhagens de *Kluyveromyces* sp. foram mantidas em tubos inclinados contendo meio YEPD contendo 1% de extrato de levedura, 2% de peptona, 2% de glicose e 2% de ágar. Após crescimento a 30°C por 24 h, adicionou-se camada de vaselina esterilizada. As culturas foram mantidas a 4°C e repicadas a cada três ou quatro meses de armazenamento.



## **3.2 Determinação das atividades enzimáticas**

### **3.2.1 Determinação da atividade de $\beta$ -1,3-glucanase**

A atividade de  $\beta$ -1,3-glucanase foi determinada como descrito por SAEKI *et al.* (1994) utilizando laminarina de *Laminaria digitata* (Sigma L 9634) como substrato. A solução de laminarina foi preparada em tampão acetato de sódio 0,1M pH 5,5. A mistura de 250 $\mu$ L de solução enzimática de  $\beta$ -1,3-glucanase e 250 $\mu$ L de solução 1,0% de laminarina em tampão acetato de sódio 0,1M, pH 5,5 foi incubada a 55°C por 30 minutos. A reação foi interrompida por aquecimento em banho em ebulição por 5 minutos. O tubo branco foi preparado adicionando-se 250 $\mu$ L de tampão acetato de sódio 0,1M pH 5,5 no lugar do substrato. Os açúcares redutores foram determinados pelo método de SOMOGYI (1952) e NELSON (1944) utilizando-se glicose como açúcar padrão. Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de  $\beta$ -1,3-glucanase por mL de solução enzimática que liberou um  $\mu$ mol de açúcar redutor equivalente a D-glicose por minuto de reação nas condições do ensaio.

### **3.2.2 Determinação da atividade de protease**

A atividade da protease foi determinada utilizando-se caseína como substrato como descrito por OBATA *et al.* (1977) e ROWLEY e BULL (1977). A mistura de reação contendo 1,5mL de solução 2,0% de caseína; 1,0mL de tampão fosfato 0,15M, pH 7,5 e 0,5mL de solução enzimática foi incubada a 30°C por 30 minutos. A reação foi paralisada pela adição de 3,0mL de solução 0,4M de ácido tricloroacético (TCA). Em seguida a mistura de reação foi filtrada em papel Whatman 42. Um tubo branco foi preparado para cada amostra adicionando-se a solução 0,4M de ácido tricloroacético (TCA) antes da solução enzimática. A absorbância do filtrado foi determinada a 280nm em espectrofotômetro. Uma unidade de atividade foi definida como aquela capaz de aumentar em 0,001 unidades a absorbância do filtrado a 280nm, nas condições de ensaio.

### **3.2.3 Determinação da atividade de $\beta$ -galactosidase**

A atividade da  $\beta$ -galactosidase foi determinada usando os substratos lactose e *o*-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosídeo (ONPG) (Sigma).

#### **3.2.3.1 Determinação da atividade da $\beta$ -galactosidase utilizando o substrato lactose**

Para a determinação da atividade da  $\beta$ -galactosidase usando o substrato lactose a mistura de 5mL de solução enzimática e 5mL de solução de lactose 10% em tampão fosfato de sódio 0,1M pH 7,0 foi incubada por 20 minutos a 35°C. A reação foi paralisada pela imersão do tubo em banho de água em ebulição por 2 minutos. A concentração de glicose foi determinada pelo método de glicose oxidase, como descrito por CHAMPLUVIER *et al.* (1988). Uma unidade de atividade da  $\beta$ -galactosidase utilizando o método de glicose oxidase foi definida como aquela capaz de liberar um  $\mu$ g de glicose por minuto nas condições do ensaio.

#### **3.2.3.2 Determinação da atividade da $\beta$ -galactosidase utilizando o substrato ONPG**

Para a determinação da atividade da  $\beta$ -galactosidase usando o substrato ONPG, alíquotas de 0,1mL de solução enzimática foram adicionadas em tubos contendo 0,9mL de solução 0,5mM *o*-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosídeo, em tampão fosfato de sódio 0,1M pH 6,5. Os tubos foram incubados a 35°C por 20 minutos. A reação foi paralisada pela adição de 2mL de solução 0,2M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. O *o*-nitrofenol liberado (ONP) pela ação enzimática foi estimado espectrofotometricamente a 416nm. A absorbância molar do ONP foi estimada e uma unidade de  $\beta$ -galactosidase foi definida como a quantidade de enzima que libera 1,0 $\mu$ M de ONP por minuto nas condições citadas (CHAMPLUVIER *et al.*, 1988).

### **3.2.4 Determinação da atividade de liticase da $\beta$ -1,3-glucanase**

#### **3.2.4.1 Produção de massa celular da levedura *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus***

Para a preparação do pré-inóculo, uma alçada da cultura de 24 horas do microrganismo foi inoculada em frasco Erlenmeyer de 125mL contendo 10mL do meio de cultivo composto de 5% de lactose, 0,75% de extrato de levedura, 0,84% de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>,

0,05% de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,45% de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  e pH 5,5 ajustado com KOH 0,1N. Os frascos foram incubados por 9 horas em agitador rotatório a 30°C e 100rpm. Em seguida alíquotas de 10mL do meio de cultivo foram transferidas para frascos de Erlenmeyer de 500mL contendo 90mL do mesmo meio de cultivo e incubados por 14 horas, a 30°C e 100rpm. Após incubação, os meios de cultura foram centrifugados a 11000xg durante 15 minutos a 5°C. As amostras de massa celular foram lavadas 3 vezes com tampão fosfato de potássio 0,1M, pH 6,5.

#### **3.2.4.2 Padronização da suspensão da levedura *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus* para determinação da atividade de liticase**

Após serem lavadas com água destilada, como descrito no item 3.2.4.1, as células foram ressuspensas em tampão fosfato 0,1M pH 6,5 para obtenção de suspensão celular com densidade ótica igual a 1,68 a 660nm (OBATA *et al.*, 1977). Foi feita uma curva relacionando a densidade ótica das suspensões de levedura a 660nm ( $\text{DO}_{660\text{nm}}$ ) com a massa seca da levedura contida nas frações. A suspensão padronizada de levedura de densidade ótica igual a 1,68 continha 1,3mg de massa celular seca/mL.

#### **3.2.4.3 Determinação da atividade de liticase da $\beta$ -1,3-glucanase**

Para a determinação da atividade da enzima  $\beta$ -1,3-glucanase, quanto à lise de leveduras, a mistura de 1mL de suspensão celular padronizada, preparado enzimático e tampão fosfato 0,1M, pH 6,5, suficiente para completar o volume para 2mL foi incubada a 30°C por 1 hora sob agitação em tempos regulares (VENTOM e ASENJO, 1990). Simultaneamente foi preparado, como referência, um tubo branco onde no lugar da solução enzimática foi acrescentado tampão fosfato 0,1M, pH 6,5. A atividade lítica foi determinada pela diminuição da turbidez da suspensão de levedura e calculada como descrito por OBATA *et al.* (1977) com modificações. Uma unidade de liticase foi definida como a diminuição de 0,001 na densidade ótica, nas condições de ensaio, a 660nm ( $\text{DO}_{660\text{nm}}$ ).

### **3.3 Seleção da levedura melhor produtora de $\beta$ -galactosidase**

As linhagens das leveduras *Kluyveromyces marxianus* var. *lactis*, *Kluyveromyces drosophilarium*, *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus*, *Kluyveromyces marxianus* NRRL7571, *Kluyveromyces marxianus* NRRL1196 foram cultivadas em tubos inclinados contendo meio YEPD a 30°C por 24 horas.

#### **3.3.1 Produção de massa celular da levedura *Kluyveromyces* sp.**

Para a produção de massa celular, as linhagens das leveduras *Kluyveromyces* sp. foram cultivadas como descrito no item 3.2.4.1.

#### **3.3.2 Padronização da suspensão da levedura *Kluyveromyces* sp.**

Amostras da massa celular de *Kluyveromyces* sp., obtidas como descrito no item 3.2.4.1, foram ressuspensas em tampão fosfato de potássio 0,1M, pH 6,5 para  $DO_{660nm}=5,00$ , correspondente a 4mg de massa celular seca/mL de suspensão.

#### **3.3.3 Lise das leveduras *Kluyveromyces* sp. e determinação da atividade de $\beta$ -galactosidase**

No ensaio de seleção da levedura melhor produtora de  $\beta$ -galactosidase, amostras de 2mL da suspensão de levedura padronizada de acordo com o item 3.3.2 e 2mL da preparação enzimática bruta de  $\beta$ -1,3-glucanase, com atividade igual a 0,724U/mL, obtido de acordo com o item 3.4.1, foram incubadas por 1 hora a 37°C para o rompimento da parede celular da levedura e liberação de  $\beta$ -galactosidase. Em seguida, amostras de 0,1mL da mistura de reação foram adicionadas a tubos de ensaio contendo 0,9mL da solução reagente ONPG em tampão fosfato de potássio 0,2M, pH 7,5. As misturas de reação foram incubadas por 20 minutos a 35°C. A reação foi paralisada pela adição de 2mL de  $Na_2CO_3$  0,5M e a absorbância das misturas de reação foram medidas em espectrofotômetro a 416nm. O tubo branco foi preparado adicionando-se a solução enzimática após a adição da solução de  $Na_2CO_3$ . Uma unidade de atividade de  $\beta$ -galactosidase foi definida como um  $\mu$ mol de ONP liberado por minuto.

### **3.4 Produção de $\beta$ -1,3-glucanase pela linhagem *Cellulosimicrobium cellulans* 191**

A produção de  $\beta$ -1,3-glucanase de *Cellulosimicrobium cellulans* 191 foi testada em frascos agitados e em fermentador de 5L.

#### **3.4.1 Produção de $\beta$ -1,3-glucanase em frascos agitados**

Para a produção de  $\beta$ -1,3-glucanase em frascos agitados e aletados, a cultura de 24h da linhagem de *Cellulosimicrobium cellulans* 191 foi pré-inoculada em frascos Erlenmeyer de 500mL contendo 100mL de meio de cultivo composto de 10g/L de parede celular de levedura comercial (Prodesa), 2,0g/L de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; 0,2g/L de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  em tampão fosfato de sódio 0,2M, pH 7,5 (SCOTT e SCHEKMAN, 1980) modificado por SOARES (2002). O pré-inóculo foi incubado a 30°C, 200rpm durante 24 horas. Após fermentação, alíquotas de 10mL de pré-inóculo foram transferidas assepticamente para frascos Erlenmeyer de 500mL aletados, contendo 90mL de meio de cultivo descrito acima. Após incubação durante 24 horas a 30°C e 200rpm, o meio de cultura foi centrifugado a 11000xg por 15 minutos a 5°C. A atividade de  $\beta$ -1,3 glucanase e protease no sobrenadante do meio de cultura foram determinadas como descrito nos itens 3.2.1 e 3.2.2, respectivamente. O sobrenadante do meio de cultivo foi utilizado como fonte de  $\beta$ -1,3-glucanase e foi denominado preparação enzimática bruta.

#### **3.4.2 Produção de $\beta$ -1,3-glucanase em fermentador de 5L**

Para a produção de  $\beta$ -1,3-glucanase pela linhagem *Cellulosimicrobium cellulans* 191 em fermentador New Brunswick Bioflow II de capacidade de 5L, utilizou-se 2700mL de meio de cultivo composto de 10g/L de parede celular de levedura comercial (Prodesa), 2,0g/L de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; 0,2g/L de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  em tampão fosfato de sódio 0,2M, pH 7,5 (SCOTT e SCHEKMAN, 1980) modificado por SOARES (2002), aeração de 1,5vvm, 200rpm e 30°C. Foi adicionado 300mL do pré-inóculo preparado como descrito no item anterior. Após incubação por 36 horas, o meio de cultura foi centrifugado a 11000xg por 15 minutos a 5°C. A atividade de  $\beta$ -1,3 glucanase e protease no sobrenadante do meio de

cultura foi determinada como descrito no item 3.2.1 e 3.2.2, respectivamente. O sobrenadante do meio de cultivo foi utilizado como fonte de  $\beta$ -1,3 glucanase.

### **3.5 Concentração da preparação enzimática bruta de $\beta$ -1,3-glucanase**

A preparação enzimática bruta de  $\beta$ -1,3-glucanase foi obtida por fermentação da linhagem de *Cellulosimicrobium cellulans* 191 em frascos aletados e agitados como descrito no item 3.4.1.

#### **3.5.1 Concentração da $\beta$ -1,3-glucanase por liofilização**

Um volume de 100mL da preparação enzimática bruta de  $\beta$ -1,3-glucanase, obtida de acordo com o item 3.4.1, foi concentrado em liofilizador Flexi-Dry FTS-System em um processo que ocorreu em 24 horas. A enzima liofilizada foi pesada e ressuspensa em tampão fosfato 0,05M, pH 6,5 para determinação da atividade. As atividades de  $\beta$ -1,3-glucanase e protease foram determinadas na preparação enzimática bruta de  $\beta$ -1,3-glucanase liofilizada como descrito nos itens 3.2.1 e 3.2.2, respectivamente.

#### **3.5.2 Concentração da $\beta$ -1,3-glucanase por ultrafiltração**

Um volume de 100mL da preparação enzimática bruta de  $\beta$ -1,3-glucanase, obtida de acordo com o item 3.4.1, foi concentrado cerca de 10 vezes a 4°C em ultrafiltrador Amicon mod. TCF2, usando-se membrana de retenção de 10 kDa. As atividades de  $\beta$ -1,3-glucanase e protease foram determinadas nas frações concentrada e filtrada como descrito nos itens 3.2.1 e 3.2.2, respectivamente.

#### **3.5.3 Concentração da $\beta$ -1,3-glucanase por fracionamento com sulfato de amônio**

Foi testada a concentração da preparação enzimática bruta de  $\beta$ -1,3-glucanase obtido de acordo com o item 3.4.1 por fracionamento com sulfato de amônio nas concentrações de 30%, 60% e 80% de saturação. Após adição do sulfato de amônio na concentração inicial, a amostra foi centrifugada por 15 minutos a 11000xg e 4°C. Ao sobrenadante foi adicionado sulfato de amônio até a concentração seguinte, sendo o

processo repetido subseqüentemente até obtenção de todas as frações. Estas frações foram denominadas preparações enzimáticas brutas concentradas com sulfato de amônio e foram dialisadas em membranas de celulose, durante 36 horas, em tampão fosfato de sódio 0,05M, pH 6,5 a 15°C.

Também foi testada a influência do processo de diálise na perda de atividade enzimática, nas frações precipitadas sucessivamente com 30%, 60% e 80% de saturação com sulfato de amônio. As atividades enzimáticas de  $\beta$ -1,3-glucanase e protease foram medidas nas frações logo após a precipitação e comparadas àquelas frações que permaneceram em diálise por 36 horas em tampão fosfato de potássio 0,05M, pH 6,5. As atividades de  $\beta$ -1,3-glucanase e protease foram determinadas nas frações conforme descrito nos itens 3.2.1 e 3.2.2, respectivamente.

#### **3.5.4 Concentração da $\beta$ -1,3-glucanase em tubos de diálise utilizando adsorventes**

Para concentração da enzima foram testados os polímeros amido modificado (Amidex G2100, Corn Products), zeólita (Kelco) e carboximetilcelulose (CMC) (Fluka, Sigma e Kelco) para adsorção de água, sais e compostos menores que 12 kDa. Amostras de 20mL da preparação enzimática bruta de  $\beta$ -1,3-glucanase foram transferidas para tubos de celulose para diálise, e estes últimos foram colocados em frascos béquer contendo os diferentes polímeros. Após 14 horas a 4°C as atividades de  $\beta$ -1,3-glucanase e protease foram determinadas como descrito anteriormente. Para as amostras em que houve adsorção quase completa da água o concentrado foi ressuspensão com tampão fosfato de sódio 0,05M, pH 6,5.

#### **3.5.5 Concentração da $\beta$ -1,3-glucanase com os solventes orgânicos acetona e etanol**

Amostras de 50mL da preparação enzimática bruta de  $\beta$ -1,3-glucanase foram adicionadas em iguais volumes dos solventes orgânicos acetona e etanol. As misturas foram mantidas a 4°C e centrifugadas a 11000xg por 15 minutos a 4°C. Os precipitados foram recolhidos e os solventes residuais foram evaporados. Os precipitados foram ressuspensos em tampão fosfato 0,1M, pH 6,5 e as atividades de  $\beta$ -1,3-glucanase e protease foram determinadas nas frações como descrito nos itens 3.2.1 e 3.2.2, respectivamente.

### **3.6 Purificação parcial da $\beta$ -1,3-glucanase**

#### **3.6.1 Fracionamento da $\beta$ -1,3-glucanase com sulfato de amônio 30% e dessalinização em coluna Sephadex PD10**

Uma alíquota de 100mL da preparação enzimática bruta de  $\beta$ -1,3-glucanase foi fracionada com 30% de sulfato de amônio conforme descrito no item 3.5.3. Para remoção de sais interferentes, 1mL da preparação enzimática bruta de  $\beta$ -1,3-glucanase concentrada obtida após precipitação com sulfato de amônio foi aplicada em uma coluna de exclusão Sephadex PD10 equilibrada com tampão Tris-HCl 0,05M pH 7,0, a 4°C e coletado 2mL da preparação enzimática bruta de  $\beta$ -1,3-glucanase dessalinizada. As atividades de  $\beta$ -1,3-glucanase e protease foram determinadas na fração conforme descrito nos itens 3.2.1 e 3.2.2, respectivamente.

#### **3.6.2 Purificação da $\beta$ -1,3-glucanase em coluna DEAE-Sephacel®**

A  $\beta$ -1,3-glucanase foi parcialmente purificada através de cromatografia em coluna de troca iônica DEAE-Sephacel® por FPLC. Aplicou-se 2mL da preparação enzimática bruta de  $\beta$ -1,3-glucanase dessalinizada obtida de acordo com o item anterior contendo 5,0U/mL de  $\beta$ -1,3 glucanase em coluna de DEAE Sephacel® (10cm x 10mm) previamente equilibrada com tampão 50mM Tris-HCl pH 7,2. As proteínas adsorvidas foram eluídas pela aplicação de 15mL do mesmo tampão usando-se gradiente de sal (0 a 1M de NaCl). As frações de 2mL foram coletadas a cada 2 minutos. O curso de eluição das proteínas foi acompanhado pela medida de absorbância a 280nm. As atividades enzimáticas de  $\beta$ -1,3-glucanase e protease foram determinadas como descrito nos itens 3.2.1 e 3.2.2, respectivamente. As frações contendo atividade de  $\beta$ -1,3-glucanase foram reunidas e testadas quanto ao efeito na lise da parede celular de *Kluyveromyces* sp. e extração de  $\beta$ -galactosidase. A concentração de proteína foi determinada pelo método de BRADFORD (1976) usando albumina bovina como padrão.



### **3.7 Estudo da influência de diferentes compostos na estabilidade da $\beta$ -1,3-glucanase a 45°C, 50°C e 55°C**

Foi testada a influência de diferentes compostos na estabilidade da  $\beta$ -1,3-glucanase após tratamento em diferentes temperaturas.

Amostras de misturas de reação contendo 2mL da preparação enzimática bruta de  $\beta$ -1,3-glucanase e 2mL de solução de diferentes compostos: Sacarose 1mM, Lactose 1mM, Maltose 1mM, Glicerina 10mM, Sulfato de Amônio 10mM, EDTA 10mM, Cisteína 10mM,  $\beta$ -mercaptoetanol 10mM, Gelatina 125mg/mL ou Albumina 125mg/mL na concentração final foram incubadas por 1 hora às temperaturas 45°C, 50°C e 55°C. Em seguida, foi adicionada 1mL da mistura de reação em tubos de ensaio contendo 1mL de suspensão de levedura *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus* padronizada com  $DO_{660nm}=1,680$ , preparada como descrito no item 3.2.4.2. Após incubação por 2 horas a 37°C, a redução da turbidez foi estimada pela medida da densidade ótica de leveduras como descrito no item 3.2.4 em espectrofotômetro a 660nm.

Posteriormente, foi testada a influência da cisteína em diferentes concentrações. Misturas de reação contendo 2mL da preparação enzimática bruta de  $\beta$ -1,3-glucanase e 2mL de solução de cisteína para diferentes concentrações finais do composto (1, 5, 10, 15 e 20mM) foram incubadas por 1 hora às temperaturas 45°C, 50°C e 55°C. A eficiência do tratamento foi medida pela redução da densidade ótica da suspensão de leveduras como descrito no item 3.2.4 em espectrofotômetro a 660nm.

### **3.8 Extração da $\beta$ -galactosidase intracelular de *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus* por diferentes métodos**

A extração da  $\beta$ -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus* foi testada pelos métodos químico (solventes orgânicos)<sup>1</sup>, enzimático ( $\beta$ -1,3-glucanase)<sup>2</sup>, físico (ultrasonicação)<sup>3</sup> e físico precedido de tratamento enzimático (ultrasonicação +  $\beta$ -1,3-glucanase)<sup>4</sup>. Em todos os tratamentos as atividades de  $\beta$ -galactosidase foi determinada utilizando lactose como substrato.

### **3.8.1 Extração da $\beta$ -galactosidase intracelular de *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus* por permeabilização com solventes orgânicos**

Alíquotas de 5mL do meio de cultura da levedura *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus* fermentado de acordo com o item 3.2.4.1 foram centrifugadas a 11000xg por 5 minutos a 4°C. As amostras de massa celular da levedura foram lavadas 2 vezes com tampão fosfato 0,1M, pH 7,0 e em seguida ressuspensas com tolueno ou etanol para as concentrações finais de 10, 20, 30, 40, 50 e 60%. As amostras foram incubadas a 25°C por 15 minutos (PANESAR *et al.*, 2007) e em seguida centrifugadas a 11000xg a 4°C por 5 minutos. Para determinação da atividade de  $\beta$ -galactosidase adicionou-se 5mL de solução 1% de lactose em tampão fosfato 0,1M, pH 7,0 às amostras de massa celular da levedura. As amostras foram incubadas a 30°C sob agitação a 100rpm durante 15 minutos. A concentração de glicose foi determinada pelo método de glicose oxidase, como descrito no item 3.2.3.1.

