

**Universidade Estadual de Campinas
Faculdade de Engenharia de Alimentos
Departamento de Ciência de Alimentos**

**β -1,3 GLUCANASES, PROTEASES E QUITINASES:
PRODUÇÃO, PURIFICAÇÃO E APLICAÇÃO**

LUCIANA FRANCISCO FLEURI
Mestre em Ciência de Alimentos

Profa. Dra. Hélia Harumi Sato
Orientadora

Tese de Doutorado em Ciência de Alimentos

Campinas/SP
2006

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

F639b Fleuri, Luciana Francisco
β-1,3 glucanases, proteases e quitinases: produção, purificação e aplicação / Luciana Francisco Fleuri. -- Campinas, SP: [s.n.], 2006.

Orientador: Hélia Harumi Sato
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos

1. Beta-1,3 glucanases. 2. Enzimas proteolíticas. 3. Quitinases.
4. Lise enzimática. I. Sato, Hélia Harumi. II. Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

(cars/fea)

Titulo em inglês: β-1,3 glucanases, proteases and chitinases: production and application

Palavras-chave em inglês (Keywords): Beta-1,3 glucanases, Proteolytic enzymes, Chitinases, Enzymatic lysis

Titulação: Doutor em Ciências de Alimentos

Banca examinadora: Hélia Harumi Sato

Gabriela Alves Macedo

Márcia Nitschke

Ranulfo Monte alegre

Severino Matias Alencar

Telma Teixeira Franco

Programa de Pós Graduação: Programa em Ciências de Alimentos

BANCA EXAMINADORA

Tese defendida e aprovada em de de 2006, pela banca
examinadora constituída pelos professores:

Hélia Harumi Sato
(orientadora)

Gabriela A. Macedo
(membro)

Márcia Nitschke
(membro)

Ranulfo M. Alegre
(membro)

Severino M. Alencar
(membro)

Telma T. Franco
(membro)

Ao meu marido **Thiago**, ao meu filho **Diogo**, à minha mãe **Ivani**, ao meu pai **Reginaldo** e à
minha irmã **Mariana**,

Dedico.

“O valor das coisas não está no tempo que elas duram, mas na intensidade com que
acontecem. Por isso, existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e pessoas
incomparáveis.”

(Fernando Pessoa)

Nada disso seria possível sem vocês!

Muito obrigada por tudo!

À Professora **Hélia**,

Dedico.

“Se consegui enxergar mais longe é porque me apoiei em ombros de gigantes.”

(Isaac Newton)

Muito obrigada por tudo!

Agradecimentos

À Fapesp pelo apoio financeiro.

Aos membros da banca pelas correções e sugestões.

À todos os amigos do laboratório, em especial ao Haroldo.

À todos os professores, em especial à Profa. Gláucia.

Às técnicas Dora, Priscila, Beatriz e Iramaia.

Às minhas amigas Fernanda, Larissa e Denise.

À toda família.

“O essencial é invisível aos olhos, só se vê bem com o coração!”

(Saint Exupéry)

ÍNDICE GERAL

RESUMO	1
SUMMARY	3
CAPÍTULO I: PRODUÇÃO, PURIFICAÇÃO, CLONAGEM E APLICAÇÃO DE ENZIMAS LÍTICAS	5
SUMMARY	6
PRODUCTION, PURIFICATION, CLONING AND APPLICATION OF LYTIC ENZYMES	6
INTRODUÇÃO.....	7
Composição da parede celular de leveduras.....	8
Mananoproteínas.....	8
β -1,3 glucana	10
Quitina	11
Produção de enzimas líticas.....	13
Purificação de enzimas líticas.....	24
Clonagem.....	26
Aplicações	27
CONCLUSÕES.....	32
AGRADECIMENTOS	33
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33
CAPÍTULO II: ESTUDO DO EFEITO DO pH, TEMPERATURA E AGITAÇÃO NA PRODUÇÃO DE β -1,3 GLUCANASES, PROTEASES E QUITINASES	39
RESUMO	39
SUMMARY	41
INTRODUÇÃO.....	43
MATERIAL E MÉTODOS.....	46
Material.....	46
Métodos	46
Manutenção dos microrganismos	46

Estudo do efeito do pH, temperatura e agitação na produção de β -1,3 glucanases, proteases e quitinases em diferentes tempos de fermentação, em diferentes meios de cultivos, em frascos agitados, utilizando planejamento experimental	46
Estudo da produção de β -1,3 glucanase pela linhagem <i>Cellulosimicrobium cellulans</i> 191.....	47
Estudo da produção de proteases pelas linhagens B26 e <i>C. cellulans</i> 191.....	48
Estudo da produção de quitinase pela linhagem <i>C. cellulans</i> 191.....	48
Determinação da atividade de β -1,3 glucanase	49
Determinação da atividade de protease lítica	49
Determinação da atividade de quitinase	50
RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
Estudo do efeito do pH, temperatura e agitação na produção de β -1,3 glucanases, proteases e quitinases em diferentes tempos de fermentação, em diferentes meios de cultivos, em frascos agitados, utilizando planejamento experimental	51
Estudo da produção de β -1,3 glucanase pela linhagem <i>C. cellulans</i> 191.....	51
Estudo da produção de proteases pelas linhagens B26 e <i>C. cellulans</i> 191.....	61
Estudo da produção de quitinase pela linhagem <i>C. cellulans</i> 191.....	81
CONCLUSÕES.....	91
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	93
CAPÍTULO III: ESTUDO DA PRODUÇÃO DE β -1,3 GLUCANASES, PROTEASES E QUITINASES PELA LINHAGEM <i>Cellulosimicrobium cellulans</i> 191, EM FERMENTADOR DE 5L	97
RESUMO	97
SUMMARY	98
INTRODUÇÃO.....	99
MATERIAL E MÉTODOS.....	102
Estudo da produção de β -1,3 glucanases, proteases e quitinases pela linhagem <i>Cellulosimicrobium cellulans</i> 191 em fermentador New Brunswick de 5 L, em diferentes condições de aeração	102
Determinação da atividade de β -1,3 glucanase	103
Determinação da atividade de protease lítica	103
Determinação da atividade de quitinase	103

RESULTADOS E DISCUSSÃO	105
Estudo da produção de β -1,3 glucanases, proteases e quitinases pela linhagem <i>Cellulosimicrobium cellulans</i> 191 em Fermentador New Brunswick de 5 L, em diferentes condições de aeração	105
Estudo da produção de β -1,3 glucanase	105
Estudo da produção de protease	111
Estudo da produção de quitinase	117
CONCLUSÕES.....	124
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	125
CAPÍTULO IV: PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO DE β -1,3 GLUCANASES, PROTEASES E QUITINASES DA LINHAGEM <i>Cellulosimicrobium cellulans</i> 191	127
RESUMO	127
SUMMARY	128
INTRODUÇÃO.....	129
MATERIAL E MÉTODOS.....	133
Produção de β -1,3 glucanases, proteases e quitinases pela linhagem <i>Cellulosimicrobium cellulans</i> 191, respectivamente nos meios de cultivos A, B e C, em frascos agitados, nas condições de pH, temperatura e agitação estabelecidas previamente através de planejamentos experimentais.....	133
Purificação parcial das enzimas β -1,3 glucanase, protease e quitinase da linhagem <i>Cellulosimicrobium cellulans</i> 191	134
Purificação parcial de β -1,3 glucanase através de cromatografia em coluna de troca iônica DEAE-Sephadex A50.....	134
Purificação parcial de protease através de cromatografia em coluna de troca iônica DEAE-Sephadex A50.....	134
Purificação parcial de quitinase através de cromatografia em coluna de filtração em gel Sepharose CL4B200	134
Eletofórese da β -1,3 glucanase, protease e quitinase em gel SDS-poliacrilamida	135
RESULTADOS E DISCUSSÃO	136

Produção de β -1,3 glucanase, protease e quitinase pela linhagem <i>Cellulosimicrobium cellulans</i> 191, respectivamente em meios de cultivos A, B e C, em frascos agitados, nas condições de pH, temperatura e agitação estabelecidas nos planejamentos experimentais	136
Purificação parcial das enzimas β -1,3 glucanase, protease e quitinase da linhagem <i>Cellulosimicrobium cellulans</i> 191	136
Purificação parcial de β -1,3 glucanase através de cromatografia em coluna de troca iônica DEAE-Sephadex A50 e eletroforese em SDS-PAGE	136
Purificação parcial da protease através de cromatografia em coluna de troca iônica DEAE-Sephadex A50 e eletroforese em SDS-PAGE	142
Purificação parcial de quitinase através de cromatografia em coluna de filtração em gel Sepharose CL4B200 e eletroforese em SDS-PAGE	147
CONCLUSÕES	154
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	155
CAPÍTULO V: APLICAÇÕES DE β -1,3 GLUCANASE, PROTEASE E QUITINASE DA LINHAGEM <i>Cellulosimicrobium cellulans</i> 191	159
RESUMO	159
SUMMARY	160
INTRODUÇÃO	161
MATERIAL E MÉTODOS	164
Aplicações das enzimas purificadas	164
Aplicação da β -1,3 glucanase e protease purificadas na lise de leveduras	164
Obtenção das suspensões de células de leveduras	164
Determinação da atividade lítica	164
Aplicação da β -1,3 glucanase purificada na lise de leveduras - Observação em microscópio óptico	165
Aplicação da β -1,3 glucanase purificada na formação de protoplastos - Observação em microscópio óptico	165
Aplicação da quitinase purificada na lise de fungos – Observação em microscópio óptico	166
Obtenção de células fúngicas	166
Aplicação da quitinase purificada na lise de fungos	166

Aplicação das preparações bruta e purificada de quitinase na inibição de fungos.....	167
Aplicação das enzimas β -1,3 glucanase, protease P3 e quitinase purificadas na formação de compostos antioxidantes.....	167
Atividade seqüestrante do radical DPPH pelos produtos formados pela ação das enzimas purificadas sobre diferentes substratos.....	168
RESULTADOS E DISCUSSÃO	169
Aplicação da β -1,3 glucanase e protease P3 purificadas na lise de leveduras	169
Aplicação da β -1,3 glucanase purificada na lise de leveduras - Observação em microscópio óptico	174
Aplicação da β -1,3 glucanase purificada na formação de protoplastos - Observação em microscópio óptico	179
Aplicação da quitinase purificada na lise de fungos – Observação em microscópio óptico	183
Aplicação das preparações bruta e purificada de quitinase na inibição de fungos.....	187
Aplicação das enzimas purificadas na formação de compostos antioxidantes.....	189
CONCLUSÕES.....	195
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	196
CONCLUSÕES FINAIS	201
SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	205
ANEXO DO CAPÍTULO II.....	207
Estudo do efeito do pH, temperatura e agitação na produção de β -1,3 glucanases pelas linhagens B1 e <i>C. cellulans</i> 191 em meio de cultivo A contendo 1% de parede celular como indutor, em frascos agitados, utilizando planejamento experimental.....	207
ANEXO DO CAPÍTULO III.....	211
Estudo da produção de proteases pela linhagem B26 em Fermentador New Brunswick de 5 L, em diferentes condições de aeração	211

ÍNDICE DAS TABELAS E FIGURAS DO CAPÍTULO I

Tabelas

Tabela I 1. Microrganismos produtores de enzimas líticas e indutores utilizados para a produção das enzimas líticas	18
Tabela I 2. Sistemas enzimáticos líticos de microrganismos	20
Tabela I 3. Purificação e caracterização de enzimas líticas	25
Tabela I 4. Clonagem e expressão de genes que codificam a produção de β -1,3 glucanases de diversos organismos	27
Tabela I 5. Enzimas líticas envolvidas no biocontrole de fitopatógenos	32

Figuras

Figura I 1. Hidrólise da β -1,3 glucana pela β -1,3 glucanase	13
Figura I 2. Hidrólise da quitina pela quitinase	15
Figura I 3. Hidrólise da mananoproteína pela protease lítica.....	15
Figura I 4. Lise enzimática da célula de levedura e formação de protoplasto	29

ÍNDICE DAS TABELAS E FIGURAS DO CAPÍTULO II

Tabelas

Tabela II 1. Variáveis independentes, níveis e valores reais utilizadas no planejamento fatorial para o estudo da produção de β -1,3 glucanases pela linhagem <i>C. cellulans</i> 191	47
Tabela II 2. Variáveis independentes, níveis e valores reais utilizadas no planejamento fatorial para o estudo da produção de protease pelas linhagens B26 e <i>C. cellulans</i> 191	48
Tabela II 3. Variáveis independentes, níveis e valores reais utilizadas no planejamento fatorial para o estudo da produção de quitinase pela linhagem <i>C. cellulans</i> 191	49

Tabela II 4. Estudo do efeito do pH, temperatura e agitação na produção de β -1,3 glucanase pela linhagem <i>C. cellulans</i> 191, em diferentes tempos de fermentação, em frascos agitados, utilizando planejamento experimental.....	51
Tabela II 5. Estimativa dos efeitos das variáveis independentes (pH, temperatura e agitação) na produção de β -1,3 glucanase pela linhagem <i>C. cellulans</i> 191, em frascos agitados.....	55
Tabela II 6. Resultados do coeficiente de regressão, desvio padrão e limites de confiança no estudo do efeito das variáveis independentes (pH, temperatura e agitação) na produção de β -1,3 glucanase pela linhagem <i>C. cellulans</i> 191	57
Tabela II 7. Análise de variância no estudo do efeito das variáveis independentes (pH, temperatura e agitação) na produção de β -1,3 glucanase pela linhagem <i>Cellulosimicrobium cellulans</i> 191	58
Tabela II 8. Estudo do efeito do pH, temperatura e agitação na produção de protease pela linhagem B26, em diferentes tempos de fermentação, em frascos agitados	61
Tabela II 9. Estimativa dos efeitos das variáveis independentes (pH, temperatura e agitação) na produção de protease pela linhagem B26.....	65
Tabela II 10. Resultados do coeficiente de regressão, desvio padrão e limites de confiança no estudo do efeito das variáveis independentes (pH, temperatura e agitação) na produção de protease pela linhagem B26.....	66
Tabela II 11. Análise de variância no estudo do efeito das variáveis independentes (pH, temperatura e agitação dos frascos) na produção de protease pela linhagem B26.....	66
Tabela II 12. Estudo do efeito do pH, temperatura e agitação na produção de protease pela linhagem <i>C. cellulans</i> 191, em diferentes tempos de fermentação, em frascos agitados.....	71
Tabela II 13. Estimativa dos efeitos das variáveis independentes (pH, temperatura e agitação) na produção de protease pela linhagem <i>C. cellulans</i> 191	75
Tabela II 14. Resultados do coeficiente de regressão, desvio padrão e limites de confiança no estudo do efeito das variáveis independentes (pH, temperatura e agitação) na produção de protease pela linhagem <i>C. cellulans</i> 191	76

Tabela II 15. Análise de variância no estudo do efeito das variáveis independentes (pH, temperatura e agitação) na produção de protease pela linhagem <i>C. cellulans</i> 191	76
Tabela II 16. Estudo do efeito do pH, temperatura e agitação na produção de quitinase pela linhagem <i>C. cellulans</i> 191, em diferentes tempos de fermentação, em frascos agitados.....	81
Tabela II 17. Estimativa dos efeitos das variáveis independentes (pH, temperatura e agitação) na produção de quitinase pela linhagem <i>C. cellulans</i> 191	85
Tabela II 18. Resultados do coeficiente de regressão, desvio padrão e limites de confiança no estudo do efeito das variáveis independentes (pH, temperatura e agitação) na produção de quitinase pela linhagem <i>C. cellulans</i> 191	86
Tabela II 19. Análise de variância no estudo do efeito das variáveis independentes (pH, temperatura e agitação) na produção de quitinase pela linhagem <i>C. cellulans</i> 191	86

Figuras

Figura II 1. Produção de β -1,3 glucanase pela linhagem <i>C. cellulans</i> 191 após 18, 24 e 30 h de fermentação, nos ensaios realizados de acordo com o planejamento experimental fatorial.....	53
Figura II 2. Superfícies de resposta e curvas de contorno obtidas no planejamento experimental fatorial para a produção de β -1,3 glucanase pela linhagem <i>C. cellulans</i> 191 como resposta para: (a) e (b) pH e temperatura; (c) e (d) pH e agitação e (e) e (f) temperatura e agitação.....	59
Figura II 3. Produção de protease pela linhagem B26 após 24, 30 e 36h de fermentação, nos ensaios realizados de acordo com o planejamento experimental fatorial ...	63
Figura II 4. Superfícies de resposta e curvas de contorno obtidas no planejamento experimental fatorial para a produção de protease pela linhagem B26 como resposta para: (g) e (h) pH e temperatura; (i) e (j) pH e agitação e (k) e (l) temperatura e agitação	69

Figura II 5. Produção de protease pela linhagem <i>C. cellulans</i> 191 após 24, 30 e 36 h de fermentação, nos ensaios realizados de acordo com o planejamento experimental fatorial.....	73
Figura II 6. Superfícies de resposta e curvas de contorno obtidas no planejamento experimental fatorial para a produção de protease pela linhagem <i>C. cellulans</i> 191 como resposta para: (m) e (n) pH e temperatura e (o) e (p) pH e agitação.....	79
Figura II 7. Produção de quitinase pela linhagem <i>C. cellulans</i> 191 após 72, 96 e 120 h de fermentação, nos ensaios realizados de acordo com o planejamento experimental fatorial.....	83
Figura II 8. Superfícies de resposta e curvas de contorno obtidas no planejamento experimental fatorial para a produção de quitinase pela linhagem <i>C. cellulans</i> 191 como resposta para: (q) e (r) pH e temperatura; (s) e (t) pH e agitação e (u) e (v) temperatura e agitação.....	89