### **3.8.2 Extração da $\beta$ -galactosidase intracelular de *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus* utilizando-se $\beta$ -1,3-glucanase de *Cellulosimicrobium cellulans* 191**

Amostras de 2mL da suspensão celular da linhagem *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus* (4mg massa seca/mL) padronizadas conforme descrito no item 3.3.2 foram incubadas com preparações enzimáticas de  $\beta$ -1,3-glucanase bruta e purificada na concentração final de 0,1U/mL a 30°C, com agitação, em diferentes tempos. Após o tratamento as amostras foram centrifugadas a 11000xg durante 15 minutos a 5°C. A atividade da  $\beta$ -galactosidase foi determinada utilizando-se o substrato lactose como descrito no item 3.2.3.1.

### **3.8.3 Extração da $\beta$ -galactosidase intracelular de *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus* por ultrasonicação utilizando-se tratamento preliminar das leveduras com $\beta$ -1,3-glucanase de *Cellulosimicrobium cellulans* 191**

Amostras de 20mL de suspensão celular de *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus* (4mg massa seca/mL) padronizadas conforme descrito no item 3.3.2 foram incubadas com  $\beta$ -1,3-glucanase na concentração final de 0,1U/mL a 37°C, com agitação

durante 1 hora. Em seguida as suspensões foram resfriadas a 5°C e submetidas a tratamentos em ultrasonicador Lab-Line Tip Labsonic Systems a 180-200 Watts por 20 segundos, 3 vezes. As amostras foram resfriadas em banho de gelo após cada tratamento com o ultrasonicador. Após o tratamento as amostras foram centrifugadas a 11000xg durante 15 minutos a 5°C e o sobrenadante utilizado como preparação enzimática bruta de  $\beta$ -galactosidase.

Também foi testada a extração da  $\beta$ -galactosidase utilizando-se somente tratamento em ultrasonicador a 180-200 watts por períodos de 20 segundos por 3 vezes. As amostras foram resfriadas após cada tratamento com o ultrasonicador. A atividade da  $\beta$ -galactosidase foi determinada como descrito no item 3.2.3.1 utilizando-se lactose como substrato.

### **3.9 Aplicação da $\beta$ -1,3-glucanase bruta e purificada na lise da levedura *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus* e formação de protoplasto**

As preparações enzimáticas bruta e purificada de  $\beta$ -1,3-glucanase foram testadas quanto à capacidade de lisar a parede celular da levedura *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus*. A levedura foi fermentada como descrito no item 3.2.4.1 e as células foram padronizadas como descrito no item 3.2.4.2. Alíquotas de 2mL de suspensão padronizada de levedura foram centrifugadas a 11000xg durante 15 minutos a 5°C e a massa celular precipitada foi ressuspensa em 4mL da solução de pré-tratamento contendo EDTA 0,02M,  $\beta$ -mercaptoetanol 0,1M e tampão Tris-HCl pH 7,8 e as suspensões foram incubadas por 15 minutos a 35°C. Foi testada também a formação de protoplastos sem adição de  $\beta$ -mercaptoetanol. Após a incubação as células foram novamente precipitadas e lavadas 1 vez com o estabilizante osmótico KCl 0,6M. A suspensão celular foi novamente centrifugada e o sobrenadante foi descartado. As células foram então ressuspensas em 2mL de solução tampão citrato-fosfato pH 5,8 contendo partes iguais de citrato de sódio 0,016M e  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,08M e 0,2mL de solução enzimática de  $\beta$ -1,3-glucanase para concentração final igual a 0,1U/mL. Foram testadas a preparação enzimática bruta, preparação enzimática bruta concentrada por fracionamento com sulfato de amônio 30% de saturação e preparação enzimática purificada de  $\beta$ -1,3-glucanase. As suspensões celulares foram incubadas a 35°C por 1 hora e a formação de protoplastos foi acompanhada em microscópio ótico. A

formação de protoplastos foi confirmada observando-se o rompimento dos mesmos após a adição de uma gota de água sobre a superfície da lâmina ao microscópio ótico com aumento de 1000 vezes (imersão).

### **3.10 Estudo da influência da temperatura e do pH na atividade e estabilidade da $\beta$ -galactosidase da preparação enzimática bruta de *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus***

#### **3.10.1 Determinação da temperatura ótima e pH ótimo de atividade da $\beta$ -galactosidase bruta através de planejamento experimental**

No planejamento experimental realizado para obtenção da temperatura e pH ótimos para a atividade da  $\beta$ -galactosidase foram realizados 12 ensaios, em um planejamento fatorial  $2^n + 3$  pontos centrais, onde n é o número de variáveis independentes conforme metodologia descrita por NETO *et al.* (2001).

Para a produção de  $\beta$ -galactosidase, a linhagem de *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus* foi fermentada como descrito no item 3.2.4.1. Após incubação a massa celular foi lavada 3 vezes com água destilada e ressuspensa em água destilada para uma  $DO_{660nm}$  igual a 5,00. A suspensão celular foi submetida a três tratamentos em ultrasonicador por 20 segundos e resfriada imediatamente após cada tratamento. A suspensão foi centrifugada a 11000xg por 5 minutos a 4°C e o sobrenadante utilizado como preparação enzimática bruta de  $\beta$ -galactosidase.

Para o ensaio, 0,1mL de preparação enzimática bruta de  $\beta$ -galactosidase foi adicionada a 0,9mL de solução 0,5mM de ONPG preparado em um dos tampões utilizados: 1) citrato-fosfato 0,05M pH 6,0; 2) citrato-fosfato 0,05M pH 6,6; 3) fosfato 0,05M pH 7,0; 4) Tris-HCl 0,05 pH 7,4; Tris-HCl 0,05M pH 8,0. A mistura de reação foi incubada por 20 minutos a diferentes temperaturas, de acordo com o definido pelo planejamento. Foi adicionado 2mL de  $Na_2CO_3$  0,6M aos tubos de ensaio para paralisar a reação como descrito no item 3.2.3.2. A absorbância foi medida a 416nm. O tubo branco foi preparado adicionando-se a solução de enzima depois da adição da solução de  $Na_2CO_3$  0,6M.

### **3.10.2 Determinação do pH e da temperatura de estabilidade da $\beta$ -galactosidase**

Para determinação do pH de estabilidade da  $\beta$ -galactosidase da linhagem *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus*, a preparação enzimática foi obtida conforme descrito no item 3.10.1. Alíquotas de 100 $\mu$ L da preparação enzimática foram adicionadas em tubos de ensaio contendo 200 $\mu$ L dos tampões: 1) citrato-fosfato 0,05M para pH 3,5 a 6,5; 2) fosfato 0,05M para pH 7,0; 3) Tris-HCl 0,05 para pH 7,5 a 9,0. As misturas de reação foram incubadas por 30 minutos a 35°C. Após incubação adicionou-se 0,5mL de tampão fosfato 0,2M para pH 7,0. E a atividade de  $\beta$ -galactosidase foi medida conforme descrito no item 3.2.3.2 utilizando-se ONPG como substrato.

Para determinação da temperatura de estabilidade da  $\beta$ -galactosidase da linhagem *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus*, a preparação enzimática foi produzida conforme descrito no 3.10.1. Alíquotas de 100 $\mu$ L da preparação enzimática foram adicionados em tubos de ensaio contendo 700 $\mu$ L do tampão fosfato 0,2M pH 7,0. Os tubos foram submetidos a diferentes temperaturas (5, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 e 50°C) durante 1 hora. A atividade de  $\beta$ -galactosidase foi medida na mistura de reação conforme descrito no item 3.2.3.2 utilizando o substrato ONPG.

### **3.11 Produção e purificação da $\beta$ -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus***

#### **3.11.1 Produção de $\beta$ -galatosidase de *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus***

A massa celular de *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus* foi preparada de acordo com o item 3.2.4.1. Em seguida a massa celular foi ressuspensa em 30mL de água destilada. A suspensão celular foi padronizada ( $DO_{660nm}=5,0$ ) e submetida a tratamento em ultrasonicador por 20 segundos a 180-200 watts. O processo foi repetido 3 vezes com resfriamento em banho de gelo após cada tratamento, para evitar aquecimento excessivo. Em seguida a suspensão foi centrifugada a 11000xg por 5minutos a 5°C e o sobrenadante foi utilizado como preparação enzimática bruta de  $\beta$ -galactosidase.

### **3.11.2 Fracionamento da $\beta$ -galactosidase com sulfato de amônio 60%**

A preparação enzimática bruta de  $\beta$ -galactosidase obtida de acordo com o item anterior foi fracionada com sulfato de amônio 60% de saturação. Após adição do sulfato de amônio, a amostra foi centrifugada por 15 minutos a 11000xg e 4°C. O precipitado foi dialisado em tampão fosfato 0,05M, pH 7,0 e a atividade de  $\beta$ -galactosidase foi determinada utilizando-se os substratos lactose e ONPG conforme descrito nos itens 3.2.3.1 e 3.2.3.2, respectivamente.

### **3.11.3 Purificação da $\beta$ -galactosidase em coluna DEAE-Sephacel®**

A preparação enzimática concentrada com sulfato de amônio 60% e dialisada foi purificada através de cromatografia em coluna de troca iônica DEAE-Sephacel® em equipamento FPLC. Aplicou-se 2mL de preparação enzimática concentrada com sulfato de amônio 60% e dialisada contendo 4600U de  $\beta$ -galactosidase em coluna de DEAE Sephacel® (10mL) previamente equilibrada com tampão fosfato 0,05M, pH 7,0. As proteínas adsorvidas foram eluídas pela aplicação de 15mL do mesmo tampão utilizando-se gradiente de sal (0 a 1M de NaCl). As frações de 2mL foram coletadas a cada minuto. O curso de eluição das proteínas foi acompanhado pela medida de absorvância a 280nm. A atividade de  $\beta$ -galactosidase foi determinada utilizando-se os substratos lactose e ONPG conforme descrito nos itens 3.2.3.1 e 3.2.3.2, respectivamente. As frações contendo atividade de  $\beta$ -galactosidase foram reunidas para a determinação da atividade enzimática. A concentração de proteína foi determinada pelo método de BRADFORD (1976) usando albumina bovina como padrão.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Seleção da levedura melhor produtora de $\beta$ -galactosidase

A seleção da levedura melhor produtora de  $\beta$ -galactosidase foi testada como descrito no item 3.3. A **Tabela 1** mostra que as linhagens *Kluyveromyces drosophilarius*, *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces marxianus* NRRL 7571, *Kluyveromyces marxianus* NRRL 1196 e *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus* apresentaram atividade de  $\beta$ -galactosidase, respectivamente, iguais a 0,06; 29,29; 42,09; 63,85 e 67,76U/mL/min quando suspensões padronizadas foram submetidas a lise pela preparação enzimática bruta de  $\beta$ -1,3-glucanase durante 1 hora a 37°C. A linhagem de levedura *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus*, que apresentou maior atividade de  $\beta$ -galactosidase, foi selecionada para o estudo de lise de leveduras utilizando enzimas líticas da bactéria *Cellulosimicrobium cellulans* 191. Os resultados da atividade da  $\beta$ -galactosidase das leveduras apresentaram diferença significativa entre si pelo teste Tukey a um nível de confiança de 95%.

**Tabela 1.** Produção de  $\beta$ -galactosidase por diferentes linhagens de leveduras do gênero *Kluyveromyces*

Linhagem	Atividade de $\beta$ -galactosidase* (U/mL/min)
<i>Kluyveromyces drosophilarius</i>	0,06 <sub>a</sub>
<i>Kluyveromyces lactis</i>	29,29 <sub>b</sub>
<i>Kluyveromyces marxianus</i> NRRL 7571	42,09 <sub>c</sub>
<i>Kluyveromyces marxianus</i> NRRL 1196	63,85 <sub>d</sub>
<i>Kluyveromyces marxianus</i> var. <i>bulgaricus</i>	67,76 <sub>e</sub>

\*Utilizando-se o substrato ONPG

Apesar de diferentes bactérias, fungos e leveduras serem consideradas fontes potenciais de  $\beta$ -galactosidase, as leveduras do gênero *Kluyveromyces* são preferidas como fonte da enzima  $\beta$ -galactosidase para processamento de produtos lácteos por possuir baixo custo de produção e pelos status GRAS (Generally Recognized as Safed) (WIERZBICKI e KOSOKOWSKI, 1971; MAHONEY e WILDER, 1989).

Segundo alguns autores (BELEM e LEE, 1998; PINHEIRO *et al.*, 2003), a linhagem *Kluyveromyces marxianus* oferece grandes vantagens em relação a outras

linhagens como a *K. lactis* e *K. fragilis* por apresentar rápido crescimento, por ser um organismo seguro e por possuir uma alta atividade de  $\beta$ -galactosidase quando a lactose é utilizada como substrato.

As linhagens *Kluyveromyces marxianus* podem crescer até na temperatura de 52°C (BELEM e LEE, 1998) e produzir várias enzimas termoestáveis, incluindo a  $\beta$ -galactosidase quando crescem em meio com lactose a 35°C e pH 5,5 (RAJOKA *et al.*, 2004a).

RAJOKA *et al.* (2004b) estudaram a cinética de produção de  $\beta$ -galactosidase da linhagem mutante de *Kluyveromyces marxianus* NIBGE Y-1 resistente à cicloheximida e obtiveram máxima produção da enzima e atividade específica a 35°C. A  $\beta$ -galactosidase apresentou atividade ótima a 60°C e pH 5,0-7,0.

O'CONNELL e WALSH (2007) estudaram a produção da  $\beta$ -galactosidase da levedura *Kluyveromyces marxianus* DSM5418 em meio contendo 10% de lactose, 0,3%  $K_2HPO_4$  (p/v), 0,5% de extrato de levedura (p/v) e 0,3% NaOH 5N (v/v) em pH 4,5. A suspensão de levedura foi submetida a tratamento com sonicador (Soniprep 150 probe sonicador) e o sobrenadante contendo 9,56U/mL de atividade de  $\beta$ -galactosidase foi utilizado como extrato enzimático bruto. O microrganismo *Kluyveromyces marxianus* DSM5418 demonstrou ser um grande produtor da enzima.

## **4.2 Produção de $\beta$ -1,3-glucanase pela linhagem *Cellulosimicrobium cellulans* 191**

### **4.2.1 Produção de $\beta$ -1,3-glucanase em frascos agitados**

Na fermentação da linhagem *Cellulosimicrobium cellulans* 191 em frascos Erlenmeyer aletados contendo meio de cultivo composto de 10g/L de parede celular de levedura comercial (Prodesa), 2,0g/L de  $(NH_4)_2SO_4$ ; 0,2g/L de  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  em tampão fosfato 0,2M, pH 7,5 (SOARES, 2002) a 30°C e 200rpm de agitação foram obtidos 0,724U/mL de  $\beta$ -1,3-glucanase utilizando-se laminarina como substrato e 0,120U/mL de protease utilizando-se caseína como substrato, correspondendo a atividade específica igual a 7,77U/mg de proteína e 1,29U/mg de proteína, respectivamente (**Tabela 2**).



**Tabela 2.** Produção de  $\beta$ -1,3-glucanase e protease pela linhagem *Cellulosimicrobium cellulans* 191 em frascos agitados e em fermentador.

Condições dos ensaios de produção enzimática	$\beta$ -1,3-glucanase		Protease	
	Atividade enzimática (U/mL)	Atividade específica (U/mg)	Atividade enzimática (U/mL)	Atividade específica (U/mg)
<i>Frascos agitados</i>	0,724	7,77	0,120	1,29
<i>Fermentador Bioflo II</i>	0,351	6,88	0,064	1,25

A atividade de  $\beta$ -1,3-glucanase 0,724U/mL, obtida neste trabalho, na fermentação da linhagem *Cellulosimicrobium cellulans* 191 em frascos aletados agitados foi similar aos resultados de SOARES (2002) na fermentação da linhagem *Cellulomonas cellulans* 191 em que foi obtido 0,70U/mL após 24 h de fermentação a 30°C. Comparativamente foi obtido maior atividade de  $\beta$ -1,3-glucanase em relação aos resultados descritos por FERRO (2002) no qual foi obtido 0,14U/mL na fermentação da linhagem de *Cellulomonas cellulans* 191 em meio de cultivo contendo 1,5% de levedura seca, 0,2% de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 1,36% de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,42% de KOH, 0,02% de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,0001% de  $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ; 0,0001% de biotina e 0,0001% de tiamina e menor atividade em relação aos resultados citados por FLEURI (2006) onde foi detectado 1,14U/mL na fermentação do microrganismo no meio de cultivo descrito por SOARES (2002).

#### 4.2.2 Produção de $\beta$ -1,3-glucanase em fermentador de 5L

Na produção de  $\beta$ -1,3-glucanase em fermentador de 5L contendo meio de cultivo composto de 10g/L de parede celular de levedura comercial (Prodesa), 2,0g/L de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; 0,2g/L de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  em tampão fosfato 0,2M, pH 7,5 (SOARES, 2002) a 30°C e 200rpm de agitação obteve-se uma atividade enzimática igual a 0,351U/mL utilizando-se laminarina como substrato e atividade específica igual a 6,88U/mg de proteína. O sobrenadante do meio de cultivo apresentou atividade de 0,064U/mL de protease e atividade específica igual a 1,25U/mg de proteína (**Tabela 2**). Verificou-se assim uma produção de  $\beta$ -1,3-glucanase e protease 2,06 e 1,87 vezes maior em frascos aletados agitados do que em fermentador, respectivamente.

FERRO (2002) comparou a produção de  $\beta$ -1,3-glicanase da linhagem *Cellulomonas cellulans* YLM-191-1 em fermentador, frascos aerados e frascos agitados contendo meio de cultivo composto de caldo TYMC (SHIMOI *et al.*, 1991) composto de 5g Trypticase- peptona, 3g de extrato de levedura Difco, 3g de extrato de malte Difco, 0,12g de catalase , 5,8g de  $K_2HPO_4$ , 1,15 g de  $NH_4H_2PO_4$  , 0,264g de  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ .  $H_2O$  por litro e obteve 0,11; 0,13 e 0,14U/mL, respectivamente.

FLEURI (2006) estudou a produção das enzimas  $\beta$ -1,3-glicanase, protease e quitinase pela linhagem *Cellulosimicrobium cellulans* 191 em frascos agitados e fermentador, em meio de cultivo composto de 10g/L de parede celular de levedura comercial, 2,0g/L de  $(NH_4)_2SO_4$ ; 0,2g/L de  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  em tampão fosfato 0,2M, pH 7,5 (SOARES, 2002) a 30°C e 200rpm de agitação. Na fermentação do microrganismo em frascos agitados e fermentador de 5L foi obtida atividade de  $\beta$ -1,3-glicanase igual a 1,14 e 0,72U/mL, respectivamente, após 24 horas de fermentação. Verificou-se que a produção de  $\beta$ -1,3-glicanase em frascos agitados foi quase 1,6 vezes maior que em fermentador. O autor relatou que não foi detectada atividade de protease ou quitinase no sobrenadante do meio obtido em fermentador. No entanto, no presente trabalho, detectou-se 0,120 e 0,064U/mL de protease após fermentação de *Cellulosimicrobium cellulans* 191 em frascos agitados e fermentador BioFlo II, respectivamente.

### **4.3 Concentração da $\beta$ -1,3-glicanase de *Cellulosimicrobium cellulans* 191**

#### **4.3.1 Concentração da $\beta$ -1,3-glicanase por liofilização**

A preparação enzimática bruta de  $\beta$ -1,3-glicanase foi liofilizada conforme descrito no item 3.5.1. As atividades de  $\beta$ -1,3-glicanase e protease foram determinadas como descrito nos itens 3.2.1 e 3.2.2, respectivamente.

A preparação enzimática bruta liofilizada apresentou 0,56U/mL de  $\beta$ -1,3-glicanase e 0,08U/mL de protease, correspondendo a uma atividade específica de 6,02 e 0,86U/mL de proteína, respectivamente. Obteve-se recuperação de 77% da atividade de  $\beta$ -1,3-glicanase e 67% de protease em relação à preparação enzimática bruta (**Tabela 3**).

**Tabela 3.** Concentração da preparação enzimática bruta produzida pela linhagem *Cellulosimicrobium cellulans* 191 por liofilização.

Preparações enzimáticas	β-1,3-glucanase			Protease		
	Atividade enzimática (U/mL)	Atividade específica (U/mg)	Recuperação %	Atividade enzimática (U/mL)	Atividade específica (U/mg)	Recuperação %
Preparação enzimática bruta	0,724	7,78	100	0,120	1,29	100
Preparação enzimática liofilizada	0,560	6,02	77	0,080	0,86	67

O processo de liofilização tem sido descrito como método a ser utilizado após a purificação enzimática, para manutenção da atividade durante armazenamento.

FERRO (2002) utilizou a liofilização como primeira etapa de purificação da β-1,3-glucanase de *Cellulomonas cellulans* YLM-B191-1. Um volume de 4.000mL do sobrenadante do meio de cultivo resultou em 92g de pó liofilizado, contendo 352U totais de β-1,3-glucanase, o qual foi utilizado como preparação enzimática bruta de β-1,3-glucanase. A preparação enzimática bruta liofilizada das enzimas líticas apresentou 61,5% de atividade residual após 30 horas à temperatura ambiente. Quando acondicionada a baixas temperaturas (congelador), a atividade de β-1,3-glucanase manteve-se estável por mais de 6 meses.

#### 4.3.2 Concentração da β-1,3-glucanase por ultrafiltração

A preparação enzimática bruta foi concentrada por ultrafiltração em membrana de retenção de 10 kDa conforme descrito no item 3.5.2.

Neste processo, a preparação enzimática bruta foi fracionada em duas partes. A primeira definida como preparação enzimática concentrada por ultrafiltração ou aquela que foi retida pela membrana de retenção de 10 kDa e a segunda, definida como preparação enzimática ultrafiltrada.