ÍNDICE DAS TABELAS E FIGURAS DO CAPÍTULO III

Tabelas

Tabela III 1. Estudo da produção de β -1,3 glucanase pela linhagem <i>C. cellulans</i> 191, em fermentador de 5 L, em meio de cultivo A contendo 1% de parede celular de levedura em tampão fosfato 0,2 M, pH 7,5 a 30°C, 200 rpm e 1,5 vvm.....	105
Tabela III 2. Estudo da produção de β -1,3 glucanase pela linhagem <i>C. cellulans</i> 191, em fermentador de 5 L, em meio de cultivo A contendo 1% de parede celular de levedura em tampão fosfato 0,2 M, pH 7,5 a 30°C, 200 rpm e 3,0 vvm.....	109
Tabela III 3. Estudo da produção de protease pela linhagem <i>C. cellulans</i> 191, em fermentador de 5 L, em meio de cultivo B contendo 8% de parede celular de levedura em tampão fosfato 0,15 M, pH 6,5 a 30°C, 150 rpm e 1,5 vvm.....	112
Tabela III 4. Estudo da produção de protease pela linhagem <i>C. cellulans</i> 191, em fermentador de 5 L, em meio de cultivo B contendo 8% de levedura seca em tampão fosfato 0,15 M, pH 6,5 a 30°C, 150 rpm e 3,0 vvm.....	115

Tabela III 5. Estudo da produção de quitinase pela linhagem <i>C. cellulans</i> 191, em fermentador de 5 L, em meio de cultivo C contendo 1,5% de quitina neutralizada a 25°C, 200 rpm e 1,5 vvm.....	118
Tabela III 6. Estudo da produção de quitinase pela linhagem <i>C. cellulans</i> 191, em fermentador de 5 L, em meio de cultivo C contendo 1,5% de quitina neutralizada a 25°C, 200 rpm e 3,0 vvm.....	121

Figuras

Figura III 1. Estudo da produção de β -1,3 glucanase pela linhagem <i>C. cellulans</i> 191, em fermentador de 5 L, em meio de cultivo A contendo 1% de parede celular de levedura em tampão fosfato 0,2 M, pH 7,5 a 30°C, 200 rpm e 1,5 vvm	107
Figura III 2. Estudo da produção de β -1,3 glucanase pela linhagem <i>C. cellulans</i> 191, em fermentador de 5 L, em meio de cultivo A contendo 1% de parede celular de levedura em tampão fosfato 0,2 M, pH 7,5 a 30°C, 200 rpm e 3,0 vvm	109
Figura III 3. Estudo da produção de protease pela linhagem <i>C. cellulans</i> 191, em fermentador de 5 L, em meio de cultivo B contendo 8% de levedura seca em tampão fosfato 0,15 M, pH 6,5 a 30°C, 150 rpm e 1,5 vvm.....	113
Figura III 4. Estudo da produção de protease pela linhagem <i>C. cellulans</i> 191, em fermentador de 5 L, em meio de cultivo B contendo 8% de levedura seca em tampão fosfato 0,15 M, pH 6,5 a 30°C, 150 rpm e 3,0 vvm.....	115
Figura III 5. Estudo da produção de quitinase pela linhagem <i>C. cellulans</i> 191, em fermentador de 5 L, em meio de cultivo C contendo 1,5% de quitina neutralizada a 25°C, 200 rpm e 1,5 vvm.....	119
Figura III 6. Estudo da produção de quitinase pela linhagem <i>C. cellulans</i> 191, em fermentador de 5 L, em meio de cultivo C contendo 1,5% de quitina neutralizada a 25°C, 200 rpm e 3,0 vvm.....	121

ÍNDICE DAS TABELAS E FIGURAS DO CAPÍTULO IV

Tabelas

Tabela IV 1. Purificação da β -1,3 glucanase da linhagem <i>Cellulosimicrobium cellulans</i> 191 em coluna de DEAE-Sephadex A50.....	137
Tabela IV 2. Purificação da protease da linhagem <i>Cellulosimicrobium cellulans</i> 191 em coluna de DEAE-Sephadex A50	143
Tabela IV 3. Purificação da quitinase da linhagem <i>Cellulosimicrobium cellulans</i> 191 em coluna de Sepharose CL4B200.....	149

Figuras

Figura IV 1. Purificação da β -1,3 glucanase da linhagem <i>Cellulosimicrobium cellulans</i> 191 através de cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-Sephadex A50	137
Figura IV 2. Eletroforese da β -1,3 glucanase purificada em gel SDS-poliacrilamida.....	139
Figura IV 3. Relação entre o Rf e o log da massa molecular das proteínas em gel SDS-poliacrilamida para a determinação da massa molecular da β -1,3 glucanase purificada	139
Figura IV 4. Purificação da protease da linhagem <i>Cellulosimicrobium cellulans</i> 191 através de cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-Sephadex A50	143
Figura IV 5. Eletroforese da fração de protease P3 em gel SDS-poliacrilamida.....	145
Figura IV 6. Relação entre o Rf e o log da massa molecular das proteínas em gel SDS-poliacrilamida para a determinação da massa molecular da fração de protease P3 parcialmente purificada	145
Figura IV 7. Purificação da quitinase da linhagem <i>Cellulosimicrobium cellulans</i> 191 em coluna de Sepharose CL4B200.....	149
Figura IV 8. Eletroforese da quitinase purificada em gel SDS-poliacrilamida	151
Figura IV 9. Relação entre o Rf e o log da massa molecular das proteínas em gel SDS-poliacrilamida para a determinação da massa molecular da quitinase purificada	151

ÍNDICE DAS TABELAS E FIGURAS DO CAPÍTULO V

Tabelas

Tabela v 1. Estudo da lise de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> KL-88, <i>Saccharomyces capensis</i> , <i>Debaromyces vanriji</i> , <i>Pachysolen tannophilus</i> , <i>Kluyveromyces drosophilarum</i> , <i>Candida glabrata</i> , <i>Hansenula mrakii</i> e <i>Pichia membranaefaciens</i> utilizando as preparações de β -1,3 glucanase e protease P3 purificadas	170
Tabela v 2. Atividade antioxidante do produto da reação da β -1,3 glucanase sobre laminarina	190
Tabela v 3. Atividade antioxidante do produto da reação da protease sobre levedura seca	191

Figuras

Figura v 1. Estudo da lise de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> KL-88, <i>Saccharomyces capensis</i> , <i>Debaromyces vanriji</i> , <i>Pachysolen tannophilus</i> , <i>Kluyveromyces drosophilarum</i> , <i>Candida glabrata</i> , <i>Hansenula mrakii</i> e <i>Pichia membranaefaciens</i> utilizando as preparações de β -1,3 glucanase e protease P3 purificadas	171
Figura v 2. Lise de leveduras com β -1,3 glucanase purificada	175 e 177
Figura v 3. Protoplastos obtidos a partir de células de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> KL-88 após ação da β -1,3 glucanase purificada da linhagem <i>C. cellulans</i> 191 – Observação em microscópio óptico com aumento de 1000 vezes (imersão)..	181
Figura v 4. Protoplastos obtidos a partir de células de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 26602 após ação da Novozym 234 (preparação comercial) – Observação em microscópio óptico com aumento de 1000 vezes (imersão).....	181
Figura v 5. Lise de fungos com quitinase purificada.....	185
Figura v 6. Inibição do crescimento de fungos em placas de ágar batata dextrose utilizando a preparação bruta da quitinase da linhagem <i>Cellulosimicrobium cellulans</i> 191	187
Figura v 7. Atividade antioxidante dos produtos da reação da β -1,3 glucanase sobre laminarina	191

Figura v 8. Atividade antioxidante dos produtos da reação da protease sobre levedura seca	193
---	-----

ÍNDICE DAS TABELAS DO ANEXO DO CAPÍTULO II

Tabelas

Tabela AII 1. Variáveis independentes, níveis e valores reais utilizadas nos planejamentos fatoriais para o estudo da produção de β -1,3 glucanases pelas linhagens B1 e <i>C. cellulans</i> 191	207
Tabela AII 2. Estudo do efeito do pH, temperatura e agitação na produção de β -1,3 glucanase pela linhagem B1, em diferentes tempos de fermentação, em frascos agitados.....	208
Tabela AII 3. Estudo do efeito do pH, temperatura e agitação na produção de β -1,3 glucanases pela linhagem <i>C. cellulans</i> 191, em diferentes tempos de fermentação, em frascos agitados	209

ÍNDICE DA TABELA E FIGURA DO ANEXO DO CAPÍTULO III

Tabelas

Tabela AIII 1. Estudo da produção de protease pela linhagem B26, em fermentador de 5 L, em meio de cultivo B contendo 8% de levedura seca em tampão fosfato 0,15 M, pH 6,5 a 25°C, 150 rpm e 3,0 vvm.....	211
---	-----

Figuras

Figura AIII 1. Estudo da produção de protease pela linhagem B26, em fermentador de 5 L, em meio de cultivo B contendo 8% de levedura seca em tampão fosfato 0,15 M, pH 6,5 a 25°C, 150 rpm e 3,0 vvm.....	213
---	-----

RESUMO

O presente trabalho visou o estudo da produção, purificação e aplicação de β -1,3 glucanases, proteases e quitinases. A linhagem *Cellulosimicrobium cellulans* 191 foi utilizada para o estudo da produção de β -1,3 glucanases e quitinases e as linhagens B26 e *C. cellulans* 191 foram utilizadas para a produção de proteases, em meios de cultivo contendo diferentes indutores. Foram realizados planejamentos fatoriais 2^3 , e os fatores estudados foram: pH inicial, temperatura ($^{\circ}\text{C}$) e agitação dos frascos. No planejamento experimental para a produção de β -1,3 glucanase foi verificada maior produção da enzima (0,64 U/mL) em meio de cultivo A composto por 2,0 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,2 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 10 g/L de parede celular de levedura em tampão fosfato 0,2 M, pH 8,5, após 24 h de fermentação, a 33°C e 200 rpm. Nos planejamentos experimentais para a produção de protease pelas linhagens B26 e 191 foi verificada maior produção da enzima em meio de cultivo B composto por 2,0 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,2 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 80 g/L de levedura seca utilizada como indutor em tampão fosfato 0,15 M, pH 6,5, após 30 h de fermentação a 20°C e 200 rpm, sendo obtido 5,01 U/mL e 4,25 U/mL, respectivamente. No planejamento experimental para a produção de quitinase foi verificada maior produção da enzima (7,06 U/mL) em meio de cultivo C composto por 4,0 g/L de extrato de levedura; 2,0 g/L de triptona; 4,0 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 1,2 g/L de KH_2PO_4 ; 2,8 g/L de K_2HPO_4 e 15 g/L de quitina neutralizada utilizada como indutor, com pH inicial de 5,5 após 72 h de fermentação a 25°C e 200 rpm. Todos os modelos obtidos foram preditivos e significativos a um nível de confiança de 95%. No estudo de produção das enzimas da linhagem *C. cellulans* 191 em fermentador de 5 L, a maior produção de β -1,3 glucanase, utilizando meio de cultivo A e 1,5 vvm e 3 vvm, foi respectivamente 0,32 U/mL e 0,72 U/mL, após 24 h de fermentação a 30°C . Na produção de protease em fermentador de 5 L, utilizando meio de cultivo B e 1,5 vvm foi obtido 1,87 U/mL e 2,34 U/mL, respectivamente, após 6 h e 30 h de fermentação a 30°C ; enquanto que com 3 vvm, foi obtido 4,89 U/mL e 6,14 U/mL de protease após 6 h e 33 h de fermentação, a 30°C . Em fermentador de 5 L, a maior produção de quitinase em meio de cultivo C foi de 4,19 U/mL com 1,5 vvm após 168 h de fermentação e 4,38 U/mL de quitinase após 144 h de fermentação com 3 vvm, a 25°C . No estudo de produção de β -1,3 glucanases, proteases e quitinases da linhagem *C. cellulans*

191 em frascos agitados, em meios de cultivo A, B e C, foram produzidos respectivamente, 1,12 U/mL de β -1,3 glucanase; 4,2 U/mL de protease e 6,9 U/mL de quitinase. A β -1,3 glucanase (45 KDa) foi purificada 11,83 vezes com rendimento de 25% em resina de troca iônica DEAE-Sephadex A50. Na purificação das proteases em resina de troca iônica DEAE-Sephadex A50 foram obtidas três frações de proteases denominadas P1, P2 e P3. A fração P3 apresentou duas bandas de massas moleculares de 14 e 16 KDa em eletroforese SDS-PAGE. A quitinase (61 KDa) foi purificada cerca de 6,65 vezes com rendimento de 46,61% em resina de filtração em gel Sepharose CL4B200. A β -1,3 glucanase purificada apresentou atividade de lise de diversas leveduras e foi capaz de formar protoplastos da levedura *Saccharomyces cerevisiae* KL-88. O pré-tratamento das leveduras com protease P3 purificada não aumentou a lise das leveduras com a β -1,3 glucanase. A quitinase purificada foi capaz de lisar células de algumas espécies de fungos em suspensão aquosa, mas não foi capaz de inibir, o crescimento dos fungos em placas de ágar batata dextrose. A preparação bruta de quitinase apresentou halo de inibição do crescimento de alguns fungos estudados. Os produtos formados pela reação da β -1,3 glucanase purificada sobre a laminarina e da protease purificada sobre a levedura seca apresentaram capacidade antioxidante.

SUMMARY

The aim of this work was to study the production, purification and application of β -1,3 glucanases, proteases and chitinases. The strain *Cellulosimicrobium cellulans* 191 was used to study the production of β -1,3 glucanases and chitinases and strains B26 and *C. cellulans* 191 for the production of proteases, using culture media containing different inductors. 2^3 factorial experimental designs were performed and the factors studied were: initial pH, temperature ($^{\circ}\text{C}$) and flask rotatory speed. In the experimental design for the production of β -1,3 glucanase, greater enzyme production (0.64 U/mL) was obtained in culture medium A containing 2.0 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0.2 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ and 10 g/L cell wall yeast in 0.2 M phosphate buffer, pH 8.5, after 24 h of fermentation at 33°C and 200 rpm. In the experimental design for the production of protease by strains B26 and 191, greater enzyme production was obtained in culture medium B containing 2.0 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0.2 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ and 80 g/L dry yeast in 0.15 M phosphate buffer, pH 6.5, after 30 h of fermentation at 20°C and 200 rpm, with yields of 5.01 U/mL and 4.25 U/mL, respectively. In the experimental design for the production of chitinase, greater enzyme production (7.06 U/mL) was obtained in culture medium C containing 4.0 g/L yeast extract; 2.0 g/L tryptone; 4.0 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 1.2 g/L KH_2PO_4 ; 2.8 g/L K_2HPO_4 and 15 g/L of neutralized chitin with an initial pH of 5.5, after 72 h of fermentation at 25°C and 200 rpm. All models obtained were predictive and significant at a confidence level of 95%. In the study on the production of enzymes from *C. cellulans* strain 191 in a 5 L fermenter, the highest productions of β -1,3 glucanase in medium A with 1.5 vvm and 3.0 vvm were 0.32 U/mL and 0.72 U/mL respectively, after 24 h of fermentation at 30°C . In the production of protease in a 5 L fermenter using culture medium B and 1.5 vvm, 1.87 U/mL and 2.34 U/mL were obtained after 6 h and 30 h respectively of fermentation at 30°C , whilst with 3 vvm, 4.89 U/mL and 6.14 U/mL of protease were obtained after 6 h and 33 h respectively of fermentation at 30°C . In a 5 L fermenter, the highest production of chitinase from *C. cellulans* strain 191 using 1.5 vvm was 4.19 U/mL after 168 h of fermentation, whilst with 3 vvm, the production was 4.38 U/mL of chitinase after 144 h of fermentation at 25°C . In the study on the production of β -1,3 glucanases, proteases and chitinases from *C. cellulans* strain 191 in shaken flasks and culture media A, B and C, 1.12 U/mL of β -1,3 glucanase;

4.2 U/mL of protease and 6.9 U/mL of chitinase were produced respectively. In the purification study, the β -1,3 glucanase (45 KDa) was purified 11.83 times with a yield of 25% using a DEAE-Sephadex A50 ion-exchange resin. In the purification of the proteases using the DEAE-Sephadex A50 ion-exchange resin, three protease fractions were obtained named P1, P2 and P3. Fraction P3 presented two proteins with molecular weights of 14 and 16 KDa in SDS-PAGE electrophoresis. The chitinase (61 KDa) was purified about 6.65 times with a yield of 46.61% in a Sepharose CL4B200 gel filtration resin. The purified β -1,3 glucanase presented lysis activity against several yeasts and was able to form protoplasts from the *Saccharomyces cerevisiae* KL-88 yeast. Pre-treatment of the yeasts with the purified protease P3 did not increase cell lysis by the β -1,3 glucanase. The purified chitinase was able to lyse the cell walls of some fungal species in aqueous suspension, but was not able to inhibit the growth of these fungi on potato dextrose agar plates. The crude chitinase preparation presented growth inhibition halos for some of the fungi studied. The products formed from the reaction between the purified β -1,3 glucanase and laminarin and between the purified protease and the dry yeast presented antioxidant power.

**CAPÍTULO I: PRODUÇÃO, PURIFICAÇÃO, CLONAGEM E APLICAÇÃO
DE ENZIMAS LÍTICAS**

Artigo de Revisão Publicado na Revista *Quím. Nova*, v. 28, n. 5, p. 871-879, 2005.

Luciana Francisco Fleuri * e Hélia Harumi Sato

Departamento de Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos,
Universidade Estadual de Campinas, CP 6121, 13083-862 Campinas/SP

*e-mail: luciana@fea.unicamp.br

SUMMARY

PRODUCTION, PURIFICATION, CLONING AND APPLICATION OF LYTIC ENZYMES

Lytic enzymes such as β - 1,3 glucanases, proteases and chitinases are able to hydrolyse, respectively, β - 1,3 glucans, mannoproteins and chitin; as well as the cell walls of many yeast species. Lytic enzymes are useful in a great variety of applications including the preparation of protoplasts; the extraction of proteins, enzymes, pigments and functional carbohydrates; pre-treatment for the mechanical rupture of cells; degradation of residual yeast cell mass for the preparation of animal feed; analysis of the yeast cell wall structure and composition; study of the yeast cell wall synthesis and the control of pathogenic fungi. This review presents the most important aspects with respect to lytic enzymes, especially the production, purification, cloning and application.