A preparação enzimática ultrafiltrada apresentou 1,705U/mL de β-1,3-glucanase e 0,601U/mL de protease, correspondendo a uma atividade específica de 20,48 e 7,23U/mg

de proteína, respectivamente (**Tabela 4**). Foi obtida recuperação de 23% e 50% da atividade de  $\beta$ -1,3-glucanase e protease, respectivamente.

Não foi detectada, pela metodologia utilizada, nenhuma atividade de  $\beta$ -1,3-glucanase na preparação enzimática ultrafiltrada. Porém, apresentou 0,01U/mL de atividade de protease e atividade específica de 1,00U/mg, indicando que frações desta enzima com massa molecular menor que 10 kDa são produzidas pela linhagem *Cellulosimicrobium cellulans* 191. Foi obtida recuperação de 8% da atividade de protease na preparação enzimática concentrada por ultrafiltração.

**Tabela 4.** Concentração da preparação enzimática bruta produzida pela linhagem *Cellulosimicrobium cellulans* 191 por ultrafiltração

Preparações enzimáticas	$\beta$ -1,3-glucanase			Protease		
	Atividade enzimática (U/mL)	Atividade específica (U/mg)	Recuperação %	Atividade enzimática (U/mL)	Atividade específica (U/mg)	Recuperação %
<i>Bruta</i>	0,724	7,77	100	0,120	1,29	100
<i>Concentrada por ultrafiltração</i>	1,705	20,48	23	0,601	7,23	50
<i>Ultrafiltrada</i>	0,000	0,00	0	0,010	1,00	8

FERRO (2002) utilizou o sobrenadante do meio de cultura de *Cellulomonas cellulans* YLM-B191-1 liofilizado contendo 1% de parede celular de levedura como preparado enzimático bruto de  $\beta$ -1,3-glucanase para ultrafiltração. A enzima foi fracionada em ultrafiltrador Amicon mod. TCF2, com membrana de retenção de 30 kDa (Amicon Corp. Danvers, Mass). A porção retida pela membrana (10mL) foi dialisada contra o mesmo tampão a 5°C durante 10 horas. Esta porção dialisada foi novamente fracionada por ultrafiltração em membrana de 30 kDa e seu volume final foi concentrado para 3,6mL. A preparação enzimática bruta obtida após 24 horas de fermentação apresentou 0,70U/mL de  $\beta$ -1,3-glucanase sendo que somente 4,47% da atividade inicial foi recuperada no experimento.

### 4.3.3 Concentração da $\beta$ -1,3-glicanase por fracionamento com sulfato de amônio

A concentração da preparação enzimática bruta por fracionamento com sulfato de amônio foi testada conforme descrito no item 3.5.3 seguido de diálise para dessalinização das amostras. Posteriormente foi testada a influência do processo de diálise em membrana de celulose para a conservação da atividade da enzima purificada.

No fracionamento sucessivo da preparação enzimática bruta com sulfato de amônio a 30%, 60% e 80% de saturação seguido de diálise foram obtidos recuperações de 85%, 1% e 0% na atividade da  $\beta$ -1,3-glicanase e atividades específicas iguais a 14,20; 0,22 e 0,00U/mg de proteína, respectivamente. Em relação à atividade de protease nas frações obtidas através do fracionamento sucessivo com sulfato de amônio 30%, 60% e 80% de saturação seguida de diálise foram obtidas recuperações de 22%, 30% e 0% e atividades específicas de 0,60U/mg, 0,93U/mg e 0,0U/mg de proteína, respectivamente (**Tabela 5**).

**Tabela 5.** Concentração da preparação enzimática bruta de  $\beta$ -1,3-glicanase por fracionamento sucessivo com sulfato de amônio seguido de diálise.

	$\beta$ -1,3-glicanase			Protease		
	Atividade específica (U/mg)	Grau de purificação	Recuperação (%)	Atividade específica (U/mg)	Grau de purificação	Recuperação (%)
<i>Preparação enzimática bruta</i>	7,77	1,00	100	1,29	1,00	100
30%	14,20	1,83	85	0,60	0,47	22
60%	0,22	0	1	0,93	0,72	30
80%	0,00	0	0	0,00	0	0

No estudo da influência do processo de diálise das amostras precipitadas com sulfato de amônio na atividade da  $\beta$ -1,3-glicanase e da protease, as amostras obtidas por fracionamento sucessivo com sulfato de amônio a 30%, 60% e 80% de saturação e que não foram submetidas a diálise apresentaram recuperação, respectivamente, iguais a 95%, 4% e 1% para a  $\beta$ -1,3-glicanase e 43%, 52% e 5% para protease em relação à preparação enzimática bruta. As frações apresentaram, respectivamente, atividades específicas iguais a

15,90; 0,69 e 0,71U/mg de proteína para a  $\beta$ -1,3-glucanase e 1,19; 1,59 e 0,55U/mg de proteína para protease (**Tabela 6**).

Na concentração da preparação enzimática bruta com sulfato de amônio 80% de saturação e sem diálise foi obtido recuperação de 93% da atividade de  $\beta$  -1,3-glucanase e 95% para protease.

**Tabela 6.** Concentração da preparação enzimática bruta de  $\beta$ -1,3-glucanase por fracionamento sucessivo com sulfato de amônio sem diálise.

	$\beta$ -1,3-glucanase			Protease		
	Atividade específica (U/mg)	Grau de purificação	Recuperação (%)	Atividade específica (U/mg)	Grau de purificação	Recuperação (%)
<i>Preparação enzimática bruta</i>	7,77	1,00	100	1,29	1	100
30%	15,90	2,05	95	1,19	0,92	43
60%	0,69	0,09	4	1,59	1,23	52
80%	0,71	0,09	1	0,55	0,43	5

O processo de diálise resultou na perda da atividade da  $\beta$ -1,3-glucanase e da protease. A temperatura de diálise da enzima parece ser decisiva neste processo. A  $\beta$ -1,3-glucanase perdeu sua atividade rapidamente durante a diálise em temperaturas próximas a 15°C. Pode-se observar que quando se realizou o fracionamento com sulfato de amônio sem a diálise a atividade de  $\beta$ -1,3-glucanase se manteve. O processo de diálise parece ter um efeito importante para a perda das atividades enzimáticas, o que pode ser observado tanto para a  $\beta$ -1,3-glucanase quanto para a protease.

Com relação ao fracionamento da  $\beta$ -1,3-glucanase com sulfato de amônio, verificou-se que utilizando-se 30% de saturação, a maior parte da  $\beta$ -1,3-glucanase é separada da protease.

FLEURI (2003) fracionou a preparação enzimática bruta do microrganismo *Cellulomonas cartae* n°191 cultivado em meio contendo 10g/L de parede celular de levedura comercial, 2,0g/L de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 0,2g/L de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O em tampão fosfato de

sódio 0,2M, pH 7,5 (SOARES, 2002) com sulfato de amônio a 40%, 60% e 80% de saturação. Somente a fração 40% apresentou atividade de  $\beta$ -1,3-glucanase, o que correspondeu a 0,09U/mL. A protease foi detectada nas frações 60% e 80% correspondendo a 10,45 e 2,49U/mL, respectivamente. Segundo o autor, 60% de saturação com sulfato de amônio foi adequado para precipitar a protease lítica produzida pela linhagem 191 em meio de cultura otimizado para a produção de protease contendo 2,0g/L  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0,2g/L  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  e 80g/L de levedura seca instantânea em tampão fosfato 0,15M pH 8,0 (SANTOS, 2004). A preparação enzimática obtida apresentou 11,94U/mL de protease porém não continha atividade de  $\beta$ -1,3-glucanase.

#### **4.3.4 Concentração da $\beta$ -1,3-glucanase em tubos de diálise utilizando adsorventes**

O estudo da concentração da preparação enzimática bruta da  $\beta$ -1,3-glucanase utilizando-se tubos de diálise e adsorventes para a remoção de água foi realizado conforme descrito no item 3.5.4.

A **Tabela 7** ilustra a porcentagem de recuperação da  $\beta$ -1,3-glucanase utilizando-se tubos de diálise e diferentes adsorventes para a remoção de água. Foram obtidos melhores resultados utilizando-se carboximetilcelulose (CMC) Sigma, polímero Zeólita e carboximetilcelulose Fluka, com recuperação de 96%, 91% e 90% da  $\beta$ -1,3-glucanase, respectivamente. As preparações enzimáticas brutas concentradas com CMC Sigma, polímero Zeólita e CMC Fluka apresentaram, respectivamente, atividade específica de  $\beta$ -1,3-glucanase iguais a 7,44; 7,09 e 7,00U/mg de proteína. A preparação enzimática foi concentrada 6,38 vezes com recuperação de 96% utilizando-se o adsorvente CMC da Sigma.

**Tabela 7.** Concentração da  $\beta$ -1,3-glucanase da preparação enzimática bruta produzida por *Cellulosimicrobium cellulans* 191 utilizando-se tubos de diálise e diferentes polímeros para a adsorção de água.

Polímero para adsorção de água	Atividade de $\beta$ -1,3-glucanase (U/mL)	Atividade específica (U/mg)	Recuperação (%)	Concentração (número de vezes)
<i>Controle</i>	0,724	7,77	100	1,00
<i>Amido modificado</i>	0,458	3,44	44	0,63
<i>Zeólita</i>	1,200	7,09	91	1,66
<i>CMC (Fluka)</i>	1,450	7,00	90	2,00
<i>CMC (Kelco)</i>	4,023	6,48	83	5,56
<i>CMC (Sigma)</i>	4,620	7,44	96	6,38

A **Tabela 8** ilustra a porcentagem de recuperação da protease durante o mesmo processo. Foi verificada maior recuperação da protease utilizando-se CMC Fluka, amido e polímero Zeólita com 64%, 33% e 26%, respectivamente. As preparações enzimáticas concentradas com CMC Fluka, amido modificado, polímero Zeólita, CMC Kelco, e CMC Sigma apresentaram atividades específicas, respectivamente, iguais a 1,45; 0,75; 0,59; 0,32 e 0,32U/mg de proteína.

**Tabela 8.** Concentração da protease da preparação enzimática bruta produzida por *Cellulosimicrobium cellulans* 191 utilizando-se tubos de diálise e diferentes polímeros para a adsorção de água.

Polímero para adsorção de água	Atividade de Protease (U/mL)	Atividade específica (U/mg)	Recuperação (%)	Concentração (nº de vezes)
<i>Controle</i>	0,210	2,25	100	1,00
<i>Amido modificado</i>	0,101	0,75	33	0,48
<i>Zeólita</i>	0,109	0,59	26	0,52
<i>CMC (Fluka)</i>	0,312	1,45	64	1,48
<i>CMC (Kelco)</i>	0,203	0,32	14	0,97
<i>CMC (Sigma)</i>	0,207	0,32	14	0,98



Entre os adsorventes de água testados para a concentração da preparação enzimática bruta foi obtido melhor resultado utilizando-se CMC Sigma, com concentração e recuperação de  $\beta$ -1,3-glucanase igual a 6,38 vezes e 96%, respectivamente. Utilizando-se este adsorvente foi obtido recuperação de 14% da atividade de protease. A baixa atividade de protease no concentrado é desejável uma vez que pode evitar a desnaturação da  $\beta$ -1,3-glucanase.

A temperatura utilizada na concentração das preparações enzimáticas brutas em tubos de diálise e adsorventes de água afetou a atividade de  $\beta$ -1,3-glucanase e protease. A concentração deve ser realizada em baixas temperaturas próximas a 2-4°C, para evitar a perda da atividade de  $\beta$ -1,3-glucanase.

#### **4.3.5 Concentração da $\beta$ -1,3-glucanase com os solventes orgânicos acetona e etanol**

A concentração da preparação enzimática bruta usando solventes orgânicos foi testada como descrito no item 3.5.5.

A preparação enzimática obtida por precipitação com acetona apresentou atividade específica de  $\beta$ -1,3-glucanase igual a 0,64U/mg de proteína e 8% de recuperação da enzima. E atividade específica de protease de 0,54U/mg de proteína e recuperação de 24%.

A preparação enzimática obtida por precipitação com etanol apresentou atividade específica e recuperação de 0,54U/mg de proteína e 7%, respectivamente, para a enzima  $\beta$ -1,3-glucanase; e atividade específica de 0,48U/mg de proteína e recuperação de 21% para a protease (**Tabela 9**).

**Tabela 9.** Concentração da  $\beta$ -1,3-glicanase e protease da preparação enzimática bruta produzida por *Cellulosimicrobium cellulans* 191 utilizando-se os solventes orgânicos acetona e etanol.

	<i><math>\beta</math>-1,3-glicanase</i>			<i>Protease</i>		
	Atividade enzimática (U/mL)	Atividade específica (U/mg)	Recuperação (%)	Atividade enzimática (U/mL)	Atividade específica (U/mg)	Recuperação (%)
Preparação enzimática bruta	0,724	7,77	100	0,210	2,25	100
Acetona	0,060	0,64	8	0,050	0,54	24
Etanol	0,050	0,54	7	0,045	0,48	21

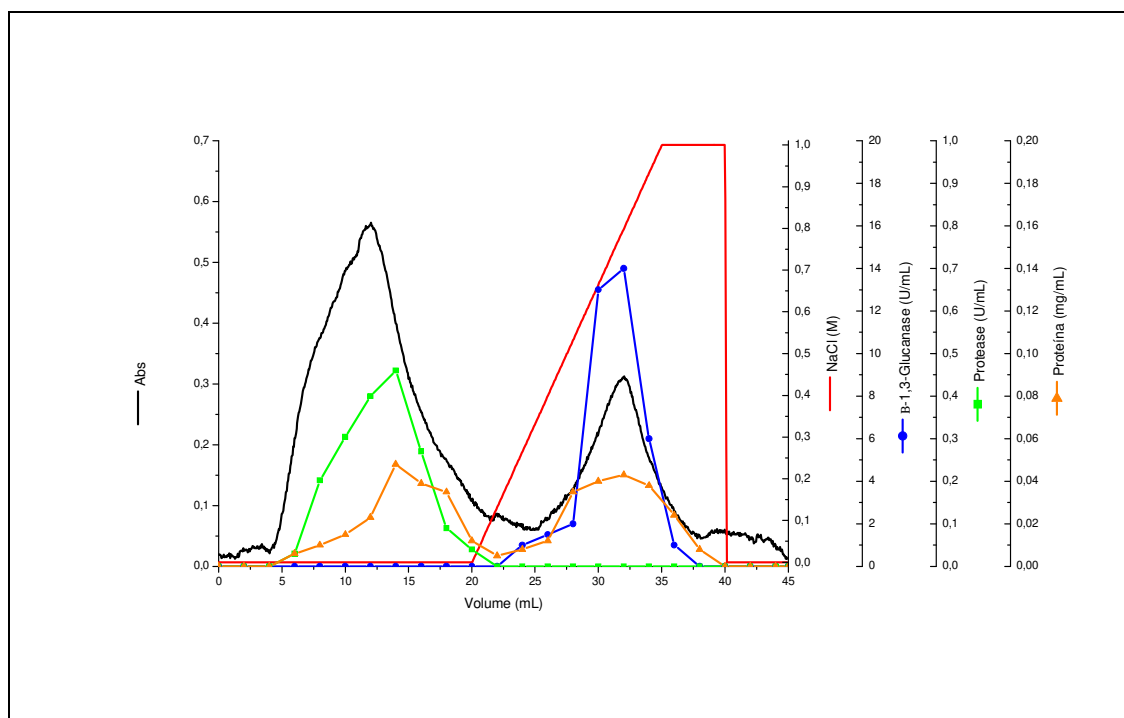
#### 4.4 Purificação da $\beta$ -1,3-glicanase

##### 4.4.1 Fracionamento da preparação enzimática bruta de *Cellulosimicrobium cellulans* 191 com sulfato de amônio 30% e dessalinização em coluna Sephadex PD10

A preparação enzimática bruta de  $\beta$ -1,3-glicanase foi fracionada com sulfato de amônio 30% e dessalinizada em coluna Sephadex PD10 conforme descrito no item 3.6.1. A preparação enzimática dessalinizada apresentou atividade específica de  $\beta$ -1,3-glicanase e protease iguais a 9,9 e 0,79U/mg de proteína; sendo obtidas recuperações de 63% e 65%, respectivamente.

##### 4.4.2 Purificação da $\beta$ -1,3-glicanase em coluna DEAE-Sephacel®

A **Figura 1** e a **Tabela 10** ilustram a purificação da  $\beta$ -1,3-glicanase de *Cellulosimicrobium cellulans* 191 em coluna de DEAE-Sephacel® equilibrada em tampão Tris-HCl 0,01M, pH 7,2, em sistema FPLC. Foram detectados dois picos de proteínas principais sendo que o pico 1 contendo atividade de protease foi eluído da coluna com o tampão Tris-HCl 0,01M, pH 7,2. O pico 2 contendo atividade de  $\beta$ -1,3 glicanase foi eluído com a aplicação do gradiente de sal, na concentração 0,8M NaCl. A  $\beta$ -1,3 glicanase foi purificada aproximadamente 6,6 vezes com rendimento de 18%.



**Figura 1.** Purificação da  $\beta$ -1,3-glucanase de *Cellulosimicrobium cellulans* 191 em coluna DEAE-Sephacel<sup>®</sup>

**Tabela 10.** Purificação da  $\beta$ -1,3 glucanase de *Cellulosimicrobium cellulans* 191.

Etapa	Volume total (mL)	Proteína (mg/mL)	Atividade (U/mL)	Atividade Total (U)	Atividade Específica (U/mg)	Grau de Purificação	Rendimento (%)
Preparação enzimática bruta	300	0,093	0,724	217,20	7,78	1,00	100
Sulfato de amônio 30%	13	1,000	15,897	206,66	15,90	2,04	95,1
Dessalinização em Sephadex PD10	26	0,505	5,002	130,05	9,90	1,27	59,8
DEAE-Sephacel <sup>®</sup>	78	0,010	0,513	40,01	51,30	6,60	18,4

A **Tabela 11** descreve a purificação da protease de *Cellulosimicrobium cellulans* 191 em coluna de DEAE-Sephacel<sup>®</sup> equilibrada em tampão Tris-HCl 0,01M, pH 7,2, em sistema FPLC.

**Tabela 11.** Purificação da protease de *Cellulosimicrobium cellulans* 191.

Etapa	Volume total (mL)	Proteína (mg/mL)	Atividade (U/mL)	Atividade Total (U)	Atividade Específica (U/mg)	Grau de Purificação	Rendimento (%)
Preparação enzimática bruta	300	0,093	0,12	36	1,29	1	100
Sulfato de amônio 30%	13	1,000	1,19	15,47	1,19	0,92	43
Dessalinização em Sephadex PD10	26	0,505	0,4	10,4	0,79	0,61	29
DEAE-Sephacel®	52	0,011	0,09	4,68	8,18	6,34	13

SOARES (2002) purificou uma  $\beta$ -1,3-glucanase de massa molecular de 57 kDa da linhagem *Cellulomonas cartae* 191 do sobrenadante do meio de cultura através de ultrafiltração em membrana de exclusão de 10 kDa e cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-Sepharose equilibrada em pH 5,5. O extrato enzimático foi purificado 1,18 vezes em relação à atividade de  $\beta$ -1,3-glucanase e 5,1 vezes considerando a atividade de liticase. A fração protéica, contendo 5mg/mL, com atividade de  $\beta$ -1,3-glucanase foi eluída na concentração de 0,10 a 0,45M de NaCl.

FERRO (2002) purificou uma  $\beta$ -1,3-glucanase de *Cellulomonas cellulans* YLM-B191-1 de massa molecular estimada em 17,1 kDa através de ultrafiltração em membrana de 30 kDa e cromatografia em coluna de CM-Sepharose CL6B. A preparação enzimática bruta principal foi eluída em dois picos principais, os quais foram denominados F1 e F2. As frações do primeiro pico (F-1), e que eluíram no tampão de equilíbrio, estavam associadas a impurezas e mostraram baixa atividade específica de  $\beta$ -1,3-glucanase (0,055U de  $\beta$ -1,3-glucanase/g de proteína). As frações do segundo pico (F-2) eluíram em tampão acetato de sódio 0,01M pH 4,5 contendo 0,4M de NaCl e mostraram atividade específica de  $\beta$ -1,3-glucanase aproximadamente 53 vezes maior que em F-1. A  $\beta$ -1,3-glucanase do pico F-2 foi

purificada 32,2 vezes sendo obtido 18,9% de recuperação. A  $\beta$ -1,3-glucanase purificada mostrou-se capaz de lisar a parede celular de *Saccharomyces cerevisiae* ATCC26602 sem a necessidade de protease. O autor relatou que no estudo da purificação de  $\beta$ -1,3-glucanase de *C. cellulans* YLM-B191-1 utilizando-se as colunas de filtração em BioGel ou de troca iônica como CM e DEAE-celulose, DEAE-Toyopearl, mesmo em diferentes condições de molaridade e pH da solução tampão (6,5 a 7,5) ou concentrações crescentes de NaCl não foi obtido recuperação da atividade de  $\beta$ -1,3-glucanase.

SANTOS (2004) purificou uma protease de massa molecular igual a 55 kDa do extrato enzimático de *C. cellulans* 191 através do fracionamento com sulfato de amônio 40-80% de saturação, cromatografia em coluna DEAE-Sephrose e Q-Sephrose com rendimento de 7,8% e verificou que a enzima sozinha na concentração de 0,15U/mL de suspensão celular foi capaz de lisar células da levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

A  $\beta$ -1,3-glucanase de *Cellulosimicrobium cellulans* 191 de massa molecular igual a 45 kDa foi purificada 11,92 vezes com rendimento de 25% através de cromatografia em coluna de troca iônica DEAE-Sephadex A50, equilibrada em tampão fosfato de sódio 0,1M pH 7,0 (FLEURI, 2006). A enzima foi eluída da resina utilizando-se tampão contendo 0,6M de NaCl. A  $\beta$ -1,3-glucanase purificada apresentou atividade específica de 1,43U/mg de proteína.

Outras enzimas que lisam a parede celular de leveduras foram purificadas e descritas na literatura.