Keywords: β -1,3 glucanases; lytic proteases; chitinases.

INTRODUÇÃO

A parede celular da levedura *Saccharomyces cerevisiae* é formada por três componentes principais: glucana, um polímero de β -1,3 e β -1,6 glicose (48 - 60%), mananaproteínas (20 - 23%) e quitina, um polímero de β -1,4-N-acetilglicosamina (0,6-2,7%)¹⁻³. A parede celular possui duas camadas principais: uma externa, composta de mananaproteínas e uma interna de glucana^{4,5}.

Muitos microrganismos lisam a parede celular de leveduras. As enzimas envolvidas na lise de leveduras são β -1,3 glucanases, β -1,6 glucanases, mananases, proteases e quitinases. Essas enzimas agem sinergicamente na lise da parede celular, mas somente duas são essenciais para o rompimento da célula: a protease lítica específica que degrada a camada externa de mananaproteína e a β -1,3 glucanase lítica que degrada a camada interna de glucana⁶⁻⁸.

As enzimas que lisam a parede celular de leveduras têm aplicações biotecnológicas na preparação de protoplastos para melhoramento genético de leveduras e no aproveitamento de massa celular de levedura para extração de proteínas, enzimas e pigmentos. A lise enzimática de células de microrganismos também tem potencial de aplicação no tratamento de massa celular de levedura residual de indústrias de fermentação para a preparação de ração animal, na obtenção de carboidratos funcionais da parede celular (glucana e manana) e no pré-tratamento para a ruptura mecânica de células aumentando a eficiência e reduzindo o requerimento de energia⁹.

As enzimas líticas têm sido utilizadas também como ferramenta para a determinação da composição da parede celular de leveduras e no estudo do mecanismo da síntese da parede celular para controle de leveduras patogênicas.

As enzimas líticas são capazes de lisar a parede celular de *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida* sp. e outros gêneros de leveduras o que amplia o campo de utilização dessas enzimas.

Este trabalho tem como objetivo revisar os principais aspectos relacionados à produção, purificação, clonagem e aplicações das enzimas líticas.

COMPOSIÇÃO DA PAREDE CELULAR DE LEVEDURAS

A parede celular de leveduras tem muitas funções: proteção física, estabilidade osmótica, suporte de enzimas, adesão célula/célula e barreira de permeabilidade seletiva¹⁰. Além disso, promove rigidez e o transporte de nutrientes para o citoplasma proporcionando a integridade, o metabolismo e o crescimento celular. Constitui cerca de 15 a 25% da massa seca da célula e não é uma estrutura estática e sim uma estrutura em constante crescimento e mudança. Os componentes da parede celular são sintetizados e unidos entre si; e estruturas especializadas, como os séptos são formados em sincronia com o crescimento e divisão celular¹¹.

A parede celular de leveduras é formada por uma camada de mananaproteínas que sobrepõe a camada de glucana, o que explicaria a resistência das células vivas de leveduras ao ataque das misturas enzimáticas elaboradas por alguns microrganismos^{4,5,12}.

A parede celular de *Saccharomyces* sp. é formada por três componentes principais: glucana, um polímero de β -1,3 e β -1,6 glicose (48-60%), mananaproteínas (20-23%) e quitina, um polímero de β -1,4 N-acetilglicosamina (0,6-2,7%)¹⁻³. As mananaproteínas estão localizadas na parte externa da parede celular e são compostas por polímero de manose com ligações α -1,2, α -1,3 e α -1,6 que estão covalentemente ligadas a peptídeos formando glicopeptídeos¹³⁻¹⁵.

Kapteyn *et al.*¹⁵, Pololo e Vai¹⁶ e Kapteyn *et al.*¹⁷ relataram que proteínas, β -1,6 glucanas, β -1,3 glucanas e quitina da parede celular das leveduras estão interconectadas por ligações covalentes.

A parede celular é uma estrutura dinâmica ajustável durante o ciclo celular e em resposta às condições ambientais como: nutrientes, disponibilidade de O₂, temperatura e pH^{11,18}. Perturbações na parede celular de leveduras desencadeiam mecanismos de reparo que reorganizam toda a estrutura molecular para preservar a integridade da célula^{18,19}.

Mananaproteínas

A camada de mananaproteínas tem a função de proteger a célula contra fatores externos e é responsável pela porosidade da parede celular, enquanto que a camada de

glucana é responsável pela estrutura da parede celular perante choques mecânicos e desequilíbrios osmóticos^{7,11}.

Cabib *et al.*¹¹ sugeriram a existência de ligações cruzadas entre polissacarídeos e mananaproteínas e que a β -1,3 glucana e quitina estão conectadas por uma ligação β -1,4 entre um grupo redutor final de N-acetilglicosamina da quitina e um grupo não redutor da glicose da glucana. Os autores verificaram também a presença de um núcleo central de mananaproteína, em que a quitina e a β -1,3 glucana estão conectadas preferencialmente a cadeias curtas de β -1,6 glucanas. Há evidências que as mananaproteínas estão retidas na parede celular por ligações indiretas com as β -1,3 glucanas, e estas ligadas preferencialmente a cadeias curtas de β -1,6 glucanas e provavelmente porções residuais de glicosilfosfatidilinositol.

Segundo Mrsa *et al.*²⁰⁻²¹ a parede celular de *Saccharomyces* contém mais de 20 tipos de mananaproteínas que desempenham papéis diferentes na construção, preservação, modificação da estrutura e na interação das células com suas adjacências como, por exemplo, as interações intercelulares durante a aglutinação ou floculação. As mananaproteínas podem ser divididas em três grupos:

Proteínas unidas por pontes dissulfeto ou ligações não covalentes com polissacarídeos estruturais da parede. A maioria dessas proteínas apresentam atividades enzimáticas e podem ser extraídas por meio de aquecimento com SDS e mercaptoetanol ou pelo ditiotreitól.

Proteínas ligadas covalentemente principalmente às β - glucanas e que podem somente ser extraídas pela lise da parede celular com diferentes preparações de glucanases como Zymolyase ou laminarinase. A função fisiológica dessas proteínas não é conhecida.

Proteínas, provavelmente, ligadas de forma covalente à parede celular e que podem ser extraídas com NaOH 30 mM. Quatro proteínas pertencentes à esse grupo estão sendo estudadas mais detalhadamente.

β -1,3 glucana

Manners *et al.*²² descreveram a β -1,3 glucana insolúvel em álcali contendo 3 – 6% de ramificações β -1,6 como o principal componente estrutural da parede celular de leveduras. Estudos microscópicos mostraram a agregação destas microfibras na parte interna da parede celular. A glucana solúvel em álcali tem estrutura química semelhante à insolúvel, entretanto, apresenta maior número de ramificações β -1,6. A glucana álcali-solúvel representa aproximadamente 20% da parede celular e a análise estrutural revelou a presença de 80 – 85% de ligações β -D-1,3; 8 – 12% de ligações β -D-1,6 e 3 – 4% de resíduos de ramificações ligados por C-1, C-3 e C-6.

Kopecká *et al.*²³ estudaram a ultraestrutura da parede celular de isolados de *S. cerevisiae* durante a fase exponencial e estacionária de crescimento, usando β -1,3 glucanases. Os autores obtiveram duas importantes informações: as regiões de brotamento de leveduras são estruturas resistentes ao efeito dessa enzima; os componentes fibrilares das leveduras são constituídos de glucanas com ligações β -1,3, uma vez que as microfibrilas desapareceram após tratamento com β -1,3 glucanase. Os autores então, relataram que as moléculas de glucana permitem a associação das cadeias mais afastadas de polissacarídeos com outras moléculas de ramificações superficiais, dando origem a um componente fibrilar contínuo.

Estudos da parede celular de leveduras com a utilização de microscópio eletrônico permitiram a Kreger e Kopecká²⁴ confirmarem a posição interna da fração de glucana.

Segundo Hinton e Pressey²⁵, as glucanas podem ser encontradas em microrganismos e plantas superiores como principais constituintes da parede celular, como material citoplasmático ou de reserva vacuolar e como substâncias extracelulares. As glucanas são polímeros não cíclicos de anidroglicose unidos por ligações β -1,3 glicosídicas contendo ramificações β -1,6, as quais pertencem a uma das classes mais abundantes de polissacarídeos.

A parede celular de *Saccharomyces cerevisiae* contém duas frações de β -1,3 glucana (uma solúvel em álcali e outra insolúvel) e uma fração de β -1,6 glucana com poucas ligações β -1,3 (insolúvel em álcali e solúvel em soluções diluídas de ácido). As β -

1,3 glucanas têm tamanho estimado de 1.500 resíduos de glicose; enquanto que as β -1,6 glucanas são menores apresentando 150 a 200 resíduos¹⁰. Muitos estudos têm mostrado que estes componentes, depois de serem depositados na parede, são rearranjados para formarem um complexo integrado. Os rearranjos podem ocorrer através de glicosiltransferases as quais introduzem ramificações nos polissacarídeos lineares. Há evidências de ligações entre mananaproteínas e quitina. A insolubilidade da glucana em álcali é explicada pela presença de ligações covalentes entre glucana e quitina, uma vez que a degradação da quitina por quitinase dissolve completamente a glucana em álcali. Foi demonstrado que ocorre a formação de ligação α -1,6 glicosídica entre a glucana e quitina na parede celular de *Candida albicans*, mas em *Saccharomyces cerevisiae* a natureza da ligação é desconhecida².

Quitina

A quitina é um polímero de N-acetilglicosamina com ligações β - 1,4 encontrada em carapaças de insetos, parede celular de fungos e crustáceos²⁶. Estudos de difração de raio-X demonstraram que refere-se a uma estrutura cristalina altamente ordenada e insolúvel em água²⁷.

Na maioria dos fungos a quitina é o maior componente estrutural da parede celular, sendo, portanto, susceptível a inúmeras espécies de bactérias, actinomicetos e fungos que podem agir como antagonistas devido à produção de enzimas quitinolíticas²⁸. A quitina é um biopolímero muito abundante e está geralmente ligada a outros polissacarídeos e proteínas²⁶.

Em leveduras, a quitina é encontrada predominantemente em septos primários e em volta do círculo de constrição entre a célula mãe e a jovem. Cerca de 90% da quitina está localizada na cicatriz de brotamento e o restante na parede celular².

PRODUÇÃO DE ENZIMAS LÍTICAS

As β -1,3 glucanases, proteases e quitinases estão agrupadas na classe das hidrolases.

A β -1,3 glucanase (E.C. 3.2.1.39) (1,3- β -D-glucana glucanohidrolase) também denominada de glucana-endo-1,3- β -D-glicosidase, catalisa a reação de hidrólise das ligações β -D-glicosídicas da β -1,3 glucana. Atua sobre laminarina, paramylona e pachyman, quando utilizadas como substrato.

A protease (3.4.21.12) também denominada de α -endopeptidase lítica, catalisa a reação de hidrólise de proteínas. Atua preferencialmente sobre elastina e ligações peptídicas envolvendo Ala⁺ e Val⁺ de proteínas da parede celular.

A quitinase (3.2.1.14) {Poli[1,4-(N-acetil- β -D-glicosamina)]glicanohidrolase} catalisa reações de hidrólise das ligações β -1,4 de N-acetil- β -D-glicosamina da quitina e de quitodextrinas.

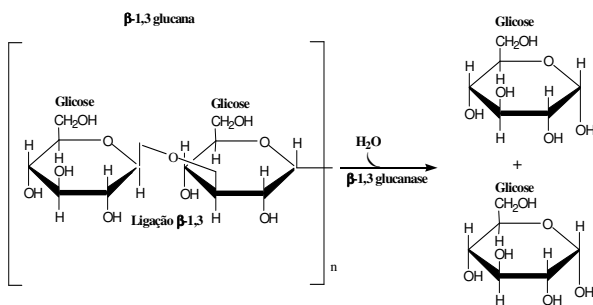


Figura 1. Hidrólise da β -1,3 glucana pela β -1,3 glucanase

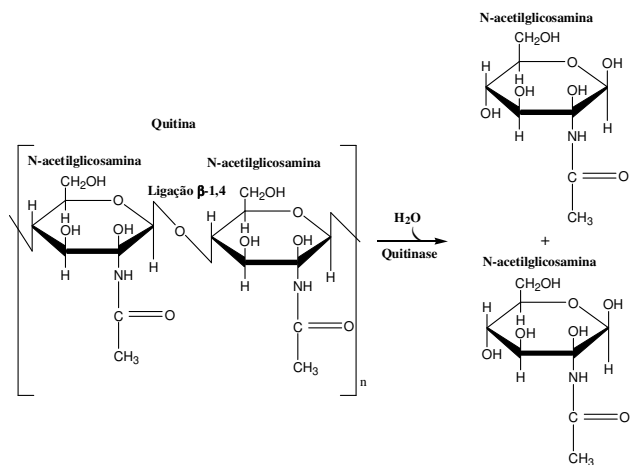


Figura I 2. Hidrólise da quitina pela quitinase

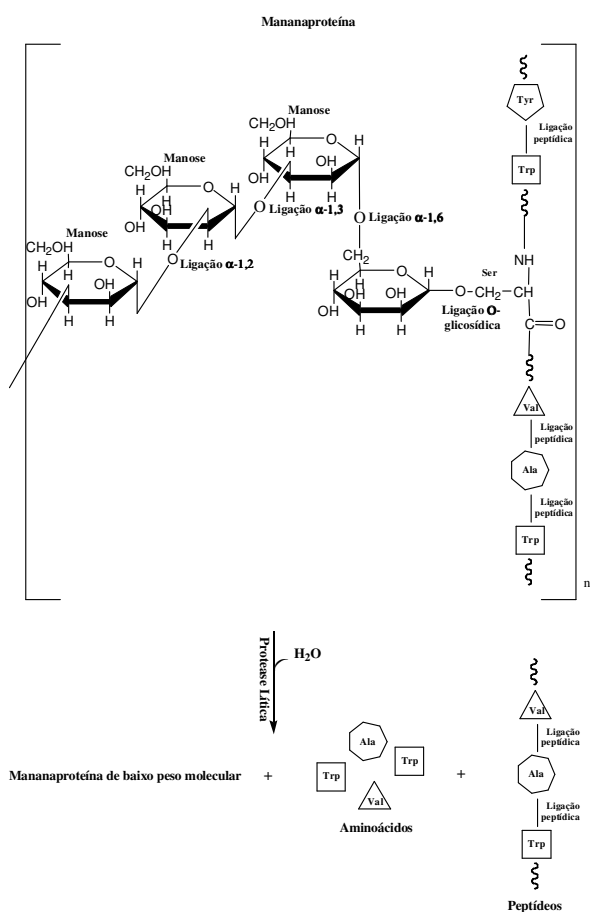


Figura I 3. Hidrólise da mananaproteína pela protease lítica

Muitos microrganismos, como bactérias, fungos e leveduras são capazes de produzir β -1,3 glucanases, proteases e quitinases que hidrolisam os componentes da parede celular de leveduras e causam a lise celular. A maioria deles necessita da presença de indutores para a síntese de enzimas de interesse.

As bactérias *Cytophaga johnsonii*²⁹, *Arthrobacter luteus*³⁰, *Oerskovia* sp. CK^{31,32}, *Rarobacter faecitabidus*³³, *Rarobacter incanus*³⁴, *Cellulomonas cellulans* 191 (*Cellulosimicrobium cellulans*)^{35,36} produzem enzimas β -1,3 glucanases e proteases capazes de lisar células de leveduras.

Estes microrganismos têm sido isolados a partir de lodo ativado de sistemas de tratamento de água de indústrias de alimentos e bebidas alcoólicas³⁷.

Bacon *et al.*²⁹ relataram que o microrganismo *Cytophaga johnsonii* produziu enzimas capazes de lisar células de leveduras pré-tratadas com tiol na presença de células autoclavadas ou tratadas com álcali, parede celular e glucana de levedura como indutores. A purificação do sobrenadante da cultura através de cromatografia em coluna mostrou a presença de dois tipos de endo- β -1,3 glucanases e muitas β -1,6 glucanases.

Kitamura e Yamamoto³⁸ relataram que o microrganismo *Arthrobacter luteus*, isolado de resíduos de cervejarias, cresceu em meio contendo células de levedura ou β -1,3 glucana e produziu enzimas com atividade de lise de leveduras. O conjunto destas enzimas foi denominado Zymolyase e requeria polímeros lineares de glicose com ligações β -1,3 como substrato específico. Os autores verificaram que o polissacarídeo termo-tratado pachyman e a glucana de levedura foram hidrolisados por Zymolyase a unidades de laminaripentaose.

Tabela 1. Microrganismos produtores de enzimas líticas e indutores utilizados para a produção das enzimas líticas

Microrganismo lítico	Fonte de carbono (indutor)	Enzima(s) produzida(s)
<i>Cytophaga johnsonii</i> ²⁹	Parede celular de levedura de panificação	β -1,3 glucanase e β -1,6 glucanase
<i>Rhizopus chinensis</i> R-69 ¹⁴	Células de leveduras de panificação ou farelo	Endo e exo β -1,3 glucanase
<i>Oerskovia xanthineolytica</i> ⁶	Glucana insolúvel em meio alcalino, levedura autoclavada e glicose	β -1,3 glucanase e protease alcalina
<i>Streptomyces rutgersensis</i> H-46 ^{39,40}	Glicose e extrato de soja	Enzimas bacteriolíticas
<i>Oerskovia</i> sp. ⁸	Glucana e parede celular de leveduras	β -1,3 glucanase
Várias espécies de <i>Acremonium</i> e <i>Cephalosporium</i> ^{41,42}	Glicose e laminarina ou pustulana	β -1,3 glucanase
<i>Trichoderma harzianum</i> ⁴³	Parede celular purificada	3 isoformas de β -1,3 glucanase
	Quitina, quitosana, N-acetilglicosamina e laminarina	1 isoforma de β -1,3 glucanase
<i>Trichoderma asperellum</i> ⁴⁴	Parede celular de <i>Rhizoctonia solani</i>	β -1,3 glucanases
<i>Paecilomyces lilacinus</i> ⁴⁵	Gema de ovo	Proteases
	Quitina	Quitinases

Kobayashi *et al.*⁴⁶ estabeleceram um método para produção e preparação de um complexo enzimático que degrada parede celular de leveduras produzido por espécies de *Rhizoctonia*, em escala comercial. A produção da enzima bruta em pó, em batelada de 80 Kg, mostrou-se viável. Esta preparação enzimática foi avaliada para uso industrial.

Yamamoto *et al.*⁴⁷ isolaram microrganismos que lisam leveduras a partir do lodo ativado de tanques de sistemas de tratamento de água de indústrias de alimentos e de bebidas alcoólicas. Dez linhagens que puderam crescer em meio nutriente normal pertenciam aos gêneros: *Streptomyces* sp., *Oerskovia* sp. e *Bacillus* sp.

Yamamoto *et al.*⁴⁸ isolaram trinta e seis linhagens de bactérias que lisam leveduras de lodo ativado de resíduos de tratamento de água. Estes microrganismos aderiram-se às células viáveis de todas as espécies de *Saccharomyces* e *Hansenulla*, e algumas espécies de *Candida*, aglutinaram-se com as leveduras e as lisaram. Esses microrganismos não aderiram ou lisaram células viáveis de *Rhodotorula*, *Cryptococcus* e *Trichosporon*.

Andrews e Asenjo⁴ verificaram que as enzimas β -1,3 glucanase e protease do sistema lítico da bactéria *Oerskovia xanthineolytica* LL-G109 são capazes de lisar e romper

totalmente as células de leveduras. Esta bactéria apresentou taxa de glucanase-protease maior que a de outras cepas. Quando cultivada em sistema contínuo, a bactéria *Oerskovia xanthineolytica* apresentou produtividade e concentração de enzimas maiores do que quando cultivada em batelada. O sistema de enzimas líticas está sujeito a repressão catabólica pela glicose e mostrou-se induzível pela glucana da levedura. Na fermentação da linhagem *Oerskovia* sp. em cultura contínua, a glicose pode ser utilizada como meio de crescimento com concentração relativamente baixa do indutor.

Tabela 1 2. Sistemas enzimáticos líticos de microrganismos

Microrganismos Líticos	Enzimas	pH Ótimo	Temperatura Ótima (° C)	Microrganismos Lisados
<i>Arthrobacter luteus/ Oerskovia xanthineolytica</i> (Zymolyase) ^{6,49,50}	β-1,3 glucanase	5,0-6,5	45-60	<i>Saccharomyces</i> sp., <i>Candida</i> sp., <i>Hansenula</i> sp., <i>Pichia</i> sp. e outras leveduras
	Protease	9,0-10,0	35	
	Atividade na célula de levedura integral	7,5	30-35	
<i>Arthrobacter</i> sp. G1 ⁵¹				<i>Saccharomyces fragilis</i> NCYC 587, <i>Torulopsis colliculosa</i> NCYC 141, <i>Candida utilis</i> NCYC 707
<i>Cellomonas cartae</i> 191 ³⁵	β-1,3 glucanase	4,5	55	<i>Kluyveromyces marxianus</i> NCYC587, <i>Pachysolen tannophilus</i> NRRL 2460, <i>Saccharomyces capensis</i> NCYC 761, <i>S.cerevisiae</i> KL 88, <i>Candida glabrata</i> NCYC 388, <i>Debaryomyces vanrij</i> NCYC 577
	Protease	8,0	50	
	Atividade na célula de levedura integral	7,0 – 7,5	30-35	
<i>Cytophaga</i> NCIB 9497 ⁴	Atividade na célula de levedura integral	9,0	45-55	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Bacillus</i> sp., <i>Corynebacteria.</i> , <i>E.coli</i>
<i>Oerskovia</i> CK ^{31,32}	β-1,3 glucanase	-	35-40	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
	Protease	-	60	
	Atividade na célula de levedura integral	9,0	35-40	
<i>Rhizoctonia</i> sp. ⁴⁶	β-1,3 glucanase	5,5	55-60	<i>Candida</i> sp., <i>Saccharomyces</i> sp., <i>Hansenula</i> sp.
	Protease	6,5	40	
	Atividade na célula de levedura integral	6,0	40	
<i>Streptomyces</i> sp. 1228 ⁵²	β-1,3 glucanase	5,5-6,0	50-55	<i>Candida utilis</i> , <i>Saccharomyces carlsbengensis</i> , <i>Schizosaccharomyces pombe</i>

Yamamoto *et al.*³⁴ isolaram no Brasil, linhagens de bactérias que lisam leveduras a partir do solo, flores, frutos e outras fontes. Destas linhagens, 46 foram identificadas como *Rarobacter*. Essas linhagens de *Rarobacter* apresentaram a capacidade de se aglutinarem com células viáveis de *S. cerevisiae* e exigiam composto heme para o crescimento aeróbico. Outras quatro bactérias gram positivas não exigiam grupo heme para o crescimento aeróbico; duas delas foram identificadas como *Oerskovia*, uma como *Arthrobacter* e a quarta não foi identificada.

Santos³⁵ estudou a produção de β -1,3 glucanase e protease por microrganismos que lisam a parede celular de levedura. As linhagens FXX e *Cellulosimicrobium cellulans* 191 apresentaram maior produção de β -1,3 glucanase, enquanto que a linhagem *Oerskovia* sp. 4 apresentou maior produção de protease. A maior produção de β -1,3 glucanase foi verificada em meio de cultivo contendo parede celular de levedura extraída mecanicamente como indutor, enquanto que a maior produção de protease ocorreu com levedura autoclavada, lavada e liofilizada.

Gacto *et al.*⁵³ estudaram o crescimento do actinomiceto *Micromonospora chalcea*, em meio contendo laminarina como fonte de carbono para induzir a produção de um sistema de enzimas extracelulares capazes de lisar células de várias espécies de levedura.

Fleuri⁵⁴ estudou a produção de β -1,3 glucanases, proteases líticas e quitinases pelas linhagens B1, B22, B26, FXX, *Oerskovia* sp. 4 e *Cellulosimicrobium cellulans* 191 em meios de cultura contendo diferentes indutores e aplicação na lise de leveduras. A maior produção de protease lítica foi obtida com as linhagens bacterianas B26 e 191 em meio de cultivo contendo 8% de levedura seca. As linhagens B1 e 191 apresentaram maior produção de β -1,3 glucanase entre as linhagens testadas, em meio de cultivo contendo 1% de parede celular de levedura; enquanto que a linhagem 191 apresentou maior produção de quitinase entre as linhagens testadas, em meio de cultivo contendo 1,5% de quitina neutralizada. As preparações de β -1,3 glucanase das linhagens B1 e *C. cellulans* 191 obtidas do sobrenadante do meio de cultura por meio de fracionamento com sulfato de amônio, apresentaram atividade de lise das leveduras *Saccharomyces cerevisiae* KL-88, *Kluyveromyces marxianus* NCYC 587, *Hansenula mrakii* NCYC 500 e *Candida glabrata* NCYC 388, sendo que *Kluyveromyces marxianus* e *Hansenula mrakii* apresentaram-se mais susceptíveis à β -1,3 glucanase do que a linhagem de *Saccharomyces cerevisiae*. Entre

as linhagens testadas a levedura *Candida glabrata* mostrou-se mais resistente à atividade de lise da β -1,3 glucanase.

O extrato bruto de quitinase, obtido a partir do cultivo de *Trichoderma harzanium* TUBF 781 em fermentação semi-sólida em meio otimizado, mostrou atividade antifúngica contra uma série de linhagens de fungos selvagens como: *Aspergillus* sp., *Rhizopus* sp. e *Mucor* sp., mostrando maior eficácia contra *Aspergillus niger*⁵⁵.

Kenji *et al.*⁵⁶ estudaram a produção de três endoquitinases por *Bacillus stearothermophilus* CH-4 em meio de cultivo contendo quitina e verificaram que as enzimas responsáveis pela degradação da quitina são: quitinase A (endo-ação), quitinase B (exo-ação) e N-acetilglicosaminidases.

A lise dos componentes da parede celular de leveduras pelas enzimas produzidas por microrganismos pode variar dependendo dos estágios de crescimento celular⁵⁷ e conforme o gênero e a espécie da levedura⁵⁸. A lise enzimática das células de levedura acontece em passos progressivos e depende do sinergismo entre protease e β -1,3 glucanase. A protease ataca a camada externa de mananaproteína, permitindo o acesso da β -1,3 glucanase à camada de β -glucana, implicando no rompimento celular por diferença de pressão osmótica^{6,9,51,59,60}.

Os microrganismos do gênero *Arthrobacter* produzem dois tipos de β -1,3 glucanases. A glucanase I causa lise em células jovens na presença de β - mercaptoetanol e 0,6 M de KCl como estabilizador osmótico. A glucanase II é similar à encontrada em fluido de cultura de *Bacillus circulans*. Na dissolução da parede celular de leveduras por glucanase I, a enzima ataca a glucana liberando fragmentos de vários tamanhos que servem como substratos para a glucanase II. As β - glucanases são estáveis em ampla faixa de pH, mas perdem rapidamente a atividade em temperaturas acima de 60°C; apresentam pH ótimo de atividade na faixa de 5,5 a 6,5³⁰.

Obata *et al.*³² relataram que a linhagem *Oerskovia* sp. CK produz três tipos de enzimas designadas F-L, F-0 e F-2 que estão envolvidas na lise da parede celular de leveduras. A enzima F-L mostrou alta atividade lítica em células viáveis de levedura, mas fraca atividade sobre a glucana de levedura. As enzimas F-0 e F-2 mostraram baixa ou nenhuma atividade lítica, mas alta atividade de β -1,3 glucanase. Os resultados evidenciaram que as enzimas F-0 e F-2 não são eficientes na lise de leveduras devido à

inacessibilidade espacial à camada de glucana. No entanto, o tratamento com a enzima F-L com solução alcalina ou com reagentes redutores modificaram a célula, permitindo o acesso de F-0 e F-2 à camada de glucana e possibilitando a lise da célula; foi observado efeito sinérgico entre as enzimas F-L e F-0 ou F-L e F-2. A protease F-L produzida por *Oerskovia* sp. CK possui alto efeito sinérgico com a enzima β -1,3 glucanase na lise de leveduras.

Rowley e Bull⁵¹ estudaram uma linhagem de *Arthrobacter* com alta capacidade para lisar células vivas de *Saccharomyces fragilis*. O complexo enzimático extracelular produzido pelo microrganismo continha β -1,3 glucanase, mananase, manohidrolase e atividade proteolítica.

A Zymolyase, preparação comercial para lise da parede celular de leveduras, é obtida a partir *Arthrobacter luteus*. Esse microrganismo foi reclassificado como *Oerskovia xanthineolytica*⁶¹. A Zymolyase é uma preparação enzimática composta de duas frações: a zymolyase A, que é uma β -1,3 glucanase e a zymolyase B, que é uma protease alcalina e provavelmente também uma serina protease. A β -1,3 glucanase (zymolyase A) não diminui a turbidez nem o número de células de uma suspensão de leveduras. A protease (zymolyase B) diminui a turbidez, mas não altera o número de células da suspensão. No entanto, a ação cooperada de zymolyase A e B tem como efeito alta atividade lítica, lisando completamente as células de leveduras⁶².

A bactéria *Rhizoctonia solani* produz enzimas líticas capazes de lisar a parede celular de leveduras. As enzimas foram separadas em quatro frações: L-1, L-2, L-3 e L-4. Três delas foram consideradas β -1,3 glucanases líticas. A fração L-3 mostrou alta atividade de protease. A protease purificada L-3 sozinha, assim como as outras β -1,3 glucanases líticas foram capazes de lisar células intactas e parede celular isolada de *S. cerevisiae*. A separação completa da protease lítica de *Rhizoctonia solani* não foi importante apenas para esclarecer a ação hidrolítica da parede celular de levedura, mas também para elucidar a estrutura da parede⁶³.

Ryan e Ward⁶⁴ verificaram que a enzima β -1,3 glucanase de *Basidiomycete apyllophoroles* possui alta atividade lítica em leveduras. Quando usada em combinação com papaína na lise de leveduras, 90 a 95% da massa seca das leveduras foram solubilizadas. Em comparação com estudos envolvendo três β -1,3 glucanases, a atividade de laminarinase não foi bem correlacionada com a atividade lítica em leveduras. O

mecanismo da β -1,3 glucanase do *B. aphyllophoroles* em glucana isolada de levedura foi caracterizado pela alta taxa de produção de laminaribiose.

PURIFICAÇÃO DE ENZIMAS LÍTICAS

As preparações enzimáticas comerciais como a Lyticase de *Arthrobacter luteus* e Lyticase recombinante expressa em *Escherichia coli* para a lise de leveduras e para obtenção de protoplastos são encontradas na forma bruta e na forma parcialmente purificada.

Tabela 1 3. Purificação e caracterização de enzimas líticas

Microrganismo	Enzima Purificada	Métodos de Purificação e Eletroforese	Massa Molecular (KDa)	Propriedades Bioquímicas da Enzima
				a- pH ótimo: substrato b- temperatura ótima c- estabilidade d- pI e- K_m : substrato f- V_m : substrato
<i>Oerskovia xanthineolytica</i> LL-G109 ⁶⁵	β -1,3 glucanase	SDS-PAGE	27,19	b- 65 °C c- 55 °C / 30 min
<i>Oerskovia xanthineolytica</i> TK-1 ⁶⁶	β -1,3 glucanase	Colunas DEAE-Sepacel, DEAE-Toyopearl 650M e Bio-Gel P-2	40	a- 7,5: laminarina a- 5,5: glucana de levedura d- 6,5
<i>Trichoderma harzanium</i> ⁶⁷	Endo- β -1,3 glucanase	Coluna Sephacryl 300R e focalização isoeletrica	17	d- 5,0
<i>Trichoderma harzanium</i> ⁶⁸	β -1,3 glucanase	Colunas Sephacryl S-200, Fenil-Sepharose e CM-Sepharose, SDS-PAGE	29	a- 4,4 b- 50 °C e- 1,72 mg/ml: laminarina f- 3,10 U/ml: laminarina
<i>Cellulomonas cellulans</i> 191 ³⁶	β -1,3 glucanase	Ultrafiltração e coluna de CM-Sepharose CL-6B, SDS-PAGE	17,1	a- 5,5 - 6,5 b-55 °C c- pH 5,5 – 6,5
<i>Cellulomonas cellulans</i> 191 ⁶⁹	β -1,3 glucanase	Ultrafiltração e coluna de DEAE-Sepharose, SDS-PAGE	57	-
<i>Bacillus clausii</i> ⁷⁰	β -1,3 glucanase	Colunas DEAE-Sepharose FF e Sephacryl S-200HR, SDS-PAGE	71	c- pH 5,3 – 11,5
<i>Cellulomonas flavigena</i> NTOU ⁷¹	quitinase	Colunas Q cartridge e Superdex 75HR Filtração em gel SDS-PAGE	34,2 32,5	a- 10,0 b- 50 °C c- pH 6,0 –10,0 até 45 °C
<i>Metarhizium anisopliae</i> ⁷²	quitinase	Precipitação com sulfato de amônio e coluna DEAE-Sepacel	30	a- 4,5 – 5,0 b- 40 - 45 °C e- 0,537 mmol:p-nitrofenol- β -diacetilquitobiose f- 4,86 nml/ml/min:p-nitrofenol- β -diacetilquitobiose
<i>Trichoderma harzanium</i> T198 ⁷³	quitinase	Precipitação com sulfato de amônio, cromatografia de afinidade com quitina Filtração em gel SDS-PAGE	28 27,5	a- 3,5 b- 50 °C d- 7,4

CLONAGEM

A clonagem ultimamente tem sido uma ferramenta muito importante e útil para enzimologistas e outros pesquisadores. Em relação às enzimas líticas, a disponibilidade de seqüências nucleotídicas, e conseqüentemente, de famílias de genes, possibilitam um maior entendimento do papel e do modo de ação dessas enzimas na degradação da parede celular de leveduras, além de possibilitar a comparação com enzimas de outros organismos. Estudos mais apurados sobre as relações estruturais e funcionais dessas enzimas permitem obter enzimas líticas apropriadas para a permeabilização celular e recuperação seletiva de proteínas das células de leveduras, não somente de *S. cerevisiae*, mas também de leveduras cada vez mais importantes no ramo biotecnológico como: *Hansenula polymorpha*, *Pichia pastoris*, entre outras⁷⁴. Devido à importância das β -1,3 glucanases, muitos genes que codificam a produção desta enzima têm sido identificados, clonados e transferidos em um microrganismo competente. Técnicas de clonagem de DNA complementares (DNAc) combinadas com mecanismos de regulação da transcrição, utilização de vetores plasmidiais especialmente projetados e transformação em *E. coli*, também têm sido muito utilizadas para a super produção de enzimas de interesse.