DOI *et al.* (1973) purificaram a  $\beta$ -1,3-glucanase que lisa leveduras da bactéria *Arthrobacter bacterium* através da concentração do sobrenadante do meio de cultura, seguida de diálise, tratamento com sulfato de protamina, cromatografia em CM-Cellulose e cromatografia DEAE-Sephadex. A enzima purificada apresentou atividade específica de lise igual a 2.300U/mg e atividade específica de  $\beta$ -1,3-glucanase de 5,5U/mg. A  $\beta$ -glucanase apresentou atividade ótima na faixa de pH 5,5 e 6,5 e permaneceu estável em uma larga faixa de pH, mas perdeu a atividade rapidamente acima de 60°C.

KITAMURA *et al.* (1974) purificaram uma  $\beta$ -1,3-glucanase da preparação comercial Zymolyase aproximadamente 75 vezes com rendimento de 7% através de fracionamento com sulfato de amônio e cromatografia em coluna Bio-Gel CM-100. A  $\beta$ -1,3-glucanase de massa molecular estimada em 21 kDa apresentou atividade ótima na faixa de pH entre 7,0-7,5 e a 30°C foi capaz de lisar células viáveis de leveduras na ausência de qualquer outra enzima. A  $\beta$ -1,3-glucanase purificada apresentou atividade específica de 270U/mg de proteína e atividade lítica de 370U/mL.

SCOTT e SCHEKMAN (1980) relataram que a preparação enzimática bruta de *Oerskovia xanthineolytica* contém diferentes  $\beta$ -1,3-glucanases e outras enzimas responsáveis pela lise de leveduras. Os autores citaram que tentativas de purificação das enzimas líticas por filtração em gel Sephadex resultaram aparentemente na perda total da atividade lítica e o uso de gradiente de sal para a eluição da proteína não contribuiu para melhorar sua purificação.

VENTOM e ASENJO (1990) verificaram que a preparação enzimática bruta de *Oerskovia xanthineolytica* LL-G109 contém glucanases e proteases que lisam leveduras. A  $\beta$ -1,3 glucanase dessa bactéria foi purificada aproximadamente 4,1 vezes com rendimento de 19%, utilizando cinco passos após a preparação enzimática bruta ser concentrada por ultrafiltração: 1)DEAE-Sepharose; 2)Phenyl Sepharose; 3) Sephacryl; 4)Phenyl Sepharose e 5)Sephacryl. A  $\beta$ -1,3 glucanase purificada apresentou atividade específica de 11,1U/mg usando-se o substrato laminarina. Essa preparação purificada apresentou o dobro da atividade específica da  $\beta$ -1,3 glucanase purificada (5,5U/mg) de *Arthrobacter luteus* descrita por DOI *et al.*, 1978. Os autores relataram que a cromatografia em colunas de Phenyl-Sepharose e Sephacryl, nas etapas finais de purificação são geralmente utilizadas para aumentar ligeiramente a atividade específica da enzima pela remoção de traços contaminantes de protease.

SHIMOI *et al.* (1991) purificaram 75 vezes a  $\beta$ -1,3-glucanase de *Rarobacter faecitabidus*, que lisa a parede celular de leveduras, através de cromatografia em coluna aniônica HR 16/10 Q-Sepharose e obtiveram 10% de recuperação da enzima.

SAEKI *et al.* (1994) purificaram a  $\beta$ -1,3-glucanase que lisa leveduras da bactéria *Oerskovia xanthineolitica* TK-1 aproximadamente 21 vezes utilizando cromatografia em colunas de DEAE-Sephacel<sup>®</sup>, DEAE-Toyopearl 650 M e Bio-Gel P-2. A  $\beta$ -1,3-glucanase, de massa molecular estimada em 40 kDa, apresentou atividade ótima em pH 7,5 e pH 5,5 nos substratos laminarina e glucana de levedura, respectivamente. A enzima demonstrou alta afinidade pela glucana de levedura e pode lisar células viáveis de leveduras sem a necessidade de um segundo componente lítico, a protease alcalina.

PARRADO *et al.* (1996) e FERRER (1996) purificaram uma  $\beta$ -1,3-glucanase de *Oerskovia xanthineolitica* LL-G109, aproximadamente 23 vezes, através de ultrafiltração e cromatografia em colunas HR 16/10 Q-Sepharose FF equilibradas com tampão pH 8,5 e pH 5,5. A enzima purificada apresentou atividade específica igual a 12,5U/mg de proteína quando a laminarina foi utilizada como substrato. A  $\beta$ -1,3-glucanase, de massa molecular estimada em 27 kDa, apresentou temperatura ótima de atividade igual a 65°C. A metodologia de purificação de  $\beta$ -1,3-glucanase, mais simples que aquela descrita por VENTOM e ASENJO (1990), apresentou ótimos resultados.

ESCUREDO *et al.* (1997) purificaram uma  $\beta$ -1,3-glucanase de *Oerskovia xanthineolytica*, aproximadamente 23 vezes, com rendimento de 12,3%, em dois passos cromatográficos. O sobrenadante do meio de cultivo foi concentrado através de precipitação com sulfato de amônio, dialisado contra tampão Tris-HCl 20mM pH 8,5 e purificado em colunas HR16/10 Q-Sepharose FF. A proteína purificada apresentou atividade específica de 10,5U/mg. Os autores concluíram que a purificação dessa proteína é um bom modelo quando comparado ao método tradicional descrito por VENTOM e ASENJO (1990), que consiste em cinco passos.

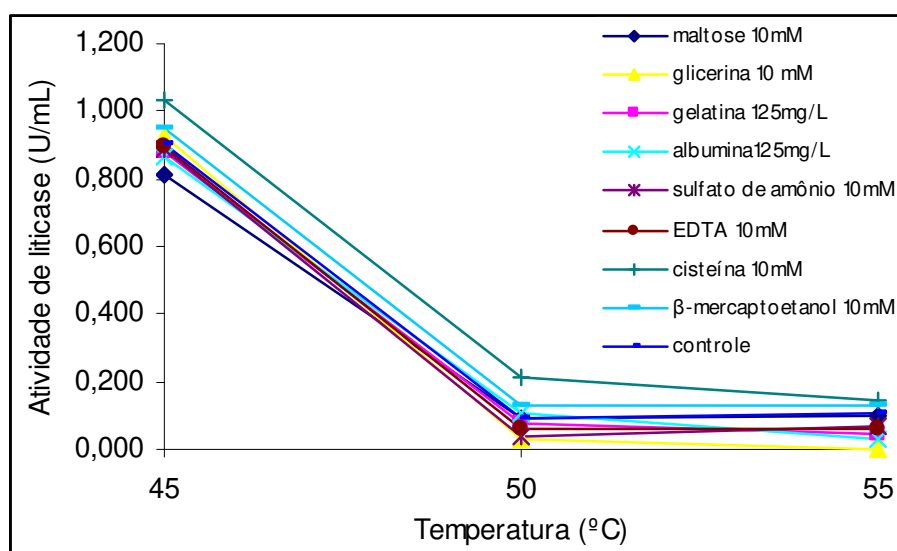
SALAZAR *et al.* (2001) purificaram e caracterizaram a  $\beta$ -1,3-glucanase tipo II de *Oerskovia xanthineolytica* expressa em *Escherichia coli*. O nível de expressão foi otimizado para produzir 30% do total de proteína da *E. coli*. A  $\beta$ -1,3-glucanase recombinante apresentou massa molecular estimada em 43 kDa e características moleculares similares à  $\beta$ -1,3-glucanase de *O. xanthineolytica* purificada.

#### 4.5 Estudo da influência de diferentes compostos na estabilidade da $\beta$ -1,3-glucanase a 45°C, 50°C e 55°C

A influência de diferentes compostos na estabilidade térmica da  $\beta$ -1,3-glucanase foi testada como descrito no item 3.7. A atividade de  $\beta$ -1,3-glucanase foi medida pela atividade de liticase.

A **Figura 2** ilustra que os compostos cisteína 10mM, maltose 10mM, glicerina 10mM, gelatina 125mg/mL, albumina 125mM, sulfato de amônio 10mM,  $\beta$ -mercaptoetanol 10mM e EDTA 10mM, não aumentaram a estabilidade da  $\beta$ -1,3-glucanase da preparação enzimática bruta após incubação a 45°C, 50°C e 55°C durante 1 hora.

Os compostos maltose 10mM, glicerina 10mM, gelatina 10mg/mL, albumina 10mM, sulfato de amônio 10mM,  $\beta$ -mercaptoetanol 10mM e EDTA 10mM não apresentaram diferença significativa entre si ou entre o controle ao nível de 5% de significância pelo teste Tukey. Porém, a cisteína, apresentou diferença significativa entre todos os outros aditivos.



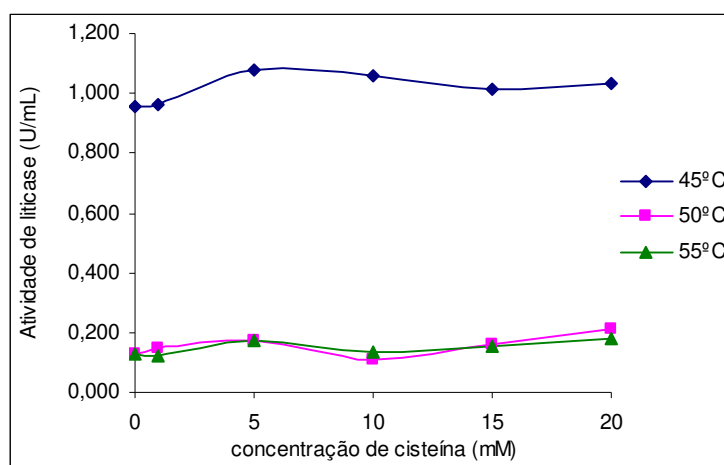
**Figura 2.** Influência de diferentes compostos na estabilidade da  $\beta$ -1,3-glucanase após tratamento a 45°C, 50°C e 55°C

A **Figura 3** mostra que a adição de cisteína nas concentrações 0, 1, 5, 10, 15 e 20mM não aumentou a estabilidade da  $\beta$ -1,3-glucanase da preparação enzimática bruta de



*Cellulosimicrobium cellulans* 191, após o tratamento a 45°C, 50°C e 55°C por 1 hora. Verificou-se que não houve diferença significativa pelo teste Tukey ao nível de significância de 5% entre as concentrações em uma mesma temperatura.

A  $\beta$ -1,3-glucanase da preparação enzimática bruta manteve a atividade de liticase após 1 hora de tratamento a 45°C, no entanto a enzima foi inativada após 1 hora de tratamento a 50°C, mesmo na presença de cisteína 5-20mM.



**Figura 3.** Influência de diferentes concentrações de cisteína na estabilidade da  $\beta$ -1,3-glucanase da preparação enzimática bruta durante tratamento a 45°C, 50°C e 55°C.

FERRO (2002) testou o efeito de alguns compostos inorgânicos e inibidores na atividade da  $\beta$ -1,3-glucanase de *Cellulomonas cellulans* YLM-B191-1, nas concentrações de 1 a 10mM em relação ao volume final da mistura de reação. A atividade enzimática foi obtida utilizando-se a laminarina como substrato. A  $\beta$ -1,3-glucanase foi moderadamente inibida em presença de 10mM de citrato de sódio, oxalato de sódio, iodeto de potássio, iodo acetamida, ácido etilenodiamino tetracético (EDTA), semicarbazida, fenilmetilsulfonil fluoreto, ácido 4-amino benzóico, arseniato de sódio ( $\text{NaAsO}_2$ ), uréia, ácido 4-cloromercúrio benzóico. Os reagentes permanganato de potássio ( $\text{KMnO}_4$ ) e N-bromosuccinimida inibiram fortemente a  $\beta$ -1,3-glucanase bruta, enquanto o lauril sulfato de sódio inibiu completamente a enzima. O  $\beta$ -mercaptoetanol parece ter ativado a enzima aumentando sua atividade em 1,31%.

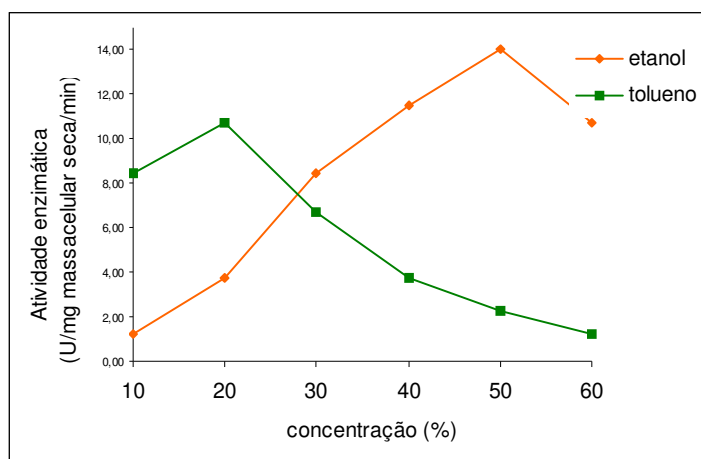
OHNO *et al.* (1988) examinaram o sítio ativo da  $\beta$ -1,3-glicanase da preparação comercial Zymolyase utilizando modificações do grupo funcional de resíduos de aminoácidos, espectroscopia UV, medida da rotação ótica e análise dos produtos da reação. O tratamento da enzima Zymolyase com os compostos 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida-HCl ou 1-ciclohexil-3-(2-morfolinil-4-etil) carboximida meta-p-toluenosulfonato que atuam em resíduos carboxil e com N-bromosuccinimida (NBS) que age em resíduos de triptofano causaram a perda de atividade da  $\beta$ -1,3-glicanase. Os autores sugeriram que os resíduos carboxil e triptofano são essenciais para a atividade enzimática.

#### **4.6 Extração da $\beta$ -galactosidase intracelular de *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus* por diferentes métodos**

A extração de  $\beta$ -galactosidase intracelular de *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus* foi testada como descrito no item 3.8. Foi utilizado o substrato lactose na determinação da atividade enzimática, conforme descrito no item 3.2.3.1.

##### **4.6.1 Extração da $\beta$ -galactosidase intracelular de *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus* por permeabilização com solventes orgânicos**

Na extração da  $\beta$ -galactosidase intracelular de *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus* por permeabilização com os solventes orgânicos tolueno e etanol, durante 15 minutos a 25°C, foi obtido maior atividade enzimática nas concentrações 20% e 50%, respectivamente. Na permeabilização das células de leveduras com 20% de tolueno foi obtido 10,75U de  $\beta$ -galactosidase/mg de massa celular seca/min e com 50% de etanol foi obtido atividade igual a 14,00U de  $\beta$ -galactosidase/mg de massa celular seca/min.



**Figura 4.** Extração da  $\beta$ -galactosidase intracelular de *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus* utilizando-se diferentes concentrações dos solventes orgânicos tolueno e etanol.

MAHONEY e WHITAKER (1978) extraíram a  $\beta$ -galactosidase de *Kluyveromyces fragilis* através do tratamento da suspensão celular de levedura (200mg/mL) em tampão fosfato pH 7,0 contendo 0,1mM  $MnCl_2$ , 0,5mM  $MgSO_4$ , 0,5mM de ditiotretitol e 0,02% de azida sódica e 2% de tolueno durante 20 horas a 37°C. O sobrenadante livre de células apresentou 225U de  $\beta$ -galactosidase/mL e atividade específica de 15,2U/mg, usando substrato ONPG como substrato.

DECLUIRE *et al.* (1987) verificaram que a concentração mínima de solvente para a permeabilização de células de *Kluyveromyces bulgaricus* foram 10% de n-butanol, 20% de propanol, 30% de isopropanol ou terc-butanol, 40% de etanol ou acetona e 70% de dimetilsulfóxido. A extração máxima de  $\beta$ -galactosidase (2,25-2,35U/mg de massa seca) foi obtida após tratamento das células de *Kluyveromyces bulgaricus* com 30% de isopropanol, 40% de terc-butanol e 70% de etanol durante 3 minutos a 25°C, resfriamento rápido a 5°C por 5 minutos em banho de gelo, seguido de centrifugação para a separação do sobrenadante livre de células, utilizando o substrato lactose. SISO e DOVAL (1994) também descreveram que o etanol na concentração final de 70% é um agente eficiente de permeabilização para a levedura *Kluyveromyces fragilis*.

FLORES *et al.* (1994) relataram que etanol na concentração final de 40% foi efetivo para a permeabilização das células da levedura *Kluyveromyces lactis* CBS 683 e

extração de  $\beta$ -galactosidase na faixa de temperatura de 5 a 30°C, mas não a 37°C devido à desnaturação da enzima.

BRODSKY e GROOTWASSINK (1986) extraíram uma  $\beta$ -galactosidase intracelular de *Kluyveromyces fragilis* em um processo de baixo custo para utilização na indústria. A suspensão celular de levedura 180g/L em tampão fosfato 0,1mol/L foi tratada com metil parabeno 0,4% e a permeabilização foi completada com tratamento térmico de 50°C por 0,5 a 1 hora, obtendo-se 90% de atividade da  $\beta$ -galactosidase com substrato lactose.

PANESAR *et al.* (2007) estudaram a permeabilização de células de *Kluyveromyces marxianus* utilizando-se os solventes benzeno, n-butanol, n-propanol, Triton X-100, iso-propanol, tolueno, etanol e acetona e obtiveram melhor resultado utilizando etanol. Foi obtido para  $\beta$ -galactosidase 1510 IU/g de massa celular seca de levedura após tratamento das células de leveduras com etanol 50% na concentração final a 25°C por 15 minutos utilizando o substrato lactose. Segundo o autor, a diferença entre as concentrações ótimas dos agentes para permeabilização das células de leveduras varia entre as diferentes linhagens de leveduras e das condições do processo de permeabilização utilizadas.

#### **4.6.2 Extração da $\beta$ -galactosidase intracelular de *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus* utilizando-se $\beta$ -1,3-glucanase de *Cellulosimicrobium cellulans* 191**

Na extração da  $\beta$ -galactosidase intracelular de *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus* utilizando-se as preparações enzimáticas bruta e purificada de  $\beta$ -1,3-glucanase na concentração final de 0,1U/mL foram obtidas 7,25 e 13,11U de  $\beta$ -galactosidase/mg de massa celular seca/min, respectivamente.

ZOMER *et al.* (1987) estudaram a obtenção de enzimas intracelulares de leveduras utilizando glucanases. As leveduras *Kluyveromyces lactis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces oviformes*, *Torulopsis glabrata*, *Hansenula polymorpha* e leveduras de panificação locais foram lisadas com relativa facilidade (70-80% das células), especialmente quando as células foram tratadas durante a fase logarítmica de crescimento

enquanto que *Candida utilis* e *Candida vini* foram mais susceptíveis a lise quando as células foram tratadas durante a fase estacionária. Foi obtido maior quantidade de enzimas intracelulares pela incubação das leveduras com glucanase por 1 hora e 30 minutos a 37°C.

FLEURI (2003) estudou a extração de enzimas intracelulares ou ligadas à célula através da lise enzimática de leveduras utilizando  $\beta$ -1,3-glucanase de *Cellulomonas cartae* 191. Foi testada a extração da enzima  $\beta$ -frutofuranosidase ou invertase das leveduras *Saccharomyces cerevisiae* KL-88 e *Kluyveromyces marxianus* NCYC 587. Foi obtido 429,01U de atividade de invertase/mg de massa celular seca de *S. cerevisiae* KL-88 e 872,64U de atividade de invertase/mg de massa celular seca de *Kluyveromyces marxianus* NCYC 587 após tratamento das leveduras com  $\beta$ -1,3-glucanase durante 60 minutos a 35°C.

#### **4.6.3 Extração da $\beta$ -galactosidase intracelular de *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus* por ultrasonicação utilizando-se tratamento preliminar das leveduras com $\beta$ -1,3-glucanase de *Cellulosimicrobium cellulans* 191**

Na extração da  $\beta$ -galactosidase intracelular de *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus* utilizando-se tratamento preliminar das leveduras com  $\beta$ -1,3-glucanase purificada com atividade final de 0,1U/mL durante 35 minutos a 37°C e três tratamentos em ultrasonicador a 180-200 watts por 20 segundos foi obtido atividade de 25,13U de  $\beta$ -galactosidase/mg de massa celular seca/min. Na extração da  $\beta$ -galactosidase utilizando-se os tratamentos: somente com  $\beta$ -1,3-glucanase purificada<sup>1</sup> e três tratamentos com ultrasonicador<sup>2</sup> a 180-200watts por 20 segundos foram obtidos respectivamente 13,11 e 10,95U de  $\beta$ -galactosidase/mg de massa celular seca da levedura (**Tabela 12**). O pré-tratamento da levedura *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus* com  $\beta$ -1,3-glucanase de *Cellulomonas cellulans* 191 aumentou a susceptibilidade das células à lise com ultrasonicador e a liberação da  $\beta$ -galactosidase que correspondem a um aumento de 2,29 vezes em relação ao tratamento somente com ultrasonicação.

**Tabela 12.** Extração da  $\beta$ -galactosidase intracelular de *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus* utilizando-se  $\beta$ -1,3-glucanase de *Cellulosimicrobium cellulans* 191 e tratamento com ultrasonicador

<b>Tratamento da suspensão celular de <i>Kluyveromyces marxianus</i> var. <i>bulgaricus</i> para extração da <math>\beta</math>-galactosidase</b>	<b>Atividade de <math>\beta</math>-galactosidase (U/mg massa celular seca/min)</b>
1) 2mL de suspensão celular + 2mL de solução de $\beta$ -1,3-glucanase purificada (concentração final de 0,1U/mL) / 35' - 37°C	13,11
2) 2mL de suspensão celular + 2mL de solução de $\beta$ -1,3-glucanase purificada (concentração final de 0,1U/mL) / 35' - 37°C / Tratamento em ultrasonicador 180-200W/20"/4°C (3 vezes)	25,13
3) 2mL de suspensão celular / Tratamento em ultrasonicador 180-200W/20"/4°C (3 vezes)	10,95

JOSHI *et al.* (1989) obtiveram 20U de  $\beta$ -galactosidase/g de células de *Kluyveromyces fragilis* através do tratamento da suspensão de 2g de células (massa seca) em 10mL de tampão fosfato potássio 0,1M, pH 7,0 por 5 minutos em sonicador Branson, enquanto que foram obtidos 175,2U de  $\beta$ -galactosidase/g de células através da autólise de 10g de células suspensas em 50mL de tampão fosfato potássio 0,1M, pH 7,0 contendo 0,1mM MnCl<sub>2</sub>, 0,5mM MgSO<sub>4</sub> com 2% de tolueno.