Tabela 1 4. Clonagem e expressão de genes que codificam a produção de β -1,3 glucanases de diversos organismos

Organismo	Enzima (s)	Gene (s)	Comentários
<i>Bacillus circulans</i> WL-12 ⁷⁵	β -1,3 glucanases B e C	GlcB	O gene foi clonado em <i>E. coli</i> e a sequência nucleotídica determinada.
<i>Oerskovia xanthineolytica</i> LLG109 ⁷⁴	Endo- β -1,3 glucanase	Beta III	Elucidação da sequência primária de aminoácidos e subsequente expressão em <i>Bacillus subtilis</i> .
<i>Streptomyces matensis</i> DIC-108 ⁷⁶	β -1,3 glucanase-laminarinapentaose	<i>lph</i>	O gene foi clonado, a sequência de aminoácidos da região N-terminal e a sequência total do gene foram determinadas.
<i>Cellulomonas cellulans</i> 191 ⁶⁹	β -1,3 glucanase	-	A região N-terminal do gene foi seqüenciada e os resíduos obtidos desta técnica foram idênticos aos obtidos da β -1,3 glucanase da preparação comercial Zymolyase.
<i>Oerskovia xanthineolytica</i> ⁷⁷	β -1,3 glucanase	-	Obtenção de uma <i>E. coli</i> recombinante para a super produção da enzima.
<i>Lysobacter enzymogenes</i> N4-7 ⁸¹	Três β -1,3 glucanases	GluA, gluB e gluC	Identificação e determinação da sequência interna de aminoácidos dos três genes. Atribui-se às β -1,3 glucanases a atividade de biocontrole.
<i>Pyricularia oryzae</i> ⁷⁸	Endo- β -1,3 glucanase	DNAc (OsGLN1)	O DNAc foi clonado, caracterizado e expresso em <i>E. coli</i> . A proteína recombinante obtida foi capaz de hidrolisar a parede celular do fungo patógeno do arroz (<i>Pyricularia oryzae</i>) e laminarina.

APLICAÇÕES

Uma grande quantidade de produtos podem ser isolados e purificados da célula microbiana com o auxílio da lise enzimática como, por exemplo: peptídeos, polissacarídeos, proteínas recombinantes, ácidos nucléicos, pigmentos, enzimas, lipídeos, entre outros. Além do potencial de aplicação na preparação de protoplastos, fusão celular e transformação de leveduras, pode-se ressaltar sua aplicação na produção de enzimas intracelulares, preparação do polissacarídeo glucana, extração alcalina de proteínas de leveduras, pré-tratamento para lise mecânica de células em Dyno-Mill, produção de extrato de levedura, extração de pigmentos de leveduras vermelhas e lise de microrganismos que provocam a cárie dentária⁸. A lise de células de leveduras com enzimas permite seletividade na liberação de produtos, independe da escala e pode ser realizada em

condições de pH e temperatura que não implicam na desnaturação de produtos celulares de interesse.

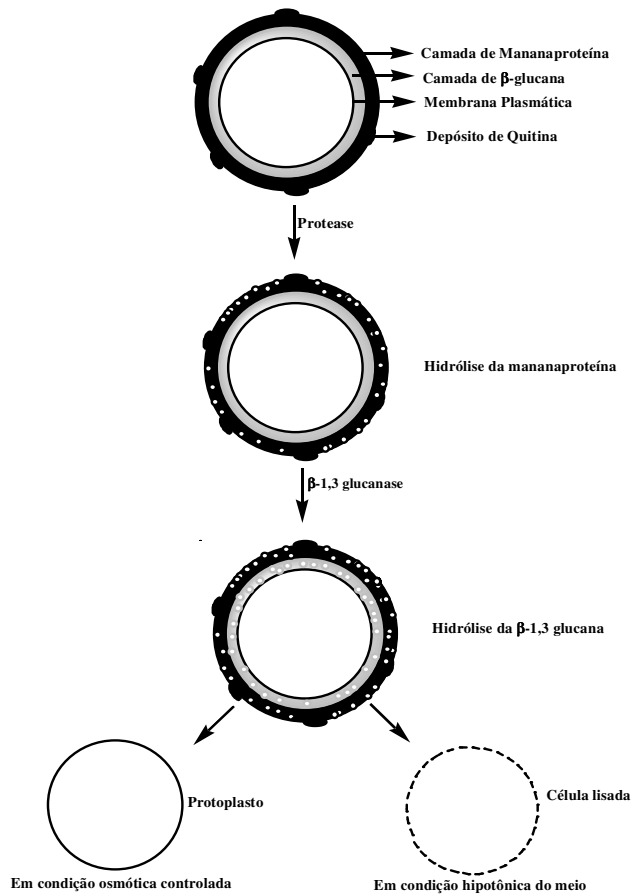


Figura 1 4. Lise enzimática da célula de levedura e formação de protoplasto

As enzimas líticas podem ser utilizadas para a lise da parede celular de leveduras para diferentes finalidades, como: preparação de extrato de levedura⁸⁰; aumento da eficiência de desintegrador mecânico para extração de compostos intracelulares e ligados à célula⁴⁶; aumento da digestibilidade de ração animal^{46,81}; extração do pigmento vermelho astaxantina de *Phaffia rhodozyma*⁸²; preservação de alimentos⁴⁻⁵; obtenção de fonte de proteína unicelular para animais e humanos⁸³; aumento do valor alimentício de cereais quando se utilizam altas proporções de polissacarídeos sem amido⁸⁴; obtenção de mananas de diferentes fontes que apresentam atividade antioxidante e antimutagênica⁸⁵;

melhoramento da clarificação e filtração de vinhos⁸⁶; síntese de novos substratos para β -1,3 e β -1,4 glucanases por meio de reações de transglicosilação catalisadas por β -1,3 glucanases⁸⁵; redução da viscosidade do produto final no processo de fabricação de cerveja⁸¹; elucidação da estrutura, composição e mecanismo da síntese da parede celular de leveduras^{15,16,18,20,21,88-91}.

As enzimas quitinolíticas apresentam inúmeras aplicações biotecnológicas no ramo da indústria e agricultura. As quitinases podem ser utilizadas no controle de fungos patogênicos de plantas e insetos. Há também, um crescente interesse na produção de quitinooligossacarídeos biologicamente ativos através da utilização das quitinases. Essas enzimas podem ainda ser aplicadas na produção de fonte de proteína unicelular, preparação de enzimas micolíticas e na formação de protoplastos fúngicos⁹².

Alguns trabalhos relatam as aplicações de quitinases e β -1,3 glucanases no setor agrotecnológico. Wiwat *et al.*⁹³ produziram quitinase a partir de *Bacillus circulans* 41 para uso como suplemento de bioinseticida de *B. thuringiensis* para o controle de larvas de lepidópteros. Zhang e Yuen⁹⁴ utilizaram um sistema lítico composto por quitinase, protease, β -1,3 glucanase e lipase para o controle de manchas nas folhas de centeio causadas por *Biopolaris sorokiniana*.

β -1,3 glucanases e quitinases produzidas por plantas em resposta às infecções causadas por microrganismos patogênicos têm sido purificadas e utilizadas para testes de atividade antifúngica. Sela-Buurlage *et al.*⁹⁵ verificaram a atividade antifúngica de diferentes isoformas de quitinases e β -1,3 glucanases do tabaco contra esporos de *Fusarium solani*. Ji e Kùc⁹⁶ observaram a atividade fungicida de β -1,3 glucanase e quitinase de pepino (*Cucumis sativus* L.) sobre *Colleotrichum lagenarium*. Beffa *et al.*⁹⁷ verificaram que β -1,3 glucanases de plantas com atividade antifúngica apresentam função na patogênese viral, atuando sobre o vírus do tabaco de Havana 425 e sobre *Nicotiniana glauca* (vírus que causa necrose no tabaco). Kim e Hwang⁹⁸ utilizaram uma β -1,3 glucanase purificada de raiz de pimenta para inibir o crescimento das hifas do fungo *Phytophthora capsici*. O efeito sinérgico da β -1,3 glucanase e de uma quitinase também produzida pela pimenta ocasionou inibição do crescimento das hifas de *F. oxysporum* var. *cucumerinum* e *P. capsici*. O mecanismo de resposta de plantas infectadas induz a produção de β -1,3 glucanases e quitinases. Essas enzimas estão relacionadas à patogênese e são indicadoras do sistema de

resistência da planta. Em geral, são encontradas em compartimentos onde há as lesões causadas por fungos e vírus infectantes^{99,100}.

As enzimas líticas, principalmente β -1,3 glucanases e quitinases, também são produzidas por microrganismos que exercem função antagônica aos fitopatógenos. À essas enzimas se atribuiu o efeito de fungitoxicidade sobre o patógeno e a eficácia do biocontrole de organismos antagonistas.

Tabela 1 5. Enzimas líticas envolvidas no biocontrole de fitopatógenos

Microrganismos de controle biológico	Enzimas envolvidas	Fitopatógeno
<i>Pichia membranaefaciens</i> FY-101 ¹⁰¹	β -1,3 glucanases	<i>Botrytis cinerea</i>
<i>Thichoderma harzianum</i> CECT 2413 ¹⁰²	Quitinase, β -1,3 e β -1,6 glucanase	<i>Rhizoctonia solani</i> e <i>Botrytis cinerea</i>
<i>Glomus mosseae</i> e <i>Glomus intraradices</i> ¹⁰³	Quitinase, quitosanase, β -1,3 glucanase e superóxido-dismutase	<i>Phytophthora parasitica</i>
<i>Rhodotorula glutinis</i> e <i>Cryptococcus laurentii</i> ¹⁰⁴	β -1,3 glucanase, polifenoloxidase, fenilalanina e amônia-liase	<i>Penicillium expansum</i> e <i>Alternaria alternata</i>
<i>Bacillus mycoides</i> ¹⁰⁵ e <i>Bacillus pumilus</i> ¹⁰⁶	Quitinase, β -1,3 glucanase e peroxidase	<i>Cercospora beticola</i>
<i>Tilletiopsis pallescens</i> Gokhale ¹⁰⁷	Exo e endo β -1,3 glucanase e quitinase	<i>Podosphaera xanthii</i>

CONCLUSÕES

As células microbianas podem ser rompidas por métodos mecânicos, químicos ou enzimáticos. Em condições extremas de pressão e temperatura requeridas na lise mecânica, as proteínas e outros produtos podem ser desnaturados e, desta forma, a lise enzimática da parede celular de leveduras realizada a 35-37°C em pH 7,0-7,5, tem-se tornado bastante atrativa. As preparações comerciais líticas apresentam custo elevado, o qual, provavelmente está associado a procedimentos ultrapassados e onerosos. O investimento em pesquisas de produção das enzimas com indutores baratos e facilmente disponíveis e procedimentos melhorados de purificação podem ser de grande contribuição para a diminuição dos custos. As enzimas líticas β -1,3 glucanases, proteases e quitinases apresentam variadas aplicações industriais e são requeridas em muitas áreas da pesquisa, o que amplia o campo de utilização dessas enzimas.

AGRADECIMENTOS

À FAPESP pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Fleet, G. H.; *Curr. Top. Med. Mycol.* **1985**, *1*, 24.
2. Hartland, R. P.; Vermeulen, C. A.; Klis, F. M.; Sietsma, J. H., Wessels, J. G. H.; *Yeast.* **1994**, *10*, 1591.
3. Klis, F. M.; *Yeast.* **1994**, *10*, 851.
4. Andrews, B. A.; Asenjo, J. A.; *Biotechnol. Bioeng.* **1987**, *30*, 628.
5. Andrews, B. A.; Asenjo, J. A.; *Tibtech.* **1987**, *5*, 273.
6. Scott, J. H.; Schekman, R.; *J. Bacteriol.* **1980**, *142*, 414.
7. Zlotnik, H; Fernandez, M. P.; Bowers, B.; Cabib, E.; *J. Bacteriol.* **1984**, *159*, 1018.
8. Asenjo, J. A.; Andrews, B. A.; Hunter, J. B.; Lecorre, S.; *Process Biochem.* **1985**, 159.
9. Hunter, J., B.; Asenjo, J. A.; *Biotechnol. Bioeng.* **1988**, *31*, 929.
10. Stratford, M.; *Yeast.* **1994**, *10*, 1741.
11. Cabib, E.; Drgon, T.; Drgonovaa, J.; Ford, R. A.; Kollar, R.; *Biochem. Soc. Trans.* **1997**, *25*, 200.
12. Bacon, J. S. D.; Farmer, V. C.; Jones, D.; Taylor, I. F.; *Biochem. J.* **1969**, *114*, 557.
13. Lampen, J. O.; *A. Van. Leeuw.* **1968**, *34*, 1.
14. Yamamoto, S.; Nagasaki, S.; *Agr. Biol. Chem.* **1975**, *39*, 1981.
15. Kapteyn, J. C.; van Egmond, P.; Sievi, E.; van Den Ende, H.; Makarow, M.; Klis, F. M.; *Mol. Microbiol.* **1999**, *31*, 1835.
16. Popolo, L.; Vai, M.; *BBA-Gen. Subjects* **1999**, *1426*, 385.
17. Kapteyn, J. C.; *Mol. Microbiol.* **2000**, *35*, 601.
18. Kapteyn, J. C.; van Den Ende, H.; Klis, F. M.; *BBA-Gen. Subjects* **1999**, *1426*, 373.
19. Lagorce, A.; Hauser, N. C.; Labourdette, D.; Rodriguez, C.; Martin-Yken, H.; Arroyo, J.; Hoheisel, J. D.; François, J.; *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 20345.
20. Mrsa, V.; Ecker, M.; Cappellaro, C.; Teparic, R.; Tanner, W.; *Food Technol. Biotech.* **1999**, *37*, 21.

21. Mrsa, V.; Tanner, W.; *Yeast*. **1999**, *15*, 813.
22. Manners, D. J.; Masson, A. J.; Patterson, J. C.; *Biochem. J.* **1973**, *135*, 19.
23. Kopecká, M.; Phaff, H. J.; Fleet, G. H.; *J. Cell Biol.* **1974**, *62*, 66.
24. Kreger, D. R.; Kopecká, M.; *J. Gen. Microbiol.* **1976**, *92*, 207.
25. Hinton, D. M.; Pressey, R.; *J. Am. Soc. Hort. Sci.* **1980**, *105*, 499.
26. Majeti, N.; Kumar, R.; *React. Funct. Polym.* **2000**, *46*, 1.
27. Roberts, G. Em *Physical structures*; Roberts, G. A. F., ed.; Macmilian: London, 1992, p. 20.
28. Sahai, A. S.; Manocha, M. S.; *Microbiol. Rev.* **1993**, *11*, 317.
29. Bacon, J. S. D.; Gordon, A. H.; Jones, D.; Taylor, I. F.; Webley, D. M.; *Biochem. J.* **1970**, *120*, 67.
30. Doi, K.; Doi, A.; Fukui, T.; *Agr. Biol. Chem.* **1973**, *37*, 1619.
31. Obata, T.; Iwata, H.; Namba, Y.; *Agr. Biol. Chem.* **1977**, *41*, 2387.
32. Obata, T.; Fujioka, K.; Hara, S.; Namba, Y.; *Agr. Biol. Chem.* **1977**, *41*, 671.
33. Yamamoto, N.; Sato, S.; Saito, K.; Hasuo, T.; Tadenuma, M.; Suzuki, K.; Tamaoka, J.; Komagata, K.; *Int. J. Syst. Bacteriol.* **1988**, *38*, 7.
34. Yamamoto, N.; Sato, S.; Miki, H.; Park, Y.; Tadenuma, M.; *J. Gen. Appl. Microbiol.* **1993**, *39*, 261.
35. Santos, L. F.; *Dissertação de Mestrado* - FEA - Universidade Estadual de Campinas, Brasil, 2000.
36. Ferro, L. A.; *Tese de Doutorado* - FEA - Universidade Estadual de Campinas, Brasil, 2002.
37. Hasuo, T.; Yamamoto, N.; Saito, K.; Tadenuma, M.; *J. Brew. Soc. Jpn.* **1984**, *79*, 510.
38. Kitamura, K.; Yamamoto, Y.; *Arch. Biochem. Biophys.* **1972**, *153*, 403.
39. Hayashi, K.; Seino, A.; Kasumi, T.; Kubo, N.; Tsumura, N.; *J. Ferment. Technol.* **1981**, *59*, 319.
40. Hayashi, K.; Seino, A.; Kasumi, T.; Kubo, N.; Tsumura, N.; *Agr. Biol. Chem.* **1981**, *45*, 2289.
41. Pitson, S. M.; Seviour, R. J.; Macdougall, B. M.; *Mycol. Res.* **1997**, *101*, 153.
42. Pitson, S. M.; Seviour, R. J.; Macdougall, B. M.; *Enzyme Microb. Technol.* **1997**, *21*, 182.