O pré-tratamento da suspensão de *Candida utilis* ATCC 9226 (7 a 120g massa seca por litro) com Zymolyase aumentou o rompimento mecânico da levedura em homogeneizador de alta pressão. Obteve-se 95% de rompimento celular utilizando pré-tratamento enzimático seguido de lise mecânica, enquanto que foi obtido 65% de lise utilizando-se somente a homogeneização mecânica (BALDWIN e CAMPBELL, 1994).

FLEURI (2003) verificou o efeito do pré-tratamento das leveduras *Saccharomyces cerevisiae* KL-88 e *Kluyveromyces marxianus* NCYC 587 com a preparação de  $\beta$ -1,3-glucanase, obtida do fracionamento com sulfato de amônio com 60% de saturação, na lise da parede celular com ultrasonicação. O pré-tratamento das leveduras com a enzima

aumentou a susceptibilidade das leveduras ao tratamento de ultrasonicação. Foi obtido aumento da extração de invertase e proteínas com o tratamento prévio das leveduras. Após tratamento ultrasônico da suspensão de *Saccharomyces cerevisiae* KL-88 durante 10 e 20 segundos a 180 watts foram obtidos, respectivamente, 115,82 e 171,687U de atividade de invertase/mg de massa celular seca. Após tratamento com 0,11U/mL de  $\beta$ -1,3-glucanase e tratamento posterior durante 10 e 20 segundos a 180 watts foram obtidos, respectivamente, 458,43 e 448,07U de atividade de invertase/mg de massa celular seca que correspondem a um aumento de 395,8 % e 261%, respectivamente, em relação ao tratamento somente com ultrasonicação. O tratamento prévio das células de *K. marxianus* NCYC 587 com a preparação enzimática de  $\beta$ -1,3-glucanase da linhagem *C. cartae* 191 também aumentou a extração de invertase e proteínas das células da levedura.

FARKADE *et al.* (2006) estudaram o efeito do pré-tratamento das células de *Kluyveromyces lactis* NCIM 3566 em soluções tampão de diferentes valores de pH seguido de ultrasonicação para extração de  $\beta$ -galactosidase. Foi obtido atividade de  $95 \pm 3$ U/mL através do tratamento das células em pH 4,4 durante 6 horas seguido de ultrasonicação a 120 watts por 40 minutos, enquanto que utilizando somente o tratamento ultrasônico a 120 watts por 50 minutos foi obtido  $7,2 \pm 0,6$ U/mL.

Um dos passos mais críticos em um processo industrial é a recuperação do produto. Diferentes métodos para a extração desta enzima têm sido testados. O método que utiliza extração com solventes, para pequena escala, obtém resultados interessantes (DE BALES e CASTILLO, 1979; THIGIEL e DEAK, 1989; STRED'ANSKY, 1993; FIEDUREK e SZCZODRAK, 1994). Em uma larga escala, porém, métodos mecânicos para lise celular são preferidos (KULAAND SCHÜTTE, 1987), como moinho (GARRIDO *et al.*, 1995), e o uso de homogeneizador de alta pressão (HIGGINS *et al.*, 1978).

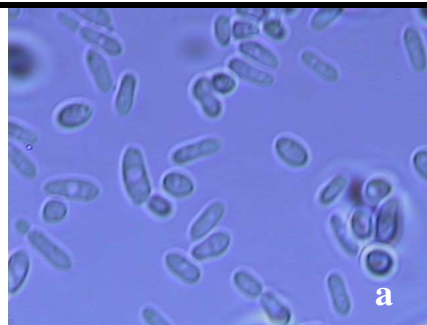
#### 4.7 Aplicação da $\beta$ -1,3-glucanase na formação de protoplasto e lise da levedura *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus*

A aplicação dos extratos brutos e purificados de  $\beta$ -1,3-glucanase na formação de protoplasto e lise da levedura *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus* foi testada como descrito no item 3.9.

A  $\beta$ -1,3-glucanase purificada em coluna DEAE-Sephacel<sup>®</sup> com atividade com atividade específica de 51,30U/mg foi capaz de formar protoplastos e lisar células viáveis de *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus*. Foi obtido diminuição da turbidez da suspensão celular de levedura com preparação enzimática bruta e purificada de  $\beta$ -1,3-glucanase de 38% e 44%, respectivamente, na presença de  $\beta$ -mercaptoetanol. Em ambos os ensaios a quantidade final de atividade de  $\beta$ -1,3-glucanase foi 0,1U/mL.

A preparação enzimática bruta de  $\beta$ -1,3-glucanase obtida por fracionamento com sulfato de amônio a 30% de saturação atuou na formação de protoplastos e na lise da levedura. Após tratamento de 2mL de suspensão de células viáveis da levedura *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus* (correspondente a 2,6mg de massa celular seca) com extrato enzimático de  $\beta$ -1,3-glucanase na concentração final de 0,1U/mL, na presença de  $\beta$ -mercaptoetanol, foi observado diminuição da turbidez da suspensão de levedura em 42%. As **Figuras 5b, 5c e 5d** ilustram, respectivamente, a formação de protoplastos das células da levedura *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus* utilizando-se a preparação enzimática bruta de *Cellulosimicrobium cellulans* 191, a preparação enzimática fracionada com sulfato de amônio a 30% de saturação e a preparação de  $\beta$ -1,3-glucanase purificada em coluna DEAE-Sephacel<sup>®</sup>, após 1 hora a 35°C.





**5a.** Células de *K. marxianus* var. *bulgaricus*.  
Controle: Sem adição da enzima  $\beta$ -1,3-glucanase após 1 hora a 35°C



**5b.** Células de *K. marxianus* var. *bulgaricus* tratadas com preparação enzimática bruta de  $\beta$ -1,3-glucanase durante 1 hora a 35°C



**5c.** Células de *K. marxianus* var. *bulgaricus* tratadas com preparação enzimática de  $\beta$ -1,3-glucanase obtida por fracionamento com sulfato de amônio (30%) durante 1 hora a 35°C

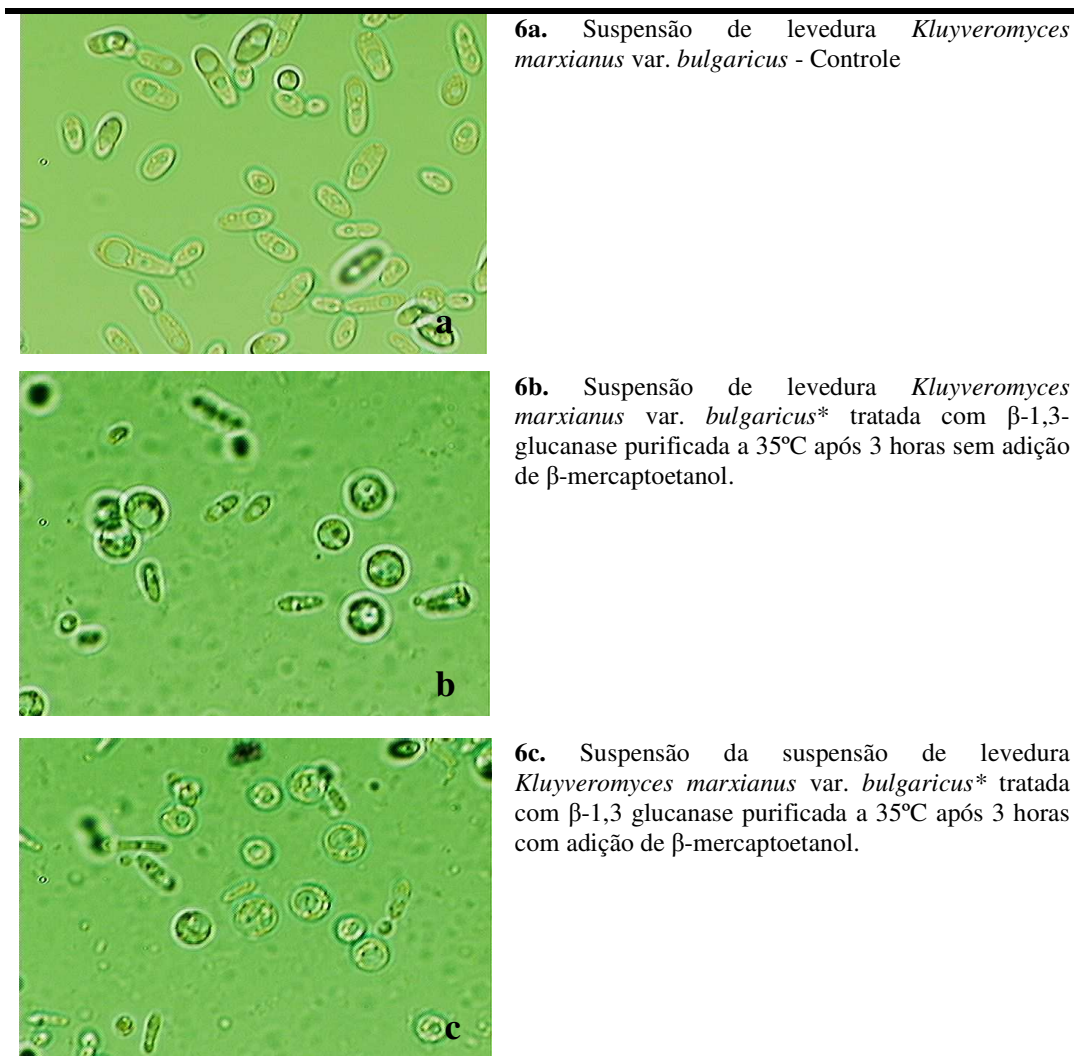


**5d.** Células de *K. marxianus* var. *bulgaricus* tratadas com preparação de  $\beta$ -1,3-glucanase purificada durante 1 hora a 35°C

**Figura 5.** Aplicação de diferentes preparações enzimáticas de  $\beta$ -1,3-glucanase para a formação de protoplastos de *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus*

O  $\beta$ -mercaptoetanol aumentou a susceptibilidade das células da levedura *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus* à lise com  $\beta$ -1,3-glucanase de *C. cellulans* 191. As **Figuras 6b e 6c** ilustram o efeito da preparação de  $\beta$ -1,3-glucanase purificada de

*Cellulosimicrobium cellulans* 191 sem e com  $\beta$ -mercaptoetanol na formação de protoplastos das células de *K. marxianus* var. *bulgaricus*.



\*Suspensão de levedura *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus* padronizada ( $DO_{660nm} = 1,680$ )

**Figura 6.** Efeito do  $\beta$ -mercaptoetanol na formação de protoplastos da levedura *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus* utilizando-se preparação purificada de  $\beta$ -1,3-glucanase de *Cellulomonas cellulans* 191.

MACWILLIAM (1970) verificou que a capacidade das  $\beta$ -glucanases de atacar a parede celular de leveduras ou células inteiras pode variar dependendo da fase de crescimento celular ou do gênero da levedura. O ataque enzimático foi rápido em células jovens da linhagem de *Saccharomyces carlsbergensis*, mas não ocorreram em células velhas sem um tratamento prévio com mercaptoetanol. A levedura *S. cerevisiae* foi

completamente hidrolisada por  $\beta$ -1,3-glucanases. As linhagens de *Hansenula* sp. e *Nadsonia* sp. foram completamente lisadas por ambos os tipos de glucanases, enquanto as linhagens *Schizosaccharomyces* sp. não foram hidrolisadas completamente, e as leveduras como *Rhodotorula* sp não foram atacadas por estas enzimas.

A susceptibilidade de 26 linhagens dos gêneros *Saccharomyces* sp. e *Candida* sp. às enzimas que lisam a parede celular de leveduras produzidas por *Arthrobacter luteus* foi examinada por KANEKO *et al.* (1973). Foram verificados os efeitos dos vários tratamentos com 2-mercaptoetanol ou dodecilsulfato de sódio, e concluiu-se que estes influenciaram na susceptibilidade das células das leveduras, sugerindo que afetaram a composição e/ou a estrutura da parede celular. A susceptibilidade das leveduras à ação enzimática variou com o gênero e a espécie.

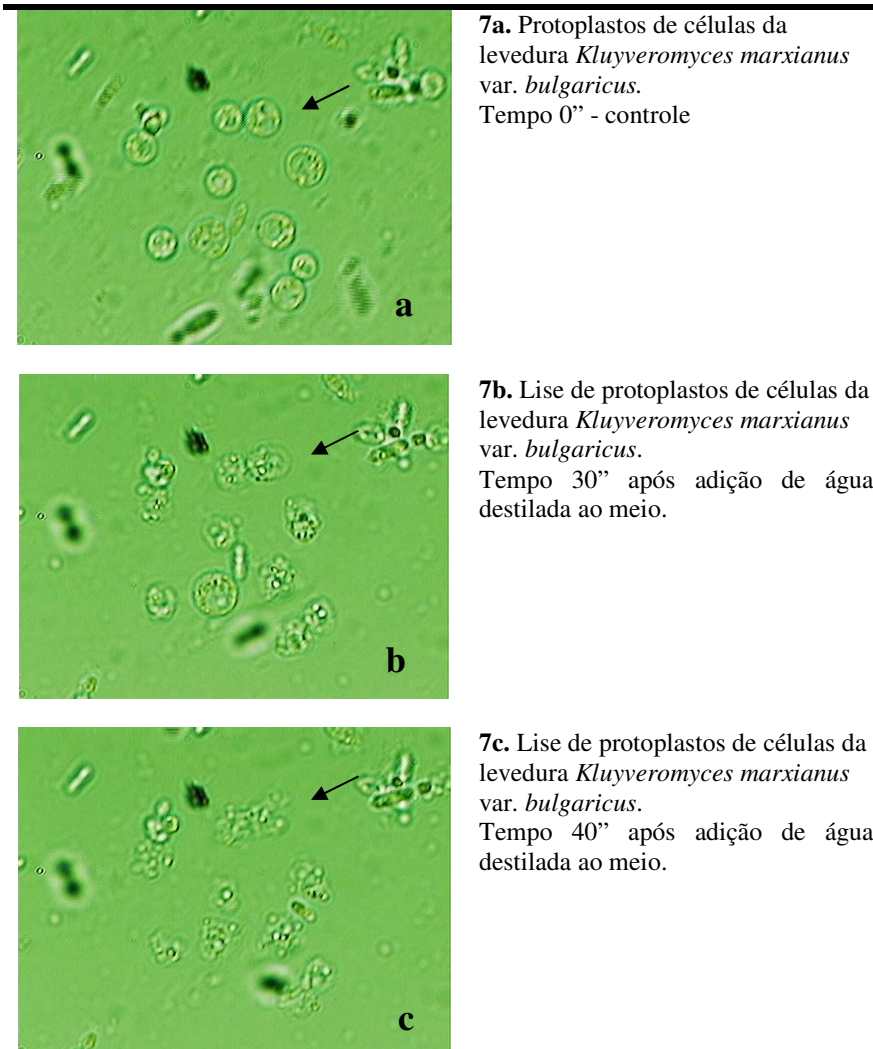
Segundo DOI *et al.* (1973) a  $\beta$ -1,3-glucanase I, produzida por microrganismos do gênero *Arthrobacter*, causa lise das células jovens de leveduras na presença de  $\beta$ -mercaptoetanol e 0,6M de KCl. As células de leveduras são mais susceptíveis à lise enzimática quando tratadas com  $\beta$ -mercaptoetanol ou cisteína (KANEKO *et al.*, 1973).

KITAMURA (1982) purificou a Zymolyase da preparação comercial Zymolyase-60.000 por cromatografia de troca iônica e filtração em gel. A Zymolyase foi separada em  $\beta$ -1,3-glucanase e protease alcalina, as frações protéicas foram denominadas A e B, respectivamente. Nenhuma delas sozinha foi capaz de lisar células de leveduras, contudo, juntas mostraram alta atividade lítica. As células de leveduras somente foram lisadas com a Zymolyase A quando pré-tratadas com a Zymolyase B. A Zymolyase A lisou células de leveduras na presença de 2-mercaptoetanol, mas a Zymolyase B não atuou mesmo na presença de altas concentrações do aditivo. A Zymolyase B diminuiu a turbidez da suspensão celular em aproximadamente 13%. Segundo os autores o 2-mercaptoetanol exerce o papel de uma protease lítica, destruindo a camada externa de mananaproteína da parede celular e permitindo o acesso da  $\beta$ -1,3-glucanase à camada de glucana.

FLEURI (2003) estudou o efeito da cisteína e  $\beta$ -mercaptoetanol nas concentrações de 1, 10 e 100mM na lise enzimática da levedura *S. cerevisiae* KL-88 pela  $\beta$ -1,3-glucanase

da linhagem *C. cartae* 191. E concluiu que a  $\beta$ -1,3-glucanase da linhagem *C. cartae* 191 foi capaz de lisar células viáveis de leveduras sem a necessidade de cisteína e  $\beta$ -mercaptoetanol, no entanto a lise da levedura *S. cerevisiae* KL-88 foi aumentada em aproximadamente 10U/mL de atividade lítica quando tratada com  $\beta$ -1,3-glucanase e 1mM de cisteína. A maior atividade de lise (19,54U/mL) ocorreu na mistura de reação contendo 1mM de cisteína e 0,11U de  $\beta$ -1,3-glucanase por mL de suspensão de levedura. Na presença de 100mM de cisteína e 0,11U de  $\beta$ -1,3-glucanase por mL de suspensão de levedura, a atividade lítica da levedura foi nula. A adição de 1mM de  $\beta$ -mercaptoetanol na suspensão celular contendo 0,11U/mL de  $\beta$ -1,3-glucanase aumentou a atividade de lise de *S. cerevisiae* KL-88 em comparação à ação isolada da enzima lítica. Concentrações de 10 e 100mM do reagente  $\beta$ -mercaptoetanol provocaram um acréscimo estatisticamente igual na atividade lítica do microrganismo.

A **Figura 7** ilustra a sequência de lise dos protoplastos da levedura *K. marxianus* var. *bulgaricus* após a adição de água destilada.



**Figura 7.** Sequência de lise dos protoplastos de células da levedura *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus* após a adição de água destilada ao meio.

Segundo YAMAMURA *et al.* (1991), a parede celular confere proteção física e resistência às células de leveduras. BACON *et al.* (1969) relataram que a camada de mananoproteína sobrepõe a camada de glucana e isto poderia explicar a resistência das células vivas de leveduras ao ataque das preparações enzimáticas, como  $\beta$ -1,3-glucanases, produzidas por alguns microrganismos. KREGGER e KOPECKÁ (1975) confirmaram a

posição interna da fração de glucana na parede celular de leveduras através de observações em microscópio eletrônico.

A utilização das enzimas líticas de leveduras e bactérias para controle de microrganismos patogênicos foi sugerida por VENTOM e ASENJO (1987) para a prevenção da deterioração de alimentos.

AMRANE e PRIGENT (1996) estudaram o comportamento das células da levedura *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* durante sua autólise através do tratamento térmico a 45°C ou 50°C por 23,5 horas. Durante este tratamento foram feitas observações ao microscópio eletrônico e não foi possível verificar nenhuma célula rompida, mas apenas diferenças morfológicas entre as células frescas lavadas e as células autolisadas. Enquanto as células frescas apresentaram uma forma lisa e elipsoidal, as células autolisadas se assemelhavam a balões cilíndricos esvaziados. As células autolisadas mostraram somente uma diminuição de 43% no seu volume interno.

FERRO (2002) observou em microscópio eletrônico a digestão da parede celular de células viáveis da levedura *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 26602 pelas enzimas líticas de *Cellulomonas cellulans* YLM-B191-1. A ação da enzima  $\beta$ -1,3-glucanase bruta e purificada sobre a parede da levedura após 18 horas a 30°C mostrou alterações significativas na superfície celular. As regiões de cicatriz de brotamento das células de *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 26602 mostraram-se fortemente digeridas após tratamento enzimático.

FLEURI (2006) verificou a susceptibilidade de algumas leveduras à lise pela preparação enzimática de  $\beta$ -1,3-glucanase da linhagem *C. cartae* 191 obtida por fracionamento com sulfato de amônio com 60% de saturação. Neste estudo, a levedura *Kluyveromyces marxianus* NCYC 587, juntamente com a *Hansenula mrakii* NCYC 500, apresentou-se como uma das mais sensíveis à lise pela  $\beta$ -1,3-glucanase quando comparada à linhagem *Saccharomyces cerevisiae* KL-88. O tratamento prévio das células das leveduras com protease na concentração final de 0,15U/mL seguido do tratamento com  $\beta$ -1,3-glucanase não resultou em alteração na lise celular de forma estatisticamente

significativa segundo o teste Tukey. Apenas a adição de quitinase (0,5U/mL de suspensão de levedura) produzida pela linhagem *C. cartae* 191 foi capaz de aumentar a atividade de lise nas células das leveduras *S. cerevisiae* e *K. marxianus* NCYC 587. A levedura *Kluyveromyces drosophilarum* apresentou razoável porcentagem de lise (20,64%) quando comparada a outras leveduras como *Debaromyces vanriji* (52% de lise relativa), *Penicillium tannophilus* (100% de lise relativa) e *Hansenula mrakii* (81,15% de lise relativa). Enquanto outras leveduras como *Saccharomyces cerevisiae* KL-88 (15,12% de lise relativa), *Saccharomyces capensis* (10,87% de lise relativa) e *Candida glabrata* (8,43% de lise relativa) apresentaram-se mais resistentes à lise quando tratadas com a  $\beta$ -1,3-glucanase purificada de *C. cellulans* 191 na concentração final de 0,1U/mL. Neste mesmo estudo, foi verificada a formação de protoplastos da levedura *S. cerevisiae* KL-88 quando tratada com 0,1U/mL de  $\beta$ -1,3-glucanase purificada a 30°C por 2 horas.