43. Noronha, E. F.; Ulhoa, C. J.; *Microbiol. Lett.* **2000**, *183*, 119.
44. Bara, M. T. F.; Lima, A. L.; Ulhoa, C. J.; *FEMS Microbiol. Lett.* **2003**, *219*, 81.
45. Khan, A.; Williams, K.; Molloy, M. P.; Nevalainen, H.; *Protein Expression Purif.* **2003**, *32*, 210.
46. Kobayashi, R.; Miwa, T.; Yamamoto, S.; Nagasaki, S.; *Eur. J. Appl. Microbiol.* **1982**, *15*, 14.
47. Yamamoto, N.; Hasuo, T.; Terauchi, T.; Saito, K.; Tadenuma, M.; *J. Brew. Soc. Jpn.* **1984**, *79*, 828.
48. Yamamoto, N.; Hasuo, T.; Saito, K.; Tadenuma, M.; *Agr. Biol. Chem.* **1987**, *51*, 1541.
49. Vrsanská, M.; Biely, P.; Krátký, Z. Z.; *Allg. Mikrobiol.* **1977**, *17*, 465.
50. Vrsanská, M.; Krátký, Z. Z.; Biely, P.; *Allg. Mikrobiol.* **1977**, *17*, 391.
51. Rowley, B. I.; Bull, A. T.; *Biotechnol. Bioeng.* **1977**, *19*, 879.
52. Bielecki, S.; Wnuk, M.; Szczesna, M.; Bobowicz-Lassocinska, T.; Antczak, T.; Galas, E.; *Biotechnol. Lett.* **1989**, *11*, 281.
53. Gacto, M., Vicente-Soller, J., Villa, T. G.; *J. Appl. Microbiol.* **2000**, *88*, 961.
54. Fleuri, L. F.; *Dissertação de Mestrado - FEA - Universidade Estadual de Campinas, Brasil*, 2003.
55. Nampoothiri, M. K.; Baiju, T. V.; Sandhya, C.; Sabu, A.; Szakacs, G.; Pandey, A.; *Process Biochem.* **2003**.
56. Kenji, S.; Akira, Y.; Hajime, K.; Mamoru, W.; Mitsuaki, M.; *Appl. Environ. Microbiol.* **1998**, *64*, 3397.
57. Macwilliam, I. C.; *J. Inst. Brew.* **1970**, *76*, 525.
58. Kaneko, T.; Kitamura, K.; Yamamoto, Y.; *Agr. Biol. Chem.* **1973**, *37*, 2295.
59. Funatsu, M.; Oh, H.; Aizono, T.; Shimoda, T.; *Agr. Biol. Chem.* **1978**, *42*, 1975.
60. Prokopakis, G. J.; Liu, L. C.; *Biotechnol. Bioeng.* **1997**, *53*, 290.
61. Lechevalier, H. A.; Lechevalier, M. P. Em *Bergey's Manual of Sistematic Bacteriology*; Prauser Lechevalier e Lechevalier, ed. Willians e Willians, 1986, p.1489.
62. Kitamura, K.; *Agr. Biol. Chem.* **1982**, *46*, 2093.
63. Usui, T.; Oguchi, M.; *Agr. Biol. Chem.* **1986**, *50*, 535.
64. Ryan, E; Ward, O.; *Process Biochem.* **1988**. 12.

65. Parrado J.; Escudero, P. R.; Conejero-Lara, F.; Kotik, N.; Ponting, C. P.; Asenjo, J. A.; Dobson, C. M.; *Biochim. Biophys. Acta* **1996**, 1296, 145.
66. Saeki, K.; Iwata, J.; Yamazaki, S.; Watanabe, Y.; Tamai, Y.; *J. Ferment. Bioeng.* **1994**, 78, 407.
67. Thrane, C.; Tronsmo, A.; Jensen, D. F.; *Eur. Plant Pathol.* **1997**, 103, 331.
68. Noronha, E. F.; Ulhoa, C. J.; *Microbiol. Lett.* **2000**, 183, 119.
69. Soares, G. A. M.; *Tese de Doutorado - FEA - Universidade Estadual de Campinas, Brasil*, 2002.
70. Miyanishi, N.; Hamada, N.; Kobayashi, T.; Imada, C.; Watanabe, E.; *J. Biosci. Bioeng.* **2003**, 95, 45.
71. Chen, C.; Hsu, M.; JIANG, S.; *Enzyme Microb. Technol.* **1997**, 20, 191.
72. De Siqueira Pinto, A.; Barreto, C. C.; Schrank, A.; Ulhoa, C. J.; Henning Vainstein, M.; *Can. J. Microbiol.* **1997**, 43, 322.
73. Deane, E. E.; Whipps, J. M.; Lynch, J. M.; Peberdy, J. F.; *Biochim. Biophys. Acta* **1998**, 1383, 101.
74. Ferrer, P.; Hedegaard, L.; Halkier, T.; Diers, I.; Savva, D.; Asenjo, J. A.; *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1996**, 782, 555.
75. Okada, T.; Aisaka, M.; Ainda, K.; Nikaidou, N.; Tanaka, H.; Watanabe, T.; *J. Ferment. Bioeng.* **1995**, 80, 229.
76. Nakabayashi, M.; Nishijima, T.; Ehara, G.; Nikaidou, N.; Nishihashi, H., Watanabe, T.; *J. Ferment. Bioeng.* **1998**, 85, 459.
77. Salazar, O.; Molitor, J.; Lienqueo, M. E.; Asenjo, J. A.; *Protein Expression Purif.* **2001**, 23, 219.
78. Palumbo, J. D.; Sullivan, R. F.; Kobayashi, D. Y.; *J. Bacteriol.* **2003**, 185, 4362.
79. Akiyama, T.; Pillai, M. A.; *Plant Sci.* **2001**, 161, 1089.
80. Yamamoto, Y.; Fujino, S.; Kitamura, K.; Kaneko, T.; *J. Ferment. Technol.* **1974**, 52, 828.
81. Planas, A.; *Biochim. Biophys. Acta* **2000**, 1543, 361.
82. Okagbue, R. N.; Lewis, M. J.; *Biotechnol. Lett.* **1983**, 5, 731.
83. Nakajima, T.; Konno, R.; Nishihara, H.; Matsuda, K.; *J. Ferment. Technol.* **1988**, 66, 245.

84. Richter, G.; Stolken, B.; Hafner, B.; *Okologische Aspekte Extensiver Landbewirtschaftung*. **1992**, 419.
85. Krizková, L.; Duracková, Z.; Sandula, J.; Sasinková, V.; Krajcovic, J.; *Mutat. Res.* **2001**, 497, 213.
86. Elvig, S. G.; Pedersen, P. B.; *Regul. Toxicol. Pharm.* **2003**, 37, 11.
87. Borris, R.; Krah, M.; Brumer, H.; Kerzhner, M. A.; Ivanen, D. I.; Eneyskaya, E. V.; Elyakova, L. A.; Shishlyannikov, S. M.; Shabalin, K. A.; Neustroev, K. N.; *Carbohydr. Res.* **2003**, 338, 1455.
88. Kollar, R.; Petrakova, E.; Ashwell, G.; Robbins, P.W. ; CABIB, E.; *J. Biol. Chem.* **1995**, 270, 1170.
89. Kollar, R.; Reinhold, B. B.; Petrakova, E.; Yeh, H. J. C.; Aswell, G.; Drgonova, J.; Kapteyn, J. C.; Klis, F. M.; Cabib, E.; *J. Biol. Chem.* **1997**, 272, 17762.
90. Southard, S. B.; Specht, C.A.; Mishra, C.; Chen-Weiner, J.; Robbins, P. W.; *J. Bacteriol.* **1999**, 181, 7439.
91. Santos, B.; Snyder, M.; *Mol. Biol. Cell.* **2000**, 11, 435.
92. Patil, R. S.; Ghormade, V.; Deshpande, M. V.; *Enzyme Microb. Technol.* **2000**, 26, 473.
93. Wiwat, C.; Siwayaprahm, P.; Bhumiratana, A.; *Curr. Microbiol.* **1999**, 39, 134.
94. Zhang, Z.; Yuen, G. Y.; *Published Electronically*, **2000**.
95. Sela-Buurlage, M. B.; Ponstein, A. S.; Bres-Vloemans, S. A.; Melchers, L. S.; van Den Elzen, P.; Cornelissen, B.; *Plant Physiol.* **1993**, 101, 857.
96. Ji, C.; Kùc, J.; *Physiol. Mol. Plant P.* **1996**, 49, 257.
97. Beffa, R. S.; Hofer, R. M.; Thomas, M.; Meins Jr., F.; *The Plant Cell.* **1996**, 8, 1001.
98. Kim, Y. J.; Hwang, B. K.; *Physiol. Mol. Plant P.* **1997**, 50, 103.
99. Kang, Z.; Buchenauer, H.; *Physiol. Mol. Plant P.* **2002**, 60, 141.
100. Burketová, L.; Stillerová, K.; Feltlová, M.; *Physiol. Mol. Plant P.* **2003**, 63, 47.
101. Masih, E. I.; Paul, B.; *Curr. Microbiol.* **2002**, 44, 391.
102. Rey, M.; Delgado-Jarana, J.; Benítez, T.; *Appl. Microbiol. Biot.* **2001**, 55, 604.
103. Pozo, M. J.; Cordier, C.; Dumas-Gaudot, E.; Gianinazzi, S.; Barea, J. M.; Azcón-Aguilar, C.; *J. Exp. Bot.* **2002**, 53, 525.
104. Qin, G. Z.; Tian, S. P.; Xu, Y.; Wan, Y. K.; *Physiol. Mol. Plant P.* **2003**, 62, 147.

105. Bargabus, R. L.; Zidack, N. K.; Sherwood, J. E.; Jacobsen, B. J.; *Physiol. Mol. Plant P.* **2002**, *61*, 289.
106. Bargabus, R. L.; Zidack, N. K.; Sherwood, J. E.; Jacobsen, B. J.; *Biol. Control.* **2003**.
107. Urquhart, E. J.; Punja, Z. K.; *Can. J. Microbiol.* **2002**, *48*, 219.

CAPÍTULO II: ESTUDO DO EFEITO DO pH, TEMPERATURA E AGITAÇÃO NA PRODUÇÃO DE β -1,3 GLUCANASES, PROTEASES E QUITINASES

RESUMO

O presente trabalho visou o estudo da produção de β -1,3 glucanases pela linhagem *Cellulosimicrobium cellulans* 191; de proteases pelas linhagens B26 e *C. cellulans* 191 e de quitinases pela linhagem *C. cellulans* 191, em meios de cultivo A, B e C contendo diferentes indutores. Foram realizados planejamentos fatoriais 2^3 , e os fatores estudados foram: pH inicial, temperatura ($^{\circ}\text{C}$) e agitação dos frascos. No planejamento experimental para a produção de β -1,3 glucanase em meio de cultivo A foi verificado maior produção da enzima (0,64 U/mL) com pH inicial de 8,5 após 24 h de fermentação a 33°C e 200 rpm. Os parâmetros pH, agitação dos frascos e a interação entre todos os parâmetros foram estatisticamente significativos; entretanto a temperatura, na faixa estudada, não se apresentou como estatisticamente significativa. O coeficiente de correlação para a produção de β -1,3 glucanase foi de 0,95 e a Anova (Análise de Variância) demonstrou que o modelo de regressão de primeira ordem foi significativo adotando um nível de confiança de 95%, como evidenciado pelo teste-F (F-modelo foi 4,73 vezes maior que o valor de F-tabelado). No planejamento experimental para a produção de protease pela linhagem B26 em meio de cultivo B foi verificado maior produção da enzima (5,01 U/mL) com pH inicial de 6,5; após 30 h de fermentação a 20°C e 200 rpm. Todos os parâmetros foram considerados estatisticamente significativos, com exceção da interação do pH e da agitação. O coeficiente de correlação para a produção de protease pela linhagem B26 foi de 0,95 e a Anova demonstrou que o modelo de regressão de primeira ordem foi significativo adotando um nível de confiança de 95%, como evidenciado pelo teste-F (F-modelo foi 3,52 vezes maior que o valor de F-tabelado). No planejamento experimental para a produção de protease pela linhagem *C. cellulans* 191 em meio de cultivo B foi verificado maior produção da enzima (4,25 U/mL) com pH inicial de 6,5 após 30 h de fermentação a 20°C e 200 rpm. O pH foi o único parâmetro estatisticamente significativo. O coeficiente de correlação para a produção de protease foi de 0,93 e a Anova demonstrou que o modelo de

regressão de primeira ordem foi significativo adotando um nível de confiança de 95%, como evidenciado pelo teste-F (F-modelo foi 26,3 vezes maior que o valor de F-tabelado). No planejamento experimental para a produção de quitinase em meio de cultivo C foi verificado maior produção da enzima (7,06 U/mL) com pH inicial de 5,5 após 72 h de fermentação a 25°C e 200 rpm. Todos os parâmetros estudados e suas interações foram estatisticamente significativos. O coeficiente de correlação para a produção de quitinase foi de 0,99 e a Anova demonstrou que o modelo de regressão de primeira ordem foi significativo adotando um nível de confiança de 95%, como evidenciado pelo teste-F (F-modelo foi 16,13 vezes maior que o valor de F-tabelado).

SUMMARY

The aim of this work was to study the production of β -1,3 glucanases by *Cellulosimicrobium celulans* strain 191; proteases by strains B26 and *C. celulans* 191 and chitinases by *C. celulans* 191, in culture media A, B and C containing different inductors. The experimental designs employed were 2^3 factorial designs, and the factors studied were: initial pH, temperature ($^{\circ}\text{C}$) and rotatory shaker speed (rpm). The experimental results for the production of β -1,3 glucanase in culture medium A showed maximum activity (0.64 U/mL) with an initial pH of 8.5 after 24 h of fermentation at 33°C and 200 rpm. The parameters pH, rotatory shaker speed and the interaction of all the parameters showed statistical significance, but in the range studied, temperature was not statistically significant. The coefficient of correlation for β -1,3 glucanase was 0.95 and the Anova (analysis of variance) of the linear regression model demonstrated that the model was significant at a confidence level of 95% as evidenced in the F-test (F_{model} 4.73 times greater than the tabulated value for F). The experimental results for protease production in culture medium B by strain B26 showed maximum activity (5.01 U/mL) with an initial pH of 6.5 after 30 h of fermentation at 20°C and 200 rpm. All the parameters, with the exception of the interaction between pH and agitation, showed statistical significance. The coefficient of correlation for protease was 0.95 and the Anova of the linear regression model demonstrated that the model was significant at a confidence level of 95% as evidenced in the F-test (F_{model} 3.52 times greater than the tabulated value for F). The experimental results for protease production in culture medium B by strain 191 showed maximum activity (4.25 U/mL) with an initial pH of 6.5 after 30 h of fermentation at 20°C and 200 rpm. The pH was the only parameter showing statistical significance. The coefficient of correlation for protease was 0.93 and the Anova of the linear regression model demonstrated that the model was significant at a confidence level of 95% as evidenced in the F-test (F_{model} 26.3 times greater than the tabulated value of F). The experimental results for chitinase production in culture medium C showed maximum activity (7.06) at an initial pH of 5.5 after 72 h of fermentation at 25°C and 200 rpm. All the parameters and their interactions showed statistical significance. The coefficient of correlation for chitinase was 0.99 and the Anova of the linear regression model demonstrated that the model was significant at a

confidence level of 95% as evidenced in the F-test (F_{model} 16.13 times greater than the tabulated value of F).

INTRODUÇÃO

A parede celular de leveduras é formada por três principais grupos de polissacarídeos: β - glucana (β -1,3 glucana e β -1,6 glucana), mananaproteínas e quitina. A β - glucana é o composto majoritário da parede celular de leveduras, seguida pelas mananaproteínas e pela quitina. A camada externa da parede celular de leveduras é formada pelas mananaproteínas, enquanto a interna, pela glucana^{1,2}. Diferentemente da parede celular das leveduras, a parede celular de fungos é composta principalmente por quitina³.

As β -1,3 glucanases, proteases líticas e quitinases são capazes de hidrolisar componentes da parede celular de microrganismos e, por isso, apresentam atividade lítica sobre leveduras e fungos⁴.

Modelos matemáticos têm sido cada vez mais utilizados para ajudar a explicar respostas de reações bioquímicas. A metodologia de superfície de resposta é freqüentemente usada para determinar uma resposta ótima dentre uma faixa específica das condições das variáveis estudadas. Em muitos casos, a interação de parâmetros que influenciam processos fermentativos pode ser avaliada com um número reduzido de ensaios através de um planejamento experimental⁵. Em relação às enzimas líticas, a metodologia de superfície de resposta é freqüentemente utilizada para a otimização e/ou verificação da influência dos componentes do meio de cultivo para a produção das enzimas, assim como, a otimização e/ou verificação da influência de parâmetros na produção enzimática.

Soares⁶ estudou a produção da β -1,3 glucanase pela linhagem *C. cellulans* 191. O microrganismo foi cultivado em meio contendo diferentes tipos de indutores e as condições de cultivo foram otimizadas através do planejamento experimental para o aumento da produção desta enzima. O meio de cultivo selecionado para a maior produção da enzima era composto de 0,20% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,02% de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 1% de parede celular de levedura extraída mecanicamente em Dyno-Mill em tampão fosfato 0,2M, pH 7,5. O melhor indutor testado foi a parede celular de leveduras obtida por rompimento mecânico. Após otimização obteve-se cerca de 75% a mais de atividade de β -1,3 glucanase em relação às condições originais, aonde a melhor produção foi obtida quando o microrganismo foi cultivado após 24 h em meio modificado, pH 7,5, em agitador rotatório a 200 rpm e a 30°C.

Estudos complementares da protease lítica da linhagem *C. cellulans* 191 foram

desenvolvidos por Santos⁷. O meio para a produção de protease lítica da linhagem foi otimizado por planejamento experimental utilizando o software Statistica e foi obtida a seguinte composição: 2,0 g/L de (NH₄)₂SO₄; 0,2 g/L de MgSO₄.7H₂O e 80 g/L de levedura seca utilizada como indutor em tampão fosfato 0,15 M, pH 8,0.

Adinarayana e Ellaiah⁸ otimizaram os componentes do meio de cultivo para produção de protease utilizando planejamento fatorial completo 2³. Os valores ótimos para as variáveis testadas para a máxima produção de protease alcalina foram: 7,98 g/L de glicose; 9,54 g/L de peptona e 8,75 g/L de solução salina. Segundo os autores o método foi eficiente, somente 20 experimentos foram necessários para determinar as condições ótimas, o modelo foi satisfatório e o coeficiente de determinação foi de 0,94. Neste trabalho foi demonstrado que o uso do planejamento fatorial completo central pela determinação das condições ótimas resultou em um aumento no rendimento da produção da enzima.

Vaidya *et al.*⁹ estudaram a otimização dos componentes do meio de cultivo para a produção de quitinase pela bactéria *Alcaligenes xylosoxydans* IMI 385022. Os componentes do meio de cultivo considerados relevantes para a produção de quitinase através do método Plackett-Burman foram: Tween 20, extrato de levedura e quitina. A concentração ótima dos componentes foi: 1,0 g/L de (NH₄)₂SO₄; 1,36 g/L de KH₂PO₄; 0,3 g/L de MgSO₄ . 7 H₂O; 0,12 g/L de Tween 20; 0,3 g/L de extrato de levedura e 15 g/L de quitina. Usando este método de otimização estatística a produção de quitinase aumentou aproximadamente 2,41 vezes.