#### **4.8 Estudo da influência da temperatura e do pH na atividade e estabilidade da $\beta$ -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus***

##### **4.8.1 Determinação do pH e temperatura ótima de atividade da preparação enzimática bruta de $\beta$ -galactosidase através de planejamento experimental**

O efeito do pH e temperatura na atividade da  $\beta$ -galactosidase da levedura *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus* bruta foi testado como descrito no item 3.10.1 através de planejamento experimental fatorial. A  $\beta$ -galactosidase da levedura *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus* apresentou atividade ótima em pH 7,0 e 32°C, similar às várias  $\beta$ -galactosidases de *Kluyveromyces* sp.

A **Tabela 13** descreve o planejamento fatorial para o estudo dos efeitos do pH e da temperatura na atividade da enzima  $\beta$ -galactosidase da levedura *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus*, com seus valores codificados para cada ensaio, bem como a variável dependente atividade de  $\beta$ -galactosidase.

**Tabela 13.** Planejamento fatorial composto central 2<sup>2</sup> codificado para o estudo do efeito do pH e temperatura na atividade da  $\beta$ -galactosidase bruta da levedura *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus*

Ensaio	Variáveis		Tempo de reação (20 min)
	pH	Temperatura (°C)	Atividade de $\beta$ -galactosidase ( $\mu$ mol ONP/mL/min)
1	-1	-1	<b>7,63</b>
2	1	-1	<b>6,90</b>
3	-1	1	<b>10,55</b>
4	1	1	<b>9,80</b>
5	-1,41	0	<b>4,72</b>
6	1,41	0	<b>2,10</b>
7	0	-1,41	<b>3,60</b>
8	0	1,41	<b>3,87</b>
9	0	0	<b>57,53</b>
10	0	0	<b>58,01</b>
11	0	0	<b>57,78</b>
12	0	0	<b>57,90</b>

A **Tabela 14** apresenta os valores decodificados utilizados no planejamento fatorial.

**Tabela 14.** Valores decodificados utilizados no planejamento fatorial composto central 2<sup>2</sup> para estudo do efeito do pH e temperatura na atividade da  $\beta$ -galactosidase bruta da levedura *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus*

Variável	Nível				
	-1,41	-1	0	+1	+1,41
pH	6,0	6,6	7,0	7,4	8,0
Temperatura °C	21	24	32	40	43



A **Tabela 15** descreve os efeitos principais e a interação das variáveis para a atividade da enzima.

**Tabela 15.** Análise dos efeitos principais e interação das variáveis temperatura e pH na atividade da  $\beta$ -galactosidase bruta da levedura *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus*.

Variável	Efeito	Desvio padrão	T (2)	p
(1) pH (L)*	-3,36	0,986	3,53	0,0030
(1) pH (Q)*	-4282,54	0,986	3,00	0,0000
(2) temperatura (L)*	4,82	0,986	4,82	0,0018
(2) temperatura (Q)*	-4228,81	0,986	4,00	0,0000
1 x 2*	63,83	0,986	15,95	0,0002

\* parâmetros estatisticamente significativos ao 95% de nível de confiança ( $p < 0,05$ )

L: parâmetro linear

Q: parâmetro quadrático

O pH teve efeito negativo dentro da faixa estudada (tanto o parâmetro linear L, como o quadrático Q). Ou seja, o aumento do pH leva a uma queda da atividade. A temperatura apresentou efeito negativo na atividade, dentro da faixa estudada (considerando o parâmetro quadrático Q que possui coeficiente muito maior do que o parâmetro linear L). Mas a interação entre pH e temperatura não apresentou efeito significativo nesta mesma faixa.

A **Tabela 16** mostra a análise de variância (ANOVA) para determinação do efeito do pH e da temperatura na atividade da enzima  $\beta$ -galactosidase bruta da levedura *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus*. O modelo obtido pode ser considerado preditivo e significativo a um nível de confiança de 95%, como evidenciado pelo teste F, em que  $F_{\text{experimental}}$  ( $F_{\text{modelo}}=11,15$ ) foi maior que o  $F_{\text{tabelado}}$  ( $F_{0,95;4;7} = 4,12$ ). A adequação do modelo foi verificada pelo coeficiente de determinação ( $R^2=0,99$ ). O erro puro apresentou um baixo valor de 0,13, indicando boa reprodutibilidade dos valores obtidos. Estes resultados foram suficientes e satisfatórios para a obtenção de um modelo que representa a relação real entre as variáveis independentes e a atividade da enzima  $\beta$ -galactosidase da levedura *K. marxianus* var. *bulgaricus*.

**Tabela 16.** Análise de variância no estudo do efeito das variáveis pH e temperatura na atividade da  $\beta$ -galactosidase bruta da levedura *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus*

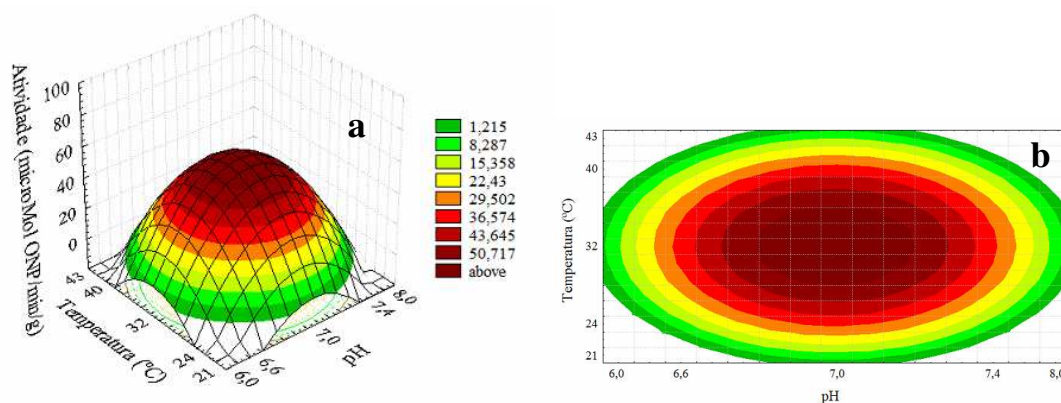
Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Teste <sup>a</sup> F
Regressão	8519,523	4	2129,88075	11,14725
Resíduo	1337,4749	7	191,0678429	
Falta de Ajuste	1337,3476	4		
Erro Puro	0,1273	3		
Total	7182,0481	11		

Coeficiente de determinação:  $R^2 = 0,99$ ;  ${}^aF_{\text{modelo}}$  (regressão/resíduo);  $F_{0,95;4;7} = 4,12$

Após a ANOVA e a validação das variáveis estudadas, o modelo de segunda ordem que representa a atividade da enzima  $\beta$ -galactosidase foi utilizado para gerar as superfícies de resposta e curvas de contorno.

$$\text{Atividade de } \beta\text{-galactosidase} = 57,79 - 0,65.pH - 25,98.pH^2 + 0,78.Temperatura - 25,81.Temperatura^2$$

As superfícies de resposta e as curvas de contorno estão representadas pelas **Figuras 8a** e **8b**. Pode-se observar que houve um aumento na atividade da  $\beta$ -galactosidase em temperaturas próximas a 32°C e em valores de pH próximos ao neutro (pH 7,0).



**Figura 8.** Superfície de resposta e curva de contorno para estudo do efeito do pH e da temperatura na atividade da  $\beta$ -galactosidase da linhagem *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus*

As  $\beta$ -galactosidases de *Kluyveromyces fragilis* (JURADO *et al.*, 2002), *Kluyveromyces lactis* (JURADO *et al.*, 2002) e *Kluyveromyces marxianus* DSM 5418 (O'CONNELL e WALSH, 2007) apresentaram atividade ótima em estudos univariáveis em pH 6,6; pH 6,9-7,3 e pH 6,8 e temperatura ótima de 37°C, 35°C e 37°C, respectivamente.

Algumas  $\beta$ -galactosidases de *Kluyveromyces* sp. apresentam atividade em temperaturas elevadas como a enzima de *Kluyveromyces marxianus* IMB3 (BRADY *et al.*, 1995) e *Kluyveromyces marxianus* NIBGE-Y-1 (RAJOKA *et al.*, 2004b) que mostraram atividade ótima a 40-50°C e 57°C, respectivamente.

As  $\beta$ -galactosidases de fungos apresentam atividade ótima em pH levemente ácido (PARK *et al.*, 1979). A  $\beta$ -galactosidase de *Aspergillus niger* (JURADO *et al.*, 2002) apresentou atividade ótima em pH 3,0-4,0 e 55-60°C enquanto que a enzima purificada de *Arpergillus oryzae* (PARK *et al.*, 1979), em estudo univariável, mostrou atividade ótima em pH 5,0 e 50-55°C.

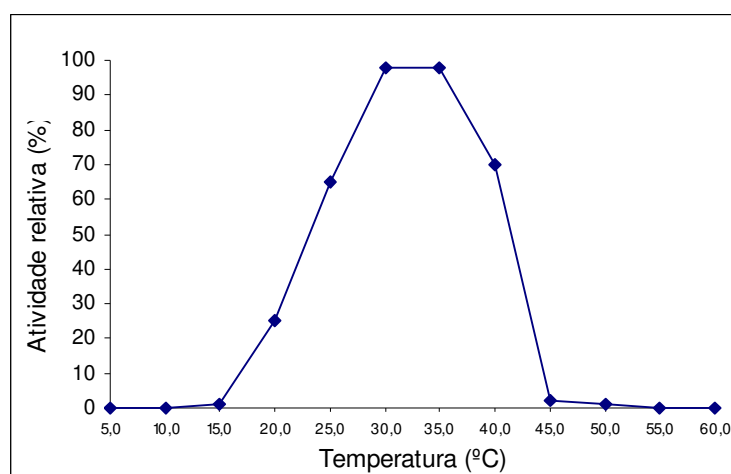
A  $\beta$ -galactosidase purificada de *Kluyveromyces marxianus* DSM 5418, em estudo univariável, apresentou pH ótimo de atividade igual a 6,8 e temperatura ótima de 37°C

(O'CONNELL e WALSH, 2007). As  $\beta$ -galactosidases de *Kluyveromyces fragilis* (BRODSKY E GROOTWASSINK, 1986) e *Kluyveromyces marxianus* (BRADY *et al.*, 1995), em estudo univariável, apresentaram, respectivamente, atividade ótima em pH 5,5-6,0 e pH 7,5.

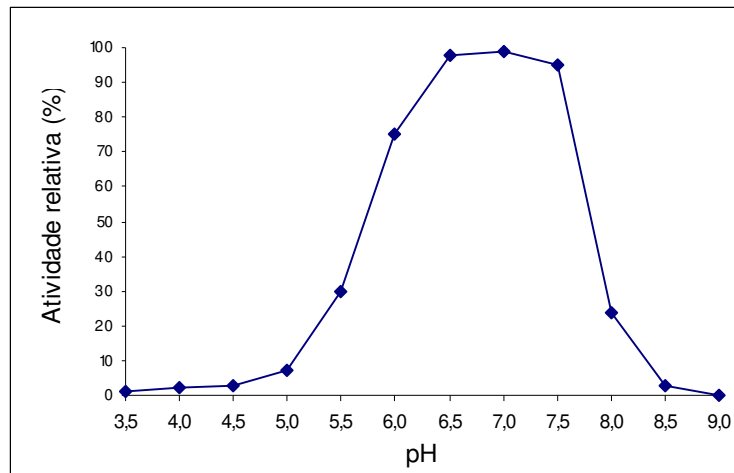
As  $\beta$ -galactosidases de linhagens de *Streptococcus* sp apresentam em geral atividade em temperatura mais elevada do que as  $\beta$ -galactosidases de *Kluyveromyces fragilis*. As  $\beta$ -galactosidases de *Streptococcus thermophilus* (RAMANA e DUTTA, 1981) e *Streptococcus cremoris* H. (JAGOTA *et al.*, 1981) em estudo univariável, apresentaram atividade ótima em pH 6,0- 7,0 e 57°C, e pH 7,0 e 65°C, respectivamente.

#### 4.8.2 Determinação da temperatura e do pH de estabilidade da $\beta$ -galactosidase

As **Figuras 9 e 10** ilustram que a  $\beta$ -galactosidase bruta de *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus* apresentou maior estabilidade na faixa de temperatura entre 30 e 35°C após 3 horas de incubação em pH 7,0 e na faixa de pH entre 6,5-7,5 após 3 horas de incubação a 35°C.



**Figura 9.** Efeito da temperatura na estabilidade da  $\beta$ -galactosidase bruta da linhagem *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus*



**Figura 10.** Efeito do pH na estabilidade da  $\beta$ -galactosidase bruta da linhagem *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus*

A  $\beta$ -galactosidase da espécie *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus* apresentou maior estabilidade na faixa de 30-35°C e pH 6,5-7,5, similar às  $\beta$ -galactosidases de linhagens *Kluyveromyces* sp.

A  $\beta$ -galactosidase da levedura mesofílica *Kluyveromyces marxianus* IMB3 apresentou-se estável a 30°C por pelo menos 8 horas (BRADY *et al.*, 1995). O'CONNELL e WALSH (2007) verificaram que a  $\beta$ -galactosidase bruta de *Kluyveromyces marxianus* DSM5418 manteve 50% ou mais de atividade residual na faixa de pH entre 5,6 e 7,8. A enzima mostrou alta estabilidade quando exposta a condições intestinais (pH entre 5,4-7,8) simuladas *in vitro* por 4 horas e a temperatura ótima de atividade foi 37°C, próxima à temperatura fisiológica (36°C), apresentando 50% de atividade na faixa de 20 a 45°C.

A  $\beta$ -galactosidase neutra da levedura *Kluyveromyces fragilis* apresentou maior estabilidade na faixa de pH 6,5 e 7,0 e entre 30-45°C na sua forma livre, enquanto que a enzima imobilizada em resina alquilamina mostrou maior estabilidade entre pH 5,5-6,5 e 30-40°C (SZCZODRAK, 2000).

A  $\beta$ -galactosidase da levedura *Saccharomyces lactis* manteve 80% da atividade após 30 minutos a 30°C em pH entre 6,6 a 7,7 (WISEMAN, 1975).

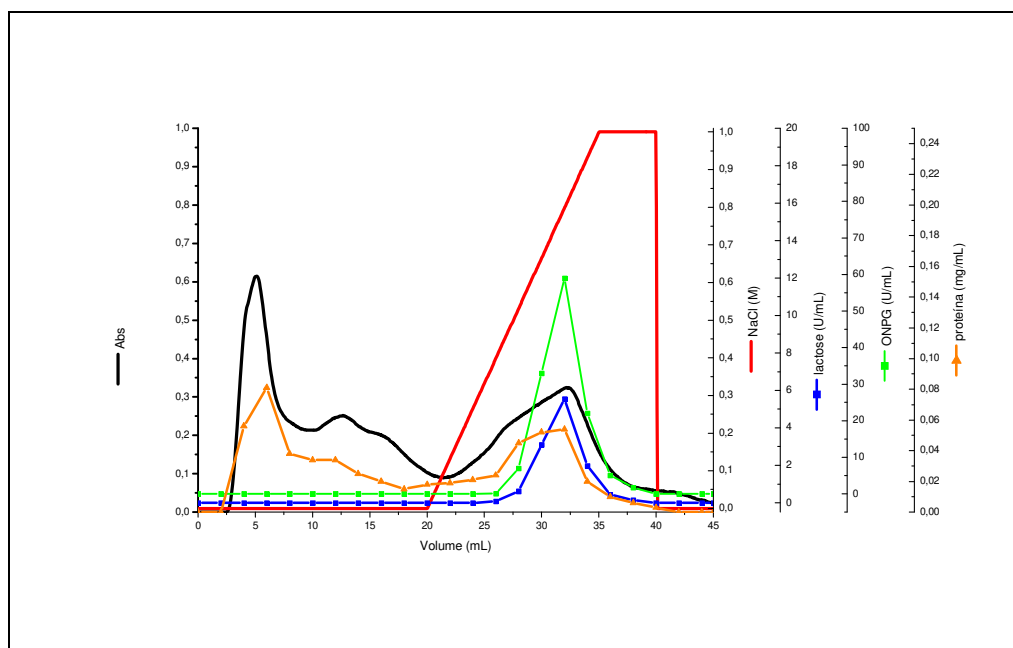
As  $\beta$ -galactosidases de fungos são, em geral, mais termorresistentes que as de bactérias e leveduras. SORENSEN e CRISAN (1974) compararam a termoestabilidade da  $\beta$ -galactosidase do fungo *Mucor pusillus* e da levedura *Kluyveromyces fragilis*. E observaram que, apesar da  $\beta$ -galactosidase de levedura apresentar atividade três vezes maior, 96% dessa atividade se perdia após 10 minutos a 60°C enquanto que a  $\beta$ -galactosidase do fungo perdia apenas 27% da atividade após o mesmo tratamento.

RAO e DUTTA (1981) verificaram que a preparação enzimática purificada de  $\beta$ -galactosidase de *Streptococcus thermophilus* se manteve estável em pH 6,8-7,0. Os autores observaram que a preparação enzimática de *Streptococcus thermophilus* foi mais ativa e apresentou temperatura ótima de atividade mais alta que preparações enzimáticas de *Kluyveromyces fragilis*.

#### **4.9 Purificação da $\beta$ -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus***

A preparação bruta de  $\beta$ -galactosidase obtida de acordo com o item 3.11.1 apresentou valores de atividade enzimática iguais a 110,80 e 9,37U/mL e atividade específica iguais a 368,11 e 31,13U/mg de proteína utilizando-se os substratos ONPG e lactose, respectivamente.

A  $\beta$ -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus* foi purificada através de precipitação com sulfato de amônio e cromatografia em coluna DEAE-Sephacel<sup>®</sup> como descrito nos itens 3.11.2 e 3.11.3, respectivamente. A  $\beta$ -galactosidase adsorvida foi eluída da coluna com tampão fosfato 0,1M pH 7,0 contendo NaCl 0,6M. A enzima foi purificada 2,3 vezes, com recuperação de 31% e atividade específica de 845,77U/mg utilizando-se ONPG como substrato. A preparação enzimática purificada apresentou alta atividade e poderia ser usada para imobilização e hidrólise da lactose em processo contínuo.



**Figura 11.** Purificação da  $\beta$ -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus* em coluna DEAE-Sephacel<sup>®</sup> em FPLC.

**Tabela 17.** Purificação da enzima  $\beta$ -galactosidase produzida pelo microrganismo *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus*.

Etapa	Volume total (mL)	Proteína (mg/mL)	Atividade Enzimática* (U/mL)	Atividade Total* (U)	Atividade Específica* (U/mg)	Grau de Purificação	Rendimento (%)
Extrato enzimático bruto	50	0,301	110,8	5540,0	368,11	1,00	100
Sulfato de amônio 60%	2	5,034	2300,0	4600,0	456,89	1,24	83
DEAE-Sephacel <sup>®</sup>	10	0,201	170,0	1700,0	845,77	2,30	31

\* Utilizando-se o substrato ONPG

A  $\beta$ -D-galactosidase é produzida por microrganismos como bactérias como a *Escherichia coli* (HIGGINS *et al.*, 1978) ou *Streptococcus lactis* (McFETERS *et al.*, 1969) e várias leveduras, como *Candida pseudotropicalis* (De BALESAND CASTILLO, 1979), *Saccharomyces lactis* (BIERMANN e GLANTZ, 1968) e várias espécies do gênero *Kluyveromyces* (MAHONEY e WHITAKER, 1978; SONAWATET, 1981; THIGIEL e

DEAK, 1989; FIEDUREK e SZCZODRAK, 1994; STRED'ANSKY *et al.*, 1993; BRADYET, 1995).

MAHONEY e WHITAKER (1978) purificaram a  $\beta$ -galactosidase de *Kluyveromyces fragilis* de massa molecular estimada em 201 kDa através de precipitação com acetona (ou sulfato de amônio), cromatografia de pseudo-afinidade, cromatografia em hidroxiapatita e cromatografia em coluna DEAE-Sephadex A-50. O extrato enzimático obtido foi purificado 14,9 vezes, com recuperação de 61% e atividade específica igual a 226U/mg.

PARK *et al.* (1979) purificaram e caracterizaram a  $\beta$ -galactosidase extracelular do fungo *Aspergillus oryzae*. A enzima foi purificada através de fracionamento com sulfato de amônio, cromatografia em coluna de DEAE-celulose e cromatografia em coluna DEAE-Sephadex-A50. A enzima purificada apresentou pH ótimo igual a 5,0 e temperatura ótima de 50°C, entretanto a  $\beta$ -galactosidase da preparação enzimática bruta mostrou atividade a 55°C. A enzima apresentou maior estabilidade na faixa de pH entre 3,5-8,0.

A  $\beta$ -galactosidase de *Streptococcus cremoris H*, um microrganismo que fermenta lactose, foi purificada por fracionamento com sulfato de amônio 40-60% de saturação. Nesse processo somente 10% da proteína foi recuperada da solução enzimática e mais de 50% da enzima do extrato bruto foi perdida. A enzima foi purificada aproximadamente 2,6 vezes indicando que enzima era facilmente desnaturada. A  $\beta$ -galactosidase purificada apresentou atividade ótima a 65°C e pH 7,0. Íons  $Mn^{2+}$  ativaram a enzima (JAGOTA *et al.*, 1981).

RAO e DUTTA (1981) purificaram e estudaram as propriedades da  $\beta$ -galactosidase de *Streptococcus thermophilus*. A enzima foi purificada através de fracionamento por precipitação com sulfato de amônio e acetona, filtração em gel em Sephadex G-200 e cromatografia de troca iônica em coluna DEAE-Sephadex A-50. A preparação enzimática purificada exibiu um pH ótimo entre 6,0-7,0 e temperatura ótima de 57°C. A enzima se manteve estável em pH 6,8-7,0. A  $\beta$ -galactosidase apresentou massa molecular estimada em 600 kDa. Os autores observaram que a preparação enzimática de *Streptococcus*



*thermophilus* foi mais ativa e apresentou atividade em temperatura mais alta que preparações enzimáticas de *Kluyveromyces fragilis*.

GREENBERG e MAHONEY (1982) purificaram a  $\beta$ -galactosidase de *Streptococcus thermophilus*. A preparação de  $\beta$ -galactosidase obtida pela lise das células com lisozima apresentou 849U/mL e atividade específica de 40,1U/mg. A preparação enzimática bruta foi purificada aproximadamente 3,3 vezes por precipitação com sulfato de amônio e cromatografia de troca iônica DEAE-Sephadex A-50. A maior atividade foi observada em pH 7,1 na presença dos íons potássio e manganês. A preparação enzimática purificada de  $\beta$ -galactosidase apresentou atividade específica de 132U/mg/min.

## 5 CONCLUSÕES

No estudo da produção de  $\beta$ -1,3-glucanase extracelular da bactéria *Cellulosimicrobium cellulans* 191, em meio otimizado composto de 10g/L de parede celular de levedura, 2,0g/L de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; 0,2g/L de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  em tampão fosfato 0,2M, pH 7,5 descrito por SCOTT e SCHEKMAN (1980) e modificado por SOARES (2002), foi obtida maior produção da  $\beta$ -1,3-glucanase na fermentação do microrganismo em frascos agitados do que em fermentador. Na fermentação do microrganismo em frascos Erlenmeyer aletados durante 24 horas a 30°C, 200rpm foram obtidos 0,724U de  $\beta$ -1,3-glucanase/mL e 0,120U de protease/mL enquanto que em fermentador de 5L com aeração de 1,5vvm, a 30°C durante 24 horas, foram obtidos 0,351U de  $\beta$ -1,3-glucanase/mL e 0,064U de protease/mL.

Os compostos sacarose (10mM), lactose (10mM), maltose (10mM), glicerol (10mM), gelatina (125mg/mL), albumina de ovo (125mg/mL), sulfato de amônio (10mM), EDTA (10mM),  $\beta$ -mercaptoetanol (10mM) e cisteína (10mM) não aumentaram a estabilidade da  $\beta$ -1,3-glucanase da preparação enzimática bruta durante aquecimento a 45°C, 50°C e 55°C. A preparação enzimática bruta de  $\beta$ -1,3-glucanase manteve a atividade de lise da parede celular de *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus* após 1 hora de tratamento térmico a 45°C, sendo inativada após 1 hora a 50°C.

Entre os métodos de concentração da preparação enzimática bruta de  $\beta$ -1,3-glucanase por liofilização, ultrafiltração (10 kDa), fracionamento com sulfato de amônio, pela remoção de água com carboximetilcelulose (CMC), amido modificado e precipitação com os solventes orgânicos acetona e etanol, o melhor resultado foi alcançado utilizando-se sacos de diálise e CMC (Sigma) em pó para a adsorção da água, sendo que a  $\beta$ -1,3-glucanase foi concentrada 6,38 vezes com manutenção de 96% da atividade inicial. A preparação enzimática bruta de  $\beta$ -1,3-glucanase foi purificada aproximadamente 1,8 vezes, com recuperação de 85% por fracionamento com sulfato de amônio 30% de saturação e diálise.

A  $\beta$ -1,3-glucanase da preparação enzimática bruta foi purificada aproximadamente 6,66 vezes através de fracionamento com sulfato de amônio a 30% de saturação, dessalinização em coluna de exclusão Sephadex PD10 e cromatografia em coluna de troca iônica DEAE-Sephacel<sup>®</sup>, com rendimento de 18,4%.

Entre cinco linhagens de leveduras de *Kluyveromyces* sp. testadas, a linhagem *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus* foi selecionada como maior produtora da enzima  $\beta$ -galactosidase.

As preparações enzimáticas bruta, concentrada e purificada de  $\beta$ -1,3-glucanase da bactéria *Cellulosimicrobium cellulans* 191 apresentaram capacidade de formar protoplastos e lisar as células da levedura *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus* a 35°C. Para a formação de protoplastos foi utilizado 0,1U de  $\beta$ -1,3-glucanase por mL de suspensão de levedura equivalente a 0,1U por 1,3mg de massa celular seca, durante 1 hora a 35°C.

Entre os métodos de extração de  $\beta$ -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus* testados foi obtido melhor resultado, 25,13U/mg de massa celular seca por minuto, utilizando-se pré-tratamento das células de levedura com  $\beta$ -1,3-glucanase durante 35 minutos a 37°C seguido de três tratamentos durante 20 segundos em ultrasonicador a 180-200 watts. O pré-tratamento das células de levedura com  $\beta$ -1,3-glucanase aumentou a susceptibilidade das células à lise com ultrasonicador. Utilizando-se os métodos de permeabilização com etanol 50%, aplicação de  $\beta$ -1,3-glucanase purificada, ultrasonicação, permeabilização com tolueno 20% e aplicação de  $\beta$ -1,3-glucanase bruta foram obtidos, respectivamente, atividades de  $\beta$ -galactosidase iguais a 14,00; 13,11; 10,95; 10,75 e 7,25U/mg de massa celular seca por minuto utilizando-se lactose como substrato.

A  $\beta$ -galactosidase bruta apresentou atividade ótima em pH 7,0 e 32°C e mostrou-se estável na faixa de 30 - 35°C após 3 horas em pH 7,0 e na faixa de pH entre 6,5 e 7,5 após 3 horas a 35°C.

A  $\beta$ -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus* foi purificada 2,3 vezes após fracionamento com sulfato de amônio a 60% de saturação, diálise e cromatografia em coluna de troca iônica DEAE-Sephacel<sup>®</sup>, com rendimento de 31%.

As preparações enzimáticas bruta e purificada da  $\beta$ -1,3-gluconase lítica da bactéria *Cellulosimicrobium cellulans* 191 podem ser utilizadas na obtenção de protoplastos de leveduras e extração de enzimas intracelulares de leveduras.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AMRANE, A.; PRIGENT, Y. Behaviour of the yeast *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* during its autolysis. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v.69, n°3, p.267-272, 1996.
2. ANDERSON, J.M.; RICKENBERG, H.V.  $\beta$ -galactosidase of *Paracolibacterium aerogenoides*. **Journal of Bacteriology**, v.80, p297, 1960.
3. ANDREWS, B.A.; ASENJO, J.A. Continuous-culture studies of synthesis and regulation of extracellular  $\beta$ -1,3-glucanase and protease enzymes from *Oerskovia xanthineolytica*. **Biotechnology and Bioengineering**, v.30, p.628-637, 1987.
4. ANEMA, P.J. Purification and some properties of  $\beta$ -galactosidase of *Bacillus subtilis*, **Bioch. Biophys. Acta**, v.89, p.495, 1964.
5. ASENJO, J.A.; ANDREWS, B.A.; HUNTER, J.B.; LECORRE, S. Microbial cell lytic enzyme systems: production and reaction kinetics. **Process Biochemistry**, v.20, p.159, 1985.
6. BACON, J.S.D.; DAVIDSON, E.D.; JONES, D.; TAYLOR, I.F. The location of chitin in the yeast cell wall. **Biochemical Journal**, v.101, n°2, p.36c-38c, 1966.
7. BACON, J.S.D., FARMER, V.C., JONES, D., TAYLOR, F.I. The glucan components of the cell wall of bakers yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) considered in relation to its ultra-structure. **Biochemical Journal**, v.114, p.557-567, 1969.
8. BACON, J.S.D.; GORDON, A.H.; JONES, D.; TAYLOR, I.F.; WEBLEY, D.M. The separation of  $\beta$ -glucanase produced by *Cytophaga johnsonii* and their role in the lysis of yeast cell walls. **Biochemical Journal**, v.120, p.67-78, 1970.
9. BAHL, O.P.; AGRAWAL, K.M.L. Glicosidases of *Aspergillus niger*. Purification and characterization of na  $\beta$ -galactosidases e  $\beta$ -N-acetylglucosaminidase. **The Journal of Biological Chemistry**, v.244, n°11, p.2970-2978, 1969.
10. BALDWIN, C.V.; CAMPBELL, W.R. Enhanced disruption of *Candida utilis* using enzymatic pretreatment and high-pressure homogenization. **Biotechnology and Bioengineering**, v.43, p.46-56, 1994.
11. BALLOU, C.E., "Yeast Cell Wall and Cell Surface" in The molecular biology of the yeast *Saccharomyces*: Metabolism and gene expression, J.N. Stratton, E.W.Jones and J.R. Broach, Eds. (Cold Spring Harbor Laboratory, NY), p.335-361, 1982.
12. BECERRA, M.; GONZÁLEZ-SISO, M.I. Yeast  $\beta$ -galactosidase in solid-state fermentations. **Enzyme and Microbial Technology**, v.19, p.39-44, 1996.
13. BECERRA, M.; PRADO, S.D.; RODRIGUEZ-BALMONTE, E.; CERDAN, M.E.; SISO, M.I.G. Metabolic engineering for direct lactose utilization by *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology Letters**, v.24, p.1391-1396, 2002.
14. BELEM, M.A.F.; LEE, B.H. Production of Bioingredients from *Kluyveromyces marxianus* grown on whey: an alternative. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.38, p.565-598, 1998.

15. BHOWMIK, T.; MARTH, E.H.  $\beta$ -galactosidase of *Pediococcus species*: induction, purification and partial characterization. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.33, p.317-323, 1990.
16. BIERMANN, L; GLANTZ, M.D. Isolation and characterization of  $\beta$ -galactosidase from *Saccharomyces lactis*. **Biochim Biophys Acta**, v.167, p.373, 1968.
17. BORGLUM, G.B.; STERNBERG, M.Z. Properties of a fungal lactase. **Journal of Food Science**, v.37, p.619, 1972.
18. BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein using the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-255, 1976.
19. BRADY, D.; MARCHANT, R.; MCHALE, L; MCHALE, A. P. Isolation and partial characterization of  $\beta$ -galactosidase activity produced by a thermotolerant strain of *Kluyveromyces marxianus* during growth on lactose-containing media **Enzyme and Microbial Technology**, v.17, p.696-699, 1995.
20. BRODSKY, J.A.; GROOTWASSINK, J.W.D. Development and evaluation of whole-cell yeast lactase for use in dairy processing. **Journal of Food Science**. v.51, n°4, p.897-903, 1986.
21. BÜLLER, H.A. Clinical aspects of lactose intolerance in children and adults. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, v.26, suppl. 188, p.73-80, 1991.
22. BÜLLER, H.A.; GRAND, R.J. Lactose intolerance. **Annual Review of Medicine**, v.41, p.141-148, 1990.
23. CAPUTO, R.; LELOIR, L.F.; TRUCO, R.E. Lactase and lactose fermentation in *Saccharomyces fragilis*. **Enzymology**, v.12, p.350, 1948.
24. CEBECI, A.; GÜRAKAN, C. Properties of potential probiotic *Lactobacillus plantarum* strains. **Food Microbiology**, v.20, n°5, p.511-518, 2003.
25. CHAMBERS, R.S.; BROUGHTON, M.J.; CANNON, R.D.; CARNE, A.; EMERSON, G. W.; SULLIVAN, P.A. An exo- $\beta$ -(1,3)-glucanase of *Candida albicans*: purification of the enzyme and molecular cloning of the gene. **Journal of General Microbiology**, v.139, p.325-334, 1993.
26. CHAMPLUVIER, B.; KAMP, B.; ROUXHET, P.G. Preparation and properties of  $\beta$ -galactosidase confined in cells of *Kluyveromyces sp.* **Enzyme and Microbial Technology**, v.10, n°10, p.611-617, 1988.
27. CITTI, J.E.; SANDINE, W.E.; ELLIKER, P.R.  $\beta$ -galactosidase of *Streptococcus lactis*. **Journal of Bacteriology**, v.89, n°4, p.937-942, 1965.
28. COHN, M; MONOD, J. Specific inhibition and induction of enzyme biosynthesis. *In* Adaptation in microorganisms. Davies, R.; Gale, E.F., eds. Cambridge University Press, Cambridge, England, 1953.

29. CURDA, L.; RUDOLFOVÁ, J.; DRYÁK, B. Dried buttermilk containing galactooligosaccharides-process layout and its verification. **Journal of Food Engineering**, v.77, n°3, p.468-471, 2006.
30. DECLEIRE, M.; DE-CAT, W.; VAN-HUYNH, N. Comparison of various permeabilization treatments by determining in situ  $\beta$ -galactosidase activity. **Enzyme and Microbial Technology**, v.9, p.300-302, 1987.
31. DOI, K.; DOI, A.; FUKUI, T. Purification and properties of lytic  $\beta$ -glucanase from an *Arthrobacter bacterium*. **Agricultural and Biological Chemistry**, v.37, n°7, p.1619-1627, 1973.
32. DONZELLI, B.G.G.; SIEBERT, K.J.; HARMAN, G.E. Response surface modeling of factors influencing the production of chitinolytic and  $\beta$ -1,3-Glucanolytic enzymes in *Trichoderma atroviride* strain P1. **Enzyme and Microbial Technology**, v.37, p.82-92, 2005.
33. ESCUREDO, P.R.; AYALA, A.; PARRADO, J. Use of electrophoretic titration curves in the purification of a  $\beta$ -1,3 glucanase from *Oerskovia xanthineolytica*. **Biotechnology Techniques**, v.11, n°2, p.63-66, 1997.
34. FARKADE, V.D.; HARRISON, S.T.L.; PANDIT, A.B. Improved cavitation cell disruption following pH pretreatment for the extraction of  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces lactis*. **Biochemical Engineering Journal**, v.31, n°1, p.25-30, 2006.
35. FERRER, P.; HALKIER, T.; HEDEGAARD, L.; SAVVA, D.; DIERS, I.; ASENJO, J.A. Nucleotide sequence of a  $\beta$ -1,3-glucanase isozyme IIa gene of *Oerskovia xanthineolytica* LL G109 (*Cellulomonas cellulans*) and initial characterization of the recombinant enzyme expressed in *Bacillus subtilis*. **J Bacteriol**, v.178, p.4751-4757, 1996.
36. FERRO, L.A. Produção, purificação e caracterização da enzima  $\beta$ -1,3-glucanase de *Cellulomonas cellulans* YLM-B191-1 e ação da enzima na parede celular de leveduras. 174p. **Tese de doutorado**. Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Brasil, 2002.
37. FINOCCHIARO, T.; OLSON, N.F.; RICHARDSON, T. Use of immobilized lactase in milk systems. **Advances in Biochemical Engineering**, v.15, p.71-88, 1980.
38. FLEET, G.H. Composition and structure of yeast cell wall. In McGunnus, M.R. (Ed.) **Current Topics Medical Mycology**, Springer-Verlag, v.1, p.24-56, 1985.
39. FLEET, G.H.; MANNERS, D.J. Isolation and composition of an alkali-soluble glucan from the cell walls of *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of General Microbiology**, v.94, p.180-192, 1976.
40. FLEURI, L.F.  $\beta$ -1,3-glucanases, proteases e quitinases: Produção, purificação e aplicação. 213p. **Tese de doutorado**. Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Brasil, 2006.
41. FLEURI, L.F. Produção de  $\beta$ -1,3-glucanases, proteases líticas e quitinases por microrganismos e aplicação na lise de leveduras. 141p. **Dissertação de mestrado**, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 2003.

42. FLOOD, M.T.; KONDO, M. Toxicity evaluation of a  $\beta$ -galactosidase preparation produced by *Penicillium multicolor* **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v.40, n°3, p.281-292, 2004.
43. FLORES, M.V., VOGET, C.E., ERTOLA, J.J. – Permeabilization of yeast cells (*Kluyveromyces lactis*) with organic solvents. **Enzyme and Microbial Technology**, v.16, n°4, p.340-346, 1994.
44. GACTO, M.; VICENT-SOLER, J.; CANSADO, J.; VILLA, T.G. Characterization of an extracellular enzyme system produced by *Micromonospora chalcea* with lytic activity on yeast cells. **Journal of Applied Microbiology**, v.88, n°6, p.961-967, 2000.
45. GLANDORF, D.C.M; BAKKER, P.A.H.M; VAN-LOON, L.C. Influence of the production and anti bacterial and antifungal proteins by transgenic plants of saprophytic soil microflora. **Acta Botanica Neerlandica**, v.46, n°1, p.85-104, 1997.
46. GOTO-YAMAMOTO, N.; SATO, S.; MIKI, H.; PARK, Y.; TADENUMA, M. Taxonomic studies on yeast-lysing bacteria, and a new species *Rarobacter incanus*. **Journal General Applied Microbiology**, v.39, p.261-272, 1993.
47. GREENBERG, N.A.; MAHONEY RR. Production and Characterization of  $\beta$ -galactosidase from *Streptococcus thermophilus*. **Journal of Food Science**, v.47, p.824-1835, 1982.
48. GUL-GUVEN, R.; GUVEN, K.; POLI, A.; NICOLAUS, B. Purification and some properties of a  $\beta$ -galactosidase from the thermoacidophilic *Alicyclobacillus acidocaldarius* subsp.*rittmannii* isolated from Antarctica. **Enzyme and Microbial Technology**, v.40, p.1570-1577, 2007.
49. HARJU, M. Lactose hydrolysis. **B. International Dairy Federal**, v.212, p.50-54, 1987.
50. HARTLAND, R.P; VERMEULEN, C.A.; KLIS, F.M.; SIETSMA, J.H.,WESSELS, J.G.H.;The linkage of (1-3)- $\beta$ -glucan to chitin during cell wall assembly in *Saccharomyces cerevisiae*, **Yeast**, v.10, p.1591-1599, 1994.
51. HASUO, T.; YAMAMOTO, N.; SAITO, K.; TADENUMA, M. Studies on yeast lysing microorganism (1). Isolation of a yeast-lysing microorganism from activated sludge and its characteristics. **Journal of the Brewing Society of Japan- Nippon Jozo Kyokai Zasshi**, v.79, p.510-516, 1984.
52. HINTON, D.M.; PRESSEY, R. Glucanases in fruits and vegetables. **Journal of American Society for Horticultural Science**, v.105, n°4, p.499-502, 1980.
53. HUNTER, J.B; ASENJO, J.A. A structure mechanistic model of the kinetics of enzymatic lysis and disription of yeast cell. **Biotechnology and Bioengineering**, v.31, p.929-943, 1988.
54. INCHAURRONDO, V.A.; FLORES, M.V.; VOGET, C.E. Growth and  $\beta$ -galactosidase synthesis in aerobic chemostat cultures of *Kluyveromyces lactis*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.20, p.291–298, 1998.



55. INCHAURRONGO, V.A.; FLORES, M.V.; VOGET, C.E. Yeast growth and  $\beta$ -galactosidase production during aerobic batch cultures in lactose-limited synthetic medium. **Proceedings in Biochemistry**, v.29, p.47–54, 1994.
56. ITOH, T.; OHASHI, M.; TOBA, T.; ADASH, S. Purification and properties of  $\beta$ -galactosidase from *Lactobacillus bulgaricus*. **Milchwissenschaft**, v.35, p.593-597, 1980.
57. JAGOTA, S.K.; RAO, M.V.; DUTTA, S.M. Beta-galactosidase of *Streptococcus cremoris*. **Journal of Food Science**, v. 46, p.161-168, 1981.
58. JAYUS, O. J., McDOUGALL, B.M.; SEVIOUR, R.J Synthesis of extracellular (1-3) and (1-6)- $\beta$ -glucanase activities in carbon limiting chemostat culture by the fungus *Acremonium sp.* IMI 383068. **Enzyme and Microbial Technology**, v.36, n°5, p.680-686, 2005.
59. JOHNSON, A.; SEMENYA, J.G; BUCHOWSKI, M.S., ENWONWU, C.O.; SCRIMSHAW, N.S. Correlation of lactose maldigestion, lactose intolerance and milk intolerance. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.57, p.399-401, 1993.
60. JOSHI, M.S.; GOWDA, L.R.; KATWA, L.C.; BHAT, S.G. Permeabilization of yeast cells (*Kluyveromyces fragilis*) to lactose by digitonin. **Enzyme Microbiology and Technology**, v.11, p.439-1065, 1989.
61. JURADO, E.; CAMACHO, F.; LUZÓN, G.; VICARIA, J.M. A new kinetic model proposed for enzymatic hydrolysis of lacyose by a  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. **Enzyme and Microbila technology**, v.31, p.300-309, 2002.
62. KANEKO, T.; KITAMURA, K.; YAMAMOTO, Y. Susceptibilities of yeasts cell wall lytic enzyme of *Arthrobacter luteus*. **Agricultural and Biological Chemistry**, v.37, n°10, p.2295-2302, 1973.
63. KAPTEYN, J.C.; HOYER, L.L.; HECHT, J.E.; MÜLLER, W.H., ANDEL, A.; VERKLEIJ, A.J.; MAKAROW, M; VAN DEN ENDE, H.; KLIS, M. The cell wall architecture of *Candida albicans* wild-type cells and cell wall defective mutants. **Molecular Microbiology**, v.35, p.601-611, 2000.
64. KAPTEYN, J.C.; VAN DEN ENDE, H.; KLIS, F.M. The contribution of cell wall proteins to the organization of the yeast cell wall. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1426, p.373-383, 1999.
65. KIERS, J., ZEEMAN, A.M., LUTTIK, M., THIELE, C., CASTRILLO, J.I., STEENSMA, H.Y., VAN DIJKEN, J.P.; PRONK, J.T. Regulation of alcoholic fermentation in batch and chemostat cultures of *Kluyveromyces lactis* CBS 23359. **Yeast**, v.14, p.459–469, 1998.
66. KIM, K.S.; CHANG, J.E.; YUN, H.S. Estimation of a soluble  $\beta$ -glucan content of yeast cell wall by the sensitivity to Glucanex<sup>®</sup>200G treatment. **Enzyme and Microbial Technology**, v.35, n°6, p.672-677, 2004.