A otimização das condições de cultivo para a produção de β- glucanase por *Bacillus subtilis* ZJF 1A5 foi estudada em frascos agitados. A temperatura apresentou grande efeito na produção da enzima, sendo a temperatura ótima 37°C. A atividade diminuiu significativamente quando se utilizaram temperaturas superiores a esta. A quantidade de meio utilizado nos frascos afetou substancialmente a produção da β- glucanase. Os resultados do planejamento fatorial fracionário mostraram que o tempo de crescimento e tamanho do inóculo e a velocidade de agitação dos frascos foram fatores fundamentais para a produção de β- glucanase e para o período de tempo para se obter maior atividade da enzima. As condições ótimas para a produção de β- glucanase obtidas no planejamento composto central foram: tempo de incubação do inóculo de 16 h; quantidade do inóculo de 3,82%; agitação dos frascos de 210 rpm; 30 mL de meio de cultivo em frascos de 250 mL,

pH inicial de 7,0; temperatura de 37°C e tempo de incubação para a maior produção enzimática de 50 h. Os resultados experimentais foram de acordo com os valores preditos pelo modelo polinomial de segunda ordem¹⁰.

O planejamento fracionário fatorial 2⁶⁻² foi aplicado para elucidar os componentes do meio de cultivo que afetam significativamente a produção da enzima β- glucanase de *Bacillus subtilis* ZJF1A5. A concentração da farinha de cevada, farinha de milho e farinha de soja no meio foram fatores significativos. O método de análise ascendente foi usado para localizar o ponto ótimo. As curvas de contorno do planejamento composto central foram utilizadas para estimar a superfície de resposta quadrática proveniente dos níveis dos fatores para a máxima produção enzimática. A composição do meio de fermentação otimizado com a metodologia de superfície de resposta foi: 63,5 g/L de farinha de cevada; 44,8 g/L de farinha de milho; 1,0 g/L de KH₂PO₄; 0,1 g/L de MgSO₄ . 7 H₂O; 0,1 g/L de CaCl₂. A atividade da enzima após 48 h de fermentação foi cerca de 1,4 vezes maior que a atividade enzimática obtida no meio original¹¹.

Beshay *et al.*¹² descreveram a produção de β-1,3 glucanase de *Bacillus* sp. utilizando uma linhagem de *Escherichia coli* recombinante. A produção máxima de β-1,3 glucanase ocorreu após 28 h de fermentação utilizando um meio de cultivo otimizado composto por: 7,0 g/L de lactose; 24,0 g/L de extrato de levedura e 5,0 g/L de NaCl.

As enzimas líticas produzidas pela linhagem *Cellulosimicrobium cellulans* 191 são capazes de lisar células de leveduras, e por isso, apresentam grandes perspectivas em diversos ramos biotecnológicos¹³. Proteases, β-1,3 glucanases e quitinases são capazes de lisar a parede celular de *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida* sp. e outros gêneros de leveduras e as preparações enzimáticas com alto teor de quitinases são capazes de inibir o crescimento de fungos como *Trichoderma harzianum* e *Aspergillus niger*^{14,15}.

Este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito de diferentes parâmetros na produção de β-1,3 glucanases, proteases líticas e quitinases pelas linhagens *Cellulosimicrobium cellulans* 191 e B26 utilizando planejamento experimental.

MATERIAL E MÉTODOS

Material

Reagentes: Caseína Hammarsten e ácido tricloroacético (Merck), ácidos, bases, sais e minerais (Merck, Riedel, Ecibra ou equivalente).

Material específico: laminarina (polissacarídeo composto de unidades de β -1,3 glicose, obtido da alga *Laminaria digitata*) (Sigma); parede celular bruta de levedura *Saccharomyces cerevisiae* (Prodesa); levedura seca (Fleischmann) e quitina de crustáceos (doada pelo Prof. Luiz Henrique Beirão).

Microrganismos que lisam a parede celular de leveduras:

A linhagem *Cellulosimicrobium cellulans* 191 foi utilizada para a produção de β -1,3 glucanases e quitinases; enquanto que as linhagens B26 e *Cellulosimicrobium cellulans* 191 foram utilizadas para a produção de proteases. As linhagens bacterianas foram isoladas de resíduos de usina de fermentação alcoólica, por Ferro¹⁶, no Laboratório de Bioquímica de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas.

Métodos

Manutenção dos microrganismos

Os microrganismos que lisam leveduras estão sendo mantidos em tubos inclinados com meio ágar TYM descrito por Yamamoto *et al.*¹⁷. As culturas vêm sendo conservadas a 4°C sob camada de vaselina esterilizada e repicadas a cada três ou quatro meses de armazenamento.

Estudo do efeito do pH, temperatura e agitação na produção de β -1,3 glucanases, proteases e quitinases em diferentes tempos de fermentação, em diferentes meios de cultivos, em frascos agitados, utilizando planejamento experimental

Foram realizados um total de 11 ensaios, para o estudo de produção de cada enzima, tratando-se de um planejamento fatorial 2^n com 3 pontos centrais, onde n é o número de

variáveis independentes, conforme metodologia descrita por Neto *et al.*¹⁸. Para cada ensaio foram coletadas alíquotas após diferentes tempos de fermentação. A análise estatística dos resultados foi realizada através do programa computacional Statistica 5.0 (StatSoft, 1995)¹⁹, utilizando o Experimental Design.

Preparação do Pré-Inóculo: uma alçada das culturas de 24 h dos microrganismos em tubos inclinados de meio TYM foram inoculadas separadamente em frascos Erlenmeyers de 500 mL contendo 100 mL do meio de cultivo.

Fermentação: alíquotas de 10 mL do pré-inóculo foram transferidas assepticamente para frascos Erlenmeyers de 500 mL contendo 90 mL do mesmo meio de cultivo. Os frascos foram incubados sob diferentes condições, em diferentes tempos de fermentação, conforme o planejamento experimental.

Obtenção do Extrato Enzimático Bruto: Após incubação, os meios de cultivo obtidos no item anterior foram centrifugados a 7.840 g durante 10 min a 5°C e os sobrenadantes utilizados como fonte de enzima.

As atividades de β -1,3 glucanases, proteases e quitinases nos sobrenadantes dos meios de cultivo foram determinadas como descrito abaixo.

Estudo da produção de β -1,3 glucanases pela linhagem *Cellulosimicrobium cellulans* 191

A produção de β -1,3 glucanases pela linhagem *C. cellulans* 191 foi testada, em frascos agitados, em meio de cultivo A composto por 2,0 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,2 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 10 g/L de parede celular de levedura em tampão fosfato 0,2 M, pH 7,5, otimizado por Soares⁶.

As variáveis independentes e seus respectivos níveis e valores reais do planejamento fatorial estão ilustrados na Tabela II 1.

Tabela II 1. Variáveis independentes, níveis e valores reais utilizadas no planejamento fatorial para o estudo da produção de β -1,3 glucanases pela linhagem *C. cellulans* 191

Variáveis Independentes	Níveis		
	-1	0	1
pH	6,5	7,5	8,5
Temperatura (°C)	27	30	33
Agitação (rpm)	100	150	200

Para os valores de pH 6,5 e 7,5 foi utilizado tampão fosfato 0,2M; enquanto que para o valor de pH 8,5 foi utilizado tampão carbonato-bicarbonato 0,2M.

A tendência do planejamento experimental para a produção de β -1,3 glucanase pela linhagem *C. cellulans* 191 foi confirmada através da fermentação em frascos Erlenmeyers aletados, em pH 7,5; 30°C e 200 rpm, após 24 h de fermentação.

Estudo da produção de proteases pelas linhagens B26 e *C. cellulans* 191

A produção de proteases pelas linhagens B26 e *C. cellulans* 191 foi testada, em frascos agitados, em meio de cultivo B composto por 2,0 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,2 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 80 g/L de levedura seca utilizada como indutor em tampão fosfato 0,15 M, pH 8,0, otimizado por Santos⁷.

As variáveis independentes e seus respectivos níveis e valores reais estão ilustrados na Tabela II 2.

Tabela II 2. Variáveis independentes, níveis e valores reais utilizadas no planejamento fatorial para o estudo da produção de protease pelas linhagens B26 e *C. cellulans* 191

Variáveis Independentes	Níveis		
	-1	0	1
pH	6,5	8,0	9,5
Temperatura (°C)	20	30	40
Agitação (rpm)	100	150	200

Estudo da produção de quitinase pela linhagem *C. cellulans* 191

A produção de quitinase pela linhagem *Cellulosimicrobium cellulans* 191 foi testada, em frascos agitados, em meio de cultivo C composto por 4,0 g/L de extrato de levedura; 2,0 g/L de triptona; 4,0 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 1,2 g/L de KH_2PO_4 ; 2,8 g/L de K_2HPO_4 e 15 g/L de quitina neutralizada utilizada como indutor, otimizado por Yamaguchi²⁰. Este meio de cultivo apresenta pH 6,5.

As variáveis independentes e seus respectivos níveis e valores reais estão ilustrados na Tabela II 3.

Tabela II 3. Variáveis independentes, níveis e valores reais utilizadas no planejamento fatorial para o estudo da produção de quitinase pela linhagem *C. cellulans* 191

Variáveis Independentes	Níveis		
	-1	0	1
pH	5,5	6,5	7,5
Temperatura (°C)	25	30	35
Agitação (rpm)	100	150	200

Foram utilizadas soluções de HCl e NaOH, para ajustar os valores de pH dos meios de cultivo requeridos para o planejamento experimental.

Determinação da atividade de β -1,3 glucanase

A atividade de β -1,3 glucanase foi determinada como descrito por Saeki *et al.*²¹ e Santos²². A mistura de 250 μ L de solução enzimática e 250 μ L de solução 1,0% de laminarina em tampão acetato de sódio 0,1 M, pH 5,5 foi incubada a 55°C por 30 min. A reação foi interrompida por aquecimento a 100°C por 5 min. Os açúcares redutores foram determinados pelo método de Somogyi²³ utilizando-se glicose como açúcar padrão. Para controle foram determinados os açúcares redutores presentes na solução enzimática utilizando-se água destilada no lugar da solução de laminarina. Para ajuste do espectrofotômetro foi preparado um tubo branco utilizando-se água destilada no lugar da solução de laminarina. Uma unidade de atividade foi definida como a liberação de um μ mol de glicose por minuto por mL de solução enzimática.

Determinação da atividade de protease lítica

A atividade de protease foi determinada utilizando-se caseína como substrato como descrito por Obata *et al.*²⁴ e Rowley e Bull²⁵. A mistura de reação contendo 1,5 mL de solução 2,0% de caseína; 1,0 mL de tampão fosfato 0,15 M, pH 7,5 e 0,5 mL de solução enzimática foi incubada a 30°C por 30 min. A reação foi paralisada pela adição de 3,0 mL de solução 0,4 M de ácido tricloroacético (TCA), seguida de filtração em papel Whatman 42. A absorbância do filtrado foi determinada a 280 nm, sendo uma unidade de atividade definida como aquela capaz de aumentar em uma unidade a absorbância do filtrado, nas condições do ensaio. Foi preparado um tubo branco para cada amostra, com a adição de

TCA antes da adição da enzima.

Determinação da atividade de quitinase

A atividade de quitinase foi determinada usando quitina coloidal^{26,27}, de acordo com a metodologia otimizada por Yamaguchi²⁰. A quitina coloidal foi preparada como descrito por Fleuri¹³. A mistura de 0,5 mL de solução enzimática e 0,5 mL de suspensão de quitina coloidal 0,2% em tampão citrato de sódio 0,1 M, pH 6,0 foi incubada durante 60 min a 45°C. A mistura de reação foi resfriada em banho de gelo e centrifugada a 8.232 g por 10 min a 5°C. A mistura de 1,0 mL do sobrenadante e 50 µL de borato de potássio 0,8 M foi aquecida em banho em ebulição por 3 min e resfriada em banho de gelo. Em seguida foi adicionado 1,5 mL de solução 10% de dimetilaminobenzaldeído em ácido acético contendo 12,5% de HCl 10 N. A mistura foi incubada em banho-maria a 37°C durante 20 min e a absorbância foi determinada a 585 nm. Para a preparação do tubo branco foi utilizada solução enzimática inativada através de aquecimento durante 5 min em banho em ebulição. Uma unidade de atividade foi definida como 1 µmol de N-acetilglicosamina formado nas condições do ensaio.

Todos os testes para a determinação das atividades enzimáticas foram realizados em duplicatas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Estudo do efeito do pH, temperatura e agitação na produção de β -1,3 glucanases, proteases e quitinases em diferentes tempos de fermentação, em diferentes meios de cultivos, em frascos agitados, utilizando planejamento experimental

Estudo da produção de β -1,3 glucanase pela linhagem *C. cellulans* 191

Foi realizado um planejamento fatorial para avaliar as variáveis independentes pH, temperatura e agitação dos frascos na produção de β -1,3 glucanases pela linhagem *C. cellulans* 191.

A Tabela II 4 mostra o planejamento fatorial para a produção de β -1,3 glucanases pela linhagem *C. cellulans* 191, com seus valores reais e codificados para cada ensaio, assim como a variável dependente: atividade de β -1,3 glucanase (U/mL).

Tabela II 4. Estudo do efeito do pH, temperatura e agitação na produção de β -1,3 glucanase pela linhagem *C. cellulans* 191, em diferentes tempos de fermentação, em frascos agitados, utilizando planejamento experimental

Ensaio	pH	Temperatura (°C)	Agitação (rpm)	Tempo de Fermentação		
				18h	24h	30h
1	-1 (6,5)	-1 (27)	-1 (100)	0,05	0,07	0,06
2	1 (8,5)	-1 (27)	-1 (100)	0,20	0,29	0,28
3	-1 (6,5)	1 (33)	-1 (100)	0,02	0,03	0,03
4	1 (8,5)	1 (33)	-1 (100)	0,21	0,27	0,25
5	-1 (6,5)	-1 (27)	1 (200)	0,08	0,10	0,09
6	1 (8,5)	-1 (27)	1 (200)	0,35	0,45	0,43
7	-1 (6,5)	1 (33)	1 (200)	0,07	0,09	0,09
8	1 (8,5)	1 (33)	1 (200)	0,51	0,64	0,62
9	0 (7,5)	0 (30)	0 (150)	0,23	0,29	0,27
10	0 (7,5)	0 (30)	0 (150)	0,21	0,30	0,24
11	0 (7,5)	0 (30)	0 (150)	0,24	0,31	0,25

A Figura II 1 ilustra a produção de β -1,3 glucanase pela linhagem *C. cellulans* 191 após 18, 24 e 30 h de fermentação, nos ensaios realizados de acordo com o planejamento experimental.

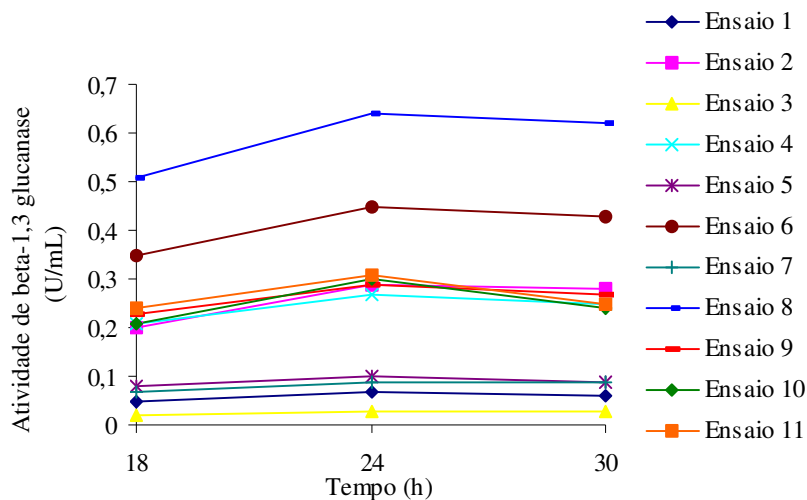


Figura II 1. Produção de β -1,3 glucanase pela linhagem *C. cellulans* 191 após 18, 24 e 30 h de fermentação, nos ensaios realizados de acordo com o planejamento experimental fatorial

A análise estatística foi realizada com os valores de atividade enzimática obtidos após 24 h de fermentação, onde foi obtido maior atividade de β -1,3 glucanase (ensaio 8) (Tabela II 4 e Figura II 1).

Analisando os valores de atividade obtidos na Tabela II 4 e Figura II 1 após 24 h de fermentação, verifica-se um incremento na atividade de β -1,3 glucanase ao longo do planejamento, variando de 0,03 U/mL de β -1,3 glucanase para o ensaio 3 (pH 6,5, 33°C e 100 rpm) até 0,64 U/mL de β -1,3 glucanase para o ensaio 8 (pH 8,5, 33°C e 200 rpm). Não foi detectada nenhuma atividade de protease e quitinase no sobrenadante do meio de cultivo do extrato enzimático da linhagem 191 do ensaio 8 após 24 h de fermentação. Os 11 experimentos realizados em diferentes condições após 24 h de fermentação fornecem informações importantes relacionadas ao ganho de atividade enzimática e a importância de se conhecer e estabelecer condições adequadas para a produção da enzima.