67. KIM, K.S.; YUN, H.S. Production of soluble  $\beta$ -glucan from cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. **Enzyme and Microbial Technology**, v.39, p. 496-500, 2006.
68. KIM, Y.S.; PARK, C.S.; OH, D.K. Lactulose production from lactose and fructose by a thermostable  $\beta$ -galactosidase from *Sulfolobus solfataricus*. **Enzyme and Microbial Technology**, v.39, n°4, p.903-908, 2006.
69. KITAMURA, K. A high yeast cell wall lytic enzyme producing mutant of *Arthrobacter luteus*. **Journal Ferment Technol**, v.60, p.253-256, 1982.
70. KITAMURA, K.; KANEKO, T.; YAMAMOTO, Y. Lysis of viable yeast cells by enzymes of *Arthrobacter luteus*. II. Purification and properties of an enzyme, Zymolyase, which lyses viable yeast cells. **Journal General Applied Microbiology**, v.20, p.323-344, 1974.
71. KITAMURA, K.; YAMAMOTO, Y. Purification and properties of an enzyme, Zymolyase, which lyses viable yeast cells. **Arch Biochem Biophys** v.153, p.403-406, 1972.
72. KLEWICK, R. Formation of gal-sorbitol during lactose hydrolysis with  $\beta$ -galactosidase. **Food Chemistry**, v.100, p.1196-1120, 2007.
73. KLIS, F.M. Review: Cell wall assembly in yeast. **Yeast**, v.10, p.851-869, 1994.
74. KOLLÁR, R.; PETRAKOVA, E.; ASHWELL, G.; ROBBINS, P.W.; CABIB, E. Architecture of the yeast cell wall. **Journal of Biological Chemistry**, v.270, n°3, p.1170-1178, 1995.
75. KOLLÁR, R.; REINHOLD, B.B.; PETRAKOVA, E.; YEH, H.J.C.; ASHWELL, G.; DRGONOVA, J.; KAPTEYN, J.C.; KLIS, F.M.; CABIB, E. Architecture of the yeast cell wall.  $\beta$ -(1-6)-glucan interconnects mannoprotein,  $\beta$ -(1-3)-glucan, and chitin. **Journal of Biological Chemistry**, v.272, n°28, p.17762-17775, 1997.
76. KOPECKÁ, M., PHAFF, H.J.; FLEET, J.H. Demonstration of a fibrillar component in the cell wall of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* and its chemical nature. **Journal of Cell Biology**, v.62, p.66, 1974.
77. KREFT, M.E.; JELEN, P. Stability and activity of  $\beta$ -galactosidase in sonicated cultures of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* 11842 as affected by temperature and ionic environments. **Journal of Food Science**, v.65, n°8, p.1364-1368, 2000.
78. KREGER, D.R.; KOPECKÁ, M. On the nature and formation of the fibrillar nets produced by protoplasts of *Saccharomyces cerevisiae* in liquid media: An electronmicroscopic, X-Ray diffraction and chemical study. **Journal of General Microbiology**, v.92, p.207-220, 1975.
79. LIPKE, P.N.; OVALLE, R. Cell wall architecture in yeast: new structure and new challenges. **Journal of Bacteriology**, 1998.
80. LOPANDIC, K.; ZELGER, S.; BÁNSZKY, L.K.; ELISKASES-LECHNER, F.; PRILLINGER, H. Identification of yeasts associated with milk products using traditional and molecular techniques. **Food Microbiology**, v.23, p.341-350, 2006.

81. MACWILLIAM, I.C. The structure and functions of the yeast cell wall – a review. **Journal of the Institute Brewing**, v.76, p.525-535, 1970.
82. MAHONEY, R.R. Galactosyl-oligosaccharide formation during lactose hydrolysis: a review. **Food Chemistry**, v.63, n°2, p.147-154, 1998.
83. MAHONEY, R.R.; WHITAKER, J.R. Purification and physicochemical properties of  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. **Journal of Food Science**, v.43, p.584-591, 1978.
84. MAHONEY, R.R.; WILDER, T. Stabilization of lactase (*Escherichia coli*) by milk components and related compounds. **Journal of Food Science**, v.54, n°4, p.899-901, 1989.
85. MAHONEY, R.R.; WILDER, T. Enhanced thermostability of lactase (*Escherichia coli*) in milk. **Journal of Food Science**, v.52, n°6, p.1730-1731, 1987.
86. MANNERS, DJ, MASSON, A; PATTERSON, J.C. The structure of a  $\beta$ -(1,3)-D-glucan from yeast walls. **Biochemistry Journal**, v.19, p.135, 1973.
87. MAUCH, F.; HADWIGER, L.A.; BOLLER, T. Antifungal hydrolases in pea tissue. **Plant Physiology**, v.87, p.325-333, 1988.
88. McFETERS, R.R.; SANDINE, W.E.; BECKER, R.R.; ELLIKER, P.R. Some factors affecting association-dissociation of  $\beta$ -galactosidase from *Streptococcus lactis* 7962. **Can. J. Microbiology**, v.15, p.105, 1969.
89. MISHRA, C.; SEMINO, C.E.; MCCREATH, K.J.; De La VEGA, H.; JONES, B.J., SPECHT, C.A.; ROBBINS, P.W. Cloning and expression of two chitin deacetylase genes of *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, v.13, p.327-336, 1997.
90. MOLINA, M.; CENAMOR, R.; SANCHEZ, M.; NOMBELA, C. Purification and some properties of *Candida albicans* exo-1,3- $\beta$ -glucanase. **Journal of General Microbiology**, v.135, p.309-314, 1989.
91. MONTEIRO, V.N.; ULHOA J.C. Biochemical Characterization of a  $\beta$ -1,3-glucanase from *Trichoderma koningii* induced by cell wall of *Rhizoctonia solani* **Current Microbiology**, v.52, p.92-96, 2006.
92. MORISI, F.; PASTORE, M.; VIGILIA, A. Reduction of lactose content of milk by entrapped  $\beta$ -galactosidase from yeast and *Escherichia coli*. **Journal of Dairy Science**, v.56, n°9, p.1123-1127, 1973.
93. MRSA, V.; ECKER, M.; STRAHL-BOLSINGER, S.; NIMTZ, M.; LEHLE, L. Deletion of a new covalently linked cell wall glycoproteins alters the electrophoretic mobility of phosphorylated wall components of *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Bacteriology**, v.181, n°10, p.3076-3086, 1999.
94. MRSA, V.; TANNER, W. Role of NaOH – extractable cell wall protein Ccw5p, Ccw6p, Ccw7p e Ccw8p (members of the Pir protein family) in stability of the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. **Yeast**, v.15, n°10A, p.813-820, 1999.
95. NADER DE MACIAS, M.E.; MANTA DE NADRA, M.C.; STRASSER DE SAAD, A.M.; PESCE DE RUIZ HOLGADO, A.A.; OLIVER, G. Isolation and purification

- of  $\beta$ -galactosidase of *Lactobacillus murinus* CNRZ 313. **Current Microbiology**, v.9, p.99-104, 1983.
96. NAGASAKI, S.; NISHIOKA, Y.; MORI, H.; YAMAMOTO, S. Purification and properties of lytic  $\beta$ -1,3-glucanase from *Flavobacterium dormitator* var. *glucanolyticae*. **Agricultural and Biological Chemistry**, v.40, n°6, p.1059-1067, 1976.
  97. NAKAGAWA, T.; FUJIMOTO, Y.; IKEHATA, R.; MIYAJI, T.; TOMIZUKA, N. Purification and molecular characterization of cold-active  $\beta$ -galactosidase from *Arthrobacter psychrolactophilus* strain F2. **Appl Microbiol Biotechnol**, V.72, p.720–725, 2006.
  98. NAKKHARAT, P.; HALTRICH, D. Purification and characterization of an intracellular enzyme with  $\beta$ -glucosidase and  $\beta$ -galactosidase activity from the thermophilic fungus *Talaromyces thermophilus* CBS 236.58. **Journal of Biotechnology**, v. 123, N°3, p.304-313, 2006.
  99. NELSON, N. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v.153, p.375-381, 1944.
  100. NETO, B.D.B. SCARMINIO, I.S.; BRUNS, R.E. Como fazer experimentos: planejamento e otimização de experimentos. Ed. UNICAMP, p.401, 2001.
  101. NORONHA, E.F.; ULHOA, C.J. Purification and characterization of an endo- $\beta$ -1,3-glucanase from *Trichoderma harzanium*. **FEMS Microbiology Letters**, v.42, n°10, p.1039-1044, 1996.
  102. NOVALIN, S.; NEUHAUS, W.; KULBE, K.D. A new innovative process to produce lactose-reduced skim milk. **Journal of Biotechnology**, v.119, n°2, p.212-218, 2005.
  103. O'CONNELL, S.; WALSH, G. Purification and properties of a  $\beta$ -Galactosidase with potential application as a digestive supplement **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.141, 2007.
  104. OBATA, T.; IWATA, H.; NAMBA, Y. Proteolytic enzyme from *Oerskovia* sp CK lysing viable yeast cells. **Agricultural and Biological Chemistry**, v.41, n°12, p.2387-2394, 1977.
  105. OHNO, N.; GOTOH, Y.; HASHIMOTO, Y.; YADOMAE, T. Examination of the active center of a  $\beta$ -1,3-glucanase preparation, Zymolyase. Tokyo Coll. Pharm., Tokyo, Japan. **Chemical e Pharmaceutical Bulletin**, v.36, n°3, p.1007-1015, 1988.
  106. PANESAR, P.S.; PANESAR, R.; SINGH, R.S., KENNEDY, J.F.; KUMA, H. Microbial production, immobilization and applications of  $\beta$ -D-galactosidase. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v.81, p.530-543, 2006.
  107. PARK, Y.K.; DE SANTI, S.S.; PASTORE, G.M. Production and Characterization of a  $\beta$ -galactosidase from *Aspergillus oryzae*. **Journal of Food Science**, v.44, n°1, p.100-103, 1979.

108. PARRADO, J.; ESCUREDO, P.R.; CONEJERO-LARA, F.; KOTIL, M.; PONTING, C.P.; ASENJO, J.A.; DOBSON, C.M. Molecular Characterization of a thermoactive  $\beta$ -1,3-glucanase from *Oerskovia xanthineolitica*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1296, p.145-151, 1996.
109. PASTORE, G.M.; PARK, Y.K. Screening of high  $\beta$ -galactosidase – producing fungi and characterizing the hydrolysis properties of a selected strain. **Journal of Food Science**, v.44, p.1577, 1979.
110. PHAFF, H.J., “Structure and biosynthesis of the yeast cell envelope”, **The Yeasts**, v.2, R.Harrison and A. Rose, Eds. (Academic, New York), 1971.
111. PINHEIRO, I. BELO; M. MOTA Growth and  $\beta$ -galactosidase activity in cultures of *Kluyveromyces marxianus* under increased air pressure R. **Letters in Applied Microbiology**, v.37, p.438-442, 2003.
112. PIVARNIK, L.F.; RAND, A.G. Assay conditions effect on  $\beta$ -galactosidase activity from *Kluyveromyces lactis*. **Journal of Food Science**, v.57, n°4, p.1021, 1992.
113. POPPOLO, L.; VAI, M. The gas1 glycoprotein, a putative wall polymer cross-linker. **Biochimica et Biophysica Acta – General Subjectives**, v.1426, n°2, p.385-400, 1999.
114. RAJOKA, M.I.; KHAN, S.; SHAHID, R. Kinetics and regulation studies of the production of  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces marxianus* grown on different substrates. **Food Technology Biotechnology**, v.41, p.315-320, 2004a.
115. RAJOKA, M.I., LATIF, F., KHAN, S.; SHAHID, R. Kinetics of improved productivity of  $\beta$ -galactosidase by a cycloheximide-resistant mutant of *Kluyveromyces marxianus*. **Biotechnology Letters**, v.26, p.741-746, 2004b.
116. RAMANA RAO, D. Oral supplements to improve lactose digestion and tolerance / Aportes orales para mejorar la digestión y la tolerancia de la lactosa. **Food Science and Technology International**, v. 3, n°2, p.87-92, 1997.
117. RANZI, B.M., PORRO, D., COMPAGNO, C.; MARTEGANI, E. Protein and cell volume distributions during the production of beta galactosidase in batch cultures of *Kluyveromyces lactis*. **Journal of Biotechnology**, v.5, p.227-231, 1987.
118. RAO, M.V.; DUTTA, S.M. Purification and properties of Beta-galactosidase from *Streptococcus thermophilus*. **Journal of Food Science**, v.46, p.1419-1423, 1981.
119. RECH, R.; CASSINI, C.F.; SECCHI, A.; AYUB, M. Utilization of protein-hydrolyzed cheese whey for production of  $\beta$ -galactosidase by *Kluyveromyces marxianus*. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v.23, p.91–96, 1999.
120. ROWLEY, B.I.; BULL, A.T. Isolation of a yeast-lysing *Arthrobacter* species and production of the lytic enzyme complex in batch and continuous-flow fermentors. **Biotechnology and Bioengineering**, v.19, p.879-899, 1977.
121. RYAN; E.; WARD, O. The application of lytic enzymes from *Basidiomycete aphyllorphores* in production of Yeast. **Process Biochem.**, v.12, 1988.

- 122.RYDER, D.N. Hydrolysis of lactose in whey products. **B. International Dairy Federal**, v.233, p.45-52, 1989.
- 123.SAEKI, K.; IWATA, J.; YAMAZAKI, S.; WATANABE, Y.; TAMAI, Y. Purification and characterization of a yeast lytic  $\beta$ -1,3-glucanase from *Oerskovia xanthineolytica* TK-1. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v.78, n°6, p.407-412, 1994.
- 124.SALAZAR, O.; ASENJO, J.A. Enzymatic lysis of microbial cells. **Biotechnology Letters**, v.29, p.984-994, 2007.
- 125.SALAZAR, O.; BASSO, C.; BARBA, P.; ORELLANA, C.; ASENJO, J.A. Improvement of the lytic properties of a  $\beta$ -1,3- glucanase by directed evolution. **Molecular Biotechnology**, v.33, p.211–220, 2006.
- 126.SALAZAR, O.; MOLITOR, J.; LIENQUEO, M.E.; ASENJO, J.A. Overproduction, purification and characterization of  $\beta$ -1,3-glucanase type II in *Escherichia coli*. **Protein, Expression and Purification**, v.23, n°2, p.219-225, 2001.
- 127.SANTOS, L.F. Produção, purificação, caracterização e estudo da aplicação de uma protease alcalina produzida por *Cellulosimicrobium cellulans* 191. 97p. **Tese de doutorado**. Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Brasil, 2004.
- 128.SCOTT, J.H. e SCHEKMAN, R. Lyticase: endoglucanase and protease activities that act together in yeast cell lysis. **Journal of Bacteriology**, v.142, p.414-423, 1980.
- 129.SHAH, N.P.; SPURGEON K.R.; GILMORE, T.M. Use of dry whey and lactose hydrolysis in yogurt bases. **Milk Science International**, v.48, n°9, p.494-498, 1993.
- 130.SHIMOI, H.; MURANAKA, Y.; SATO, S.; SAITO, K.; TADENUMA, M. Purification of the enzymes responsible for the lysis of yeast cell by *Rarobacter faecitabidus*. **Agricultural and Biological Chemistry**, v.55, p.371-378, 1991.
- 131.SHIN, H.J.; PARK, J.M.; YANG, J.W. Continuous production of galacto-oligosaccharides from lactose by *Bullera singularis*  $\beta$ -galactosidase immobilized in chitosan beads. **Process Biochemistry**, v.33, n°8, p.787-792, 1998.
- 132.SISO, M.I.G.; DOVAL, S.S. *Kluyveromyces lactis* immobilization on corn grits for milk whey lactose hydrolysis. **Enzyme Microb. Technology**, v.16, p.303-310, 1994.
- 133.SOARES, G.A.M. Enzimas que lisam a parede celular de leveduras: Clonagem e sequenciamento do gene da  $\beta$ -1,3-glucanase lítica de *Cellulomonas cartae* n°191. 150p. **Tese de doutorado**. Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Brasil, 2002.
- 134.SOMKUTI, G.A.; HOLSINGER, V.H. Microbial technologies in the production of low-lactose dairy foods / Tecnologías microbiológicas para la elaboración de productos lácteos con bajo contenido en lactosa **Food Science and Technology International**, v. 3, n° 3, p.163-169, 1997.

- 135.SOMKUTI, G.A.; STEINBERG, D.H.  $\beta$ -D-Galactoside galactohydrolase of *Streptococcus thermophilus*: induction, purification and properties. **Journal of Applied Biochemistry**, v.1, p.357, 1979.
- 136.SOMOGYI, M. Notes on sugar determination. A new reagent for determination of sugars. **Journal of Biological Chemical**, v.195, p.19-23, 1952.
- 137.SORENSEN, S.G.; CRISAN, E.V. Thermostable lactase from thermophilic fungi. **Journal of Food Science**, v.39, p.1184-1187, 1974.
- 138.STRATFORD, M. Another brick in the wall? Recent developments concerning the yeast cell envelope. **Yeast**, v.10, p.1741-1752, 1994.
- 139.STRED'ANSKÝ, M.; TOMÁSKA, M.; STURDÍK, E.; KREMnický, L. Optimization of  $\beta$ -galactosidase extraction from *Kluyveromyces marxianus*. **Enzyme Microbiology and Technology**, v.15, p.1063-1065, 1993.
- 140.SUN, H; YANG, J.; LIN, C; HUANG, X.; XING, R.; ZHANG, K.Q. Purification and properties of a  $\beta$ -1,3-glucanase from *Chaetomium sp.* that is involved in mycoparasitism. **Biotechnology Letters**, v.28, p.131-135, 2005.
- 141.SUPHANTAKIRA, M.; KHUNRAE, P.; THANARDKIT, P.; VERDUYN, C. Preparation of brewer's yeast  $\beta$ -glucans with a potential application as an immunostimulant for black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. **Bioresource Technology**, v.88, n°1, p.55-60, 2003.
- 142.SZCZODRAK, J. Hydrolysis of lactose in whey permeate by immobilized  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.10, p.631-637, 2000.
- 143.TANGARONE, B.; ROYER, J.C.; NAKAS, J.P. Purification and characterization of an endo- $\beta$ -1,3-D-glucanase from *Trichoderma longibrachiatum*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.55, n°1, p.1741-1752, 1989.
- 144.THEODORE, K.; PANDA, T. Statistical optimization of production medium for  $\beta$ -1,3 glucanase synthesis by *Trichoderma harzianum*. **Biotechnology Techniques**, v.8, n°6, p.381-384, 1994.
- 145.THRANE, C.; TRONSMO, A.; JENSEN, D.F. Endo-1,3- $\beta$ -glucanase and cellulose from *Trichoderma harzianum*: purification and partial characterization, induction and biological activity against plant pathogenic *Pythium* spp. **European Journal of Plant Pathology**, v.103, p.331-344, 1997.
146. ULEZLO I. V.; TSERETELI A. K; PORTNAYA I. B.; BEZBORODOV. A. M.  $\beta$ -Galactosidase of the extreme thermophilic anaerobic bacterium *Thermoanaerobium* sp. 2905 and its immobilization. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v.37, n°1, p.48-52, 2001.
- 147.VALENTIN, E.; HERRERO, E.; RICO, H.; MIRAGALL, F.; SENTANDREU, R. Cell wall mannoproteins during the population growth phases in *Saccharomyces cerevisiae*. **Archives of Microbiology**, v.148, n°2, p.88-94, 1987.

148. VENTOM, A.M., ASENJO, J.A. Characterization of yeast lytic enzymes from *Oerskovia xanthineolytica* LL-G109. **Enzyme Microb. Technol.** v.13, p.71–75, 1991.
149. VENTOM, A.M.; ASENJO, J.A. Purification of the major glucanase of *Oerskovia xanthineolytica* LL-G109. **Biotechnology Techniques**, v.4, n°3, p.165-170, 1990.
150. WENDORFF, W.L.; AMUNDSON, C.H. Characterization of  $\beta$ -galactosidase from *Saccharomyces fragilis*. **Journal Milk Food Technology**, v.34, p.300, 1971.
151. WIERZBICKI, L.E.; KOSIKOWSKI, F.V. Lactase potencial of various microorganisms grown in whey. **Journal Dairy Science**, v.56, p.26, 1971.
152. WISEMAN, A. Handbook of Enzyme Biotechnology. John Wiley and Sons, New York, 1975.
153. YAMAMOTO, N.; NAGASAKI, S. Purification and characterization of exo- $\alpha$ -1,2-mannanase from *Flavobacterium dormitator* var. *glucanolyticae*. **Agricultural and Biological Chemistry**, v.39, p.1981-1989, 1975.
154. YAMAMOTO, N.; SATO, S.; SAITO, K.; HASUO, T.; TADENUMA, M.; SUZUKI, K.; TAMAOKA, J.; KOMAGATA, K. *Rarobacter faecitabidus* gen. nov., sp. Nov., a yeast-lysing *Coryneform bacterium*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.38, p.7-11, 1988.
155. ZADOW, J.G. Lactose hydrolysis. **Whey and lactose processing**. In: Zadow JG, editor. London, New York: Elsevier, p.361-408, 1992.
156. ZHANG, Y.; YUEN, G.Y. Effects of the culture fluids and preinduction of chitinase production on biocontrol of *Biopolaris* leaf spot by *Stenotrophomonas maltophilia* C3. Department of Plant Pathology. University of Nebraska, Lincoln, Nebraska, Published Electronically, 2000.
157. ZLOTINIK, H.; FERNANDEZ, M.P.; BOWERS, B.; CABIB, E. *Saccharomyces cerevisiae* mannoproteins from an external cell wall layer that determines wall porosity. **Journal of Bacteriology**, v.159, p.1018-1026, 1984.
158. ZOMER, E.; ER-EL, Z.; ROKEM, J.S. Production of intracellular enzymes by enzymatic treatment of yeast. **Enzyme and Microbial Technology**, v.9, n°5, 1987



## 7 ANEXOS

### Anexo 1 - Curva padrão de densidade ótica x massa celular seca