A Tabela II 5 apresenta o efeito das variáveis (pH, temperatura e agitação dos frascos) sobre a produção de β -1,3 glucanase pela linhagem *C. cellulans* 191. O pH e a agitação apresentaram efeitos positivos significativos na atividade enzimática. No entanto, a temperatura individualmente (na faixa estudada) não afetou a produção de β -1,3 glucanase, mas sua interação com o pH e a agitação geraram efeitos positivos significativos. O pH exerceu o maior efeito para a produção da enzima, seguido pela agitação. Dessa forma verificou-se que as condições para se obter maior produção de β -1,3 glucanase pela linhagem 191, dentre os valores estudados, são: valores de pH acima de 6,5 e agitação dos frascos superior a 100 rpm. Escolheu-se pH 7,5 levando em consideração que pH muito elevado pode diminuir a estabilidade da enzima e, também, para facilitar a etapa posterior de purificação da enzima. Para a produção da enzima β -1,3 glucanase pela linhagem *Cellulosimicrobium cellulans* 191 foi escolhido 200 rpm para a agitação dos frascos e 30°C.

Tabela II 5. Estimativa dos efeitos das variáveis independentes (pH, temperatura e agitação) na produção de β -1,3 glucanase pela linhagem *C. cellulans* 191, em frascos agitados

Parâmetros	Efeito (U/mL)	Desvio Padrão	t (2)	P	Limite de Confiança (-95%)	Limite de Confiança (+95%)
Média	0,26	0,003	85,63	0,0001	0,2452	0,2712
1- pH (L)*	0,34	0,007	48,08	0,0004	0,3096	0,3704
2- Temperatura (L)	0,03	0,007	4,24	0,0513	-0,0004	0,0604
3- Agitação (L)*	0,16	0,007	21,92	0,0021	0,1246	0,1854
1 x 2*	0,06	0,007	7,78	0,0161	0,0246	0,0854
1 x 3*	0,11	0,007	15,56	0,0041	0,0796	0,1404
2 x 3*	0,06	0,007	8,49	0,0136	0,0296	0,0904

* Parâmetros estatisticamente significativos
(L) Parâmetro linear

Neste trabalho foram realizados planejamentos experimentais fatoriais 2^3 com três pontos centrais para a avaliação de diferentes parâmetros (pH, temperatura e agitação) e suas interações na produção de enzimas líticas.

He *et al.*¹⁰ otimizaram as condições de cultivo para a produção de β - glucanase por *Bacillus subtilis* ZJF 1A5, em frascos agitados. A temperatura apresentou grande efeito na

produção da enzima, sendo a temperatura ótima 37°C; a atividade diminuiu significativamente quando se utilizaram temperaturas superiores a esta. A quantidade de meio de cultivo no frasco afetou substancialmente a produção de β -glucanase. O aumento da velocidade de agitação resultou no aumento da produção da enzima, mas foi dependente da concentração e da quantidade de meio de cultivo utilizado no frasco. Os resultados do planejamento fatorial fracionário mostraram que o tempo de crescimento e tamanho do inóculo e a velocidade de agitação dos frascos foram fatores fundamentais para a produção de β -glucanase e para o período de tempo para se obter a mais alta atividade. As condições ótimas para a produção de β -glucanase obtidas no planejamento composto central foram: tempo de incubação do inóculo de 16 h; quantidade do inóculo de 3,82%; agitação dos frascos de 210 rpm; 30 mL de meio de cultivo em frascos de 250 mL e pH inicial de 7,0; temperatura de 37°C e tempo de incubação para a maior produção enzimática de 50 h. Os resultados experimentais estavam de acordo com os valores preditos pelo modelo polinomial de segunda ordem.

No presente estudo o planejamento fatorial foi utilizado para a verificação da influência das variáveis pH, temperatura e agitação na produção de β -1,3 glucanase pela linhagem bacteriana *C. cellulans* 191. O pH, a agitação e as interações entre todos os parâmetros influenciaram a produção da enzima, enquanto a temperatura sozinha não apresentou nenhum efeito sob a produção, dentre os valores estudados, a 95% de nível de confiança.

No estudo paralelo de produção de β -1,3 glucanase pela linhagem *Cellulosimicrobium cellulans* 191 com frascos aletados em tampão fosfato 0,2 M, pH 7,5, 30°C e 200 rpm de agitação foi detectada 1,14 U/mL de β -1,3 glucanase após 24 h de fermentação, evidenciando que aerações maiores são favoráveis para a produção da enzima. No sobrenadante do meio de cultivo foi detectada 0,13 U/mL de protease e nenhuma atividade de quitinase.

Soares⁶ verificou que a linhagem 191 cultivada no meio A contendo 1% de parede celular extraída mecanicamente em Dyno-Mill produziu atividade de β -1,3 glucanase (0,59 U/mL) 4,2 vezes maior quando comparada com o estudo realizado por Ferro¹⁶, em que foi obtido 0,14 U/mL de β -1,3 glucanase em meio de cultivo descrito Scott Schekman¹⁴. No presente trabalho foi verificado que a mesma linhagem produziu atividade de β -1,3

glucanase (1,14 U/mL) aproximadamente 1,9 vezes maior que a obtida por Soares⁶, utilizando meio de cultivo A contendo 1% de parede celular de levedura, em frascos aletados agitados, a 30°C e 200 rpm.

A Tabela II 6 apresenta os coeficientes de regressão, desvios padrões e limites de confiança para a produção de β -1,3 glucanase pela linhagem *C. cellulans* 191.

Tabela II 6. Resultados do coeficiente de regressão, desvio padrão e limites de confiança no estudo do efeito das variáveis independentes (pH, temperatura e agitação) na produção de β -1,3 glucanase pela linhagem *C. cellulans* 191

Parâmetros	Coefficiente de Regressão	Desvio Padrão	Limite de Confiança (-95%)	Limite de Confiança (+95%)
Média	0,26	0,003	0,2452	0,2712
1- pH (L)*	0,17	0,004	0,1548	0,1852
2- Temperatura (L)	0,02	0,004	-0,0002	0,0302
3- Agitação (L)*	0,08	0,004	0,0623	0,0927
1 x 2*	0,03	0,004	0,0123	0,0427
1 x 3*	0,06	0,004	0,0398	0,0702
2 x 3*	0,03	0,004	0,0148	0,0452

* Parâmetros estatisticamente significativos

(L) Parâmetro linear

A validade do modelo foi então verificada pela Análise de Variância (Anova) apresentada na Tabela II 7. O coeficiente de correlação obtido foi de 0,96. O valor do teste F calculado foi comparado ao valor do F tabelado para a distribuição de F a 95% de nível de confiança com os respectivos graus de liberdade. O F calculado para a produção de β -1,3 glucanase pela linhagem *C. cellulans* 191 foi de 4,73 vezes maior que o F tabelado, indicando que o modelo de primeira ordem é estatisticamente significativo e preditivo e descreve as respostas em função das variáveis analisadas.

Tabela II 7. Análise de variância no estudo do efeito das variáveis independentes (pH, temperatura e agitação) na produção de β -1,3 glucanase pela linhagem *Cellulosimicrobium cellulans* 191

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Teste Fcal
Regressão	0,3167	5	0,0633	23,88
Resíduos	0,0133	5	0,0027	
Falta de Ajuste	0,0131	3	0,0044	
Erro Puro	0,0002	2	0,0001	
Total	0,3300	10		

Coefficiente de correlação: R^2 : 0,96

$F_{tab\ 0,95;5;5} = 5,05$

$F_{cal}/F_{tab} = 4,73$

Os coeficientes de regressão não estatisticamente significativos a 95% de nível de confiança foram excluídos do modelo, sendo incorporados no resíduo total. A partir da validação dos parâmetros de estudo, obteve-se o modelo linear que representa o comportamento da atividade enzimática e que descreve as superfícies de resposta e curvas de contorno (Figura II 2) da produção de β -1,3 glucanase pela linhagem *Cellulosimicrobium cellulans* 191 (Equação 1).

Equação 1:

Atividade de β -1,3 glucanase = $0,26 + 0,17 \cdot \text{pH (L)} + 0,08 \cdot \text{agitação (L)} + 0,03 \cdot \text{pH (L)} \cdot \text{temperatura (L)} + 0,06 \cdot \text{pH (L)} \cdot \text{agitação (L)} + 0,03 \cdot \text{temperatura (L)} \cdot \text{agitação (L)}$.

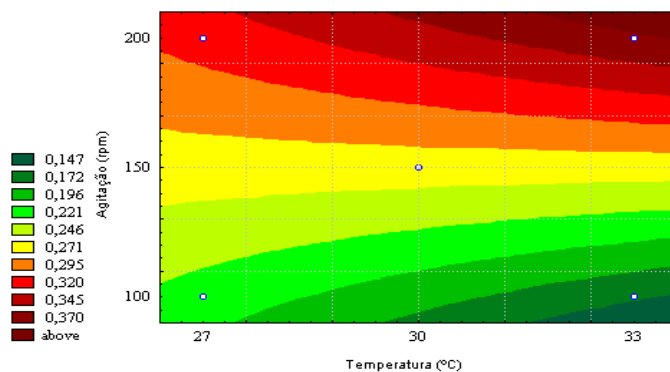
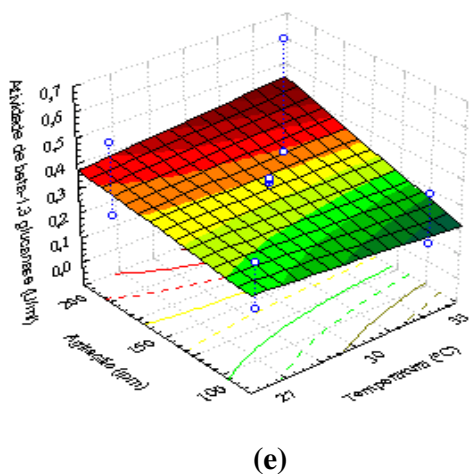
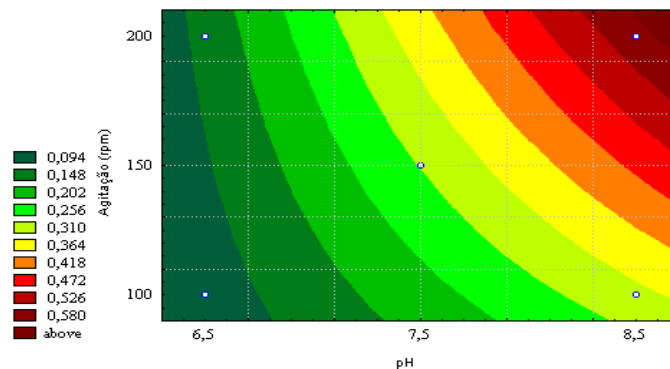
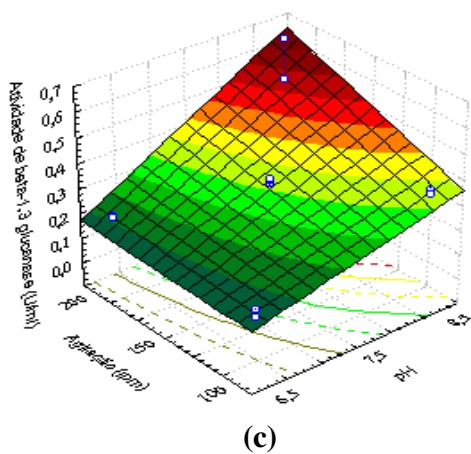
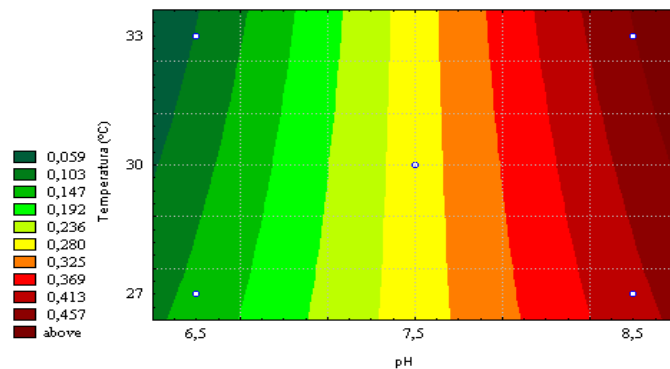
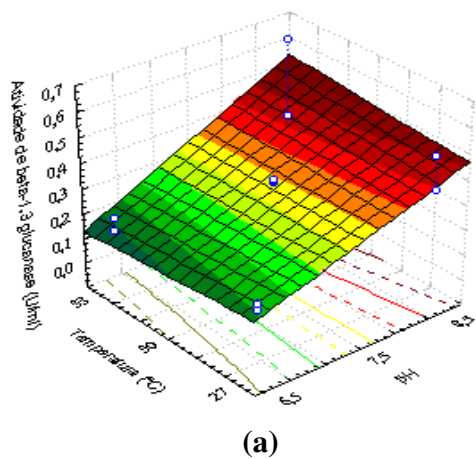


Figura II 2. Superfícies de resposta e curvas de contorno obtidas no planejamento experimental fatorial para a produção de β -1,3 glucanase pela linhagem *C. cellulans 191* como resposta para: (a) e (b) pH e temperatura; (c) e (d) pH e agitação e (e) e (f) temperatura e agitação

Estudo da produção de proteases pelas linhagens B26 e *C. cellulans* 191

Foram realizados dois planejamentos fatoriais para avaliar as variáveis independentes pH, temperatura e agitação dos frascos na produção de proteases pelas linhagens B26 e *C. cellulans* 191.

A Tabela II 8 mostra o planejamento fatorial para a produção de protease pela linhagem B26, com seus valores reais e codificados para cada ensaio, assim como a variável dependente: atividade de protease lítica (U/mL).

Tabela II 8. Estudo do efeito do pH, temperatura e agitação na produção de protease pela linhagem B26, em diferentes tempos de fermentação, em frascos agitados

Ensaio	pH	Temperatura (°C)	Agitação (rpm)	Tempo de Fermentação		
				24h	30h	36h
1	-1 (6,5)	-1 (20)	-1 (100)	3,96	3,83	3,67
2	1 (9,5)	-1 (20)	-1 (100)	0,38	0,20	0,39
3	-1 (6,5)	1 (40)	-1 (100)	3,12	2,94	3,23
4	1 (9,5)	1 (40)	-1 (100)	0,13	0,00	0,10
5	-1 (6,5)	-1 (20)	1 (200)	5,01	4,85	4,53
6	1 (9,5)	-1 (20)	1 (200)	1,02	0,41	0,43
7	-1 (6,5)	1 (40)	1 (200)	2,58	2,18	3,12
8	1 (9,5)	1 (40)	1 (200)	0,00	0,18	0,12
9	0 (8,0)	0 (30)	0 (150)	2,82	2,51	1,63
10	0 (8,0)	0 (30)	0 (150)	2,85	2,65	1,84
11	0 (8,0)	0 (30)	0 (150)	2,76	3,54	2,21

A Figura II 3 ilustra a produção de protease pela linhagem B26 após 24, 30 e 36 h de fermentação, nos ensaios realizados de acordo com o planejamento experimental fatorial.

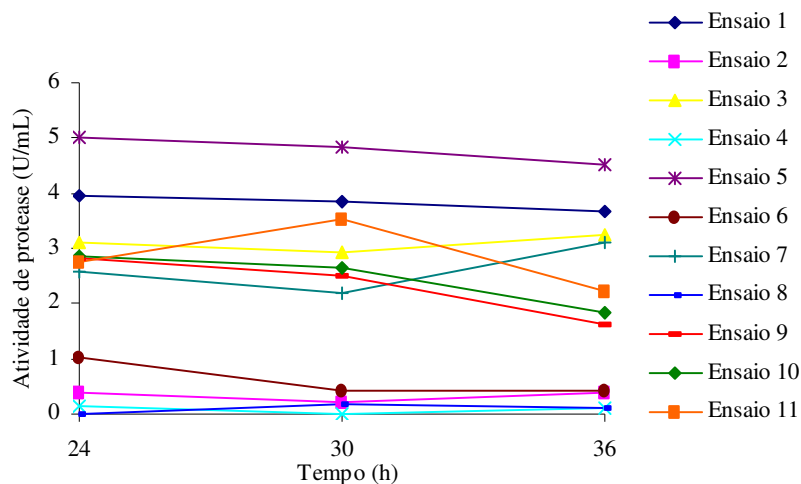


Figura II 3. Produção de protease pela linhagem B26 após 24, 30 e 36h de fermentação, nos ensaios realizados de acordo com o planejamento experimental fatorial

A análise estatística foi realizada com os valores de atividade enzimática obtidos após 24 h de fermentação, onde se obteve a maior atividade de protease (ensaio 5) (Tabela II 8 e Figura II 3).

Analisando os valores de atividade obtidos na Tabela II 8 e Figura II 3 após 24 h de fermentação, verificou-se um aumento na atividade de protease ao longo do planejamento, variando de atividade de protease nula para o ensaio 8 (pH 9,5, 40°C e 200) até 5,01 U/mL de protease para o ensaio 5 (pH 6,5, 20°C e 200 rpm). Foi detectada 0,13 U/mL de β -1,3 glucanase e nenhuma atividade de quitinase no sobrenadante do meio de cultivo da linhagem B26, do ensaio 5, após 24 h de fermentação.

A Tabela II 9 apresenta o efeito das variáveis (pH, temperatura e agitação) sobre a produção de protease pela linhagem B26. O pH e a temperatura apresentaram efeitos negativos significativos na atividade enzimática; enquanto que a variável agitação dos frascos exerceu efeito positivo significativo. A interação do pH com a temperatura e da temperatura com a agitação geraram efeitos significativos, respectivamente, positivo e negativo. A interação do pH com a agitação não foi estatisticamente significativa. O pH apresentou maior efeito sobre a resposta, seguido da temperatura. A agitação pouco influenciou a produção de protease. Dessa forma verificou-se que as condições para se obter maior produção de protease pela linhagem B26, dentre os valores estudados, são: valores de pH abaixo de 9,5, temperaturas abaixo de 40°C e agitação dos frascos superior a 100 rpm. Para a continuidade do trabalho de produção de protease pela linhagem B26 foram escolhidos valor de pH 6,5, temperatura de 25°C e agitação de 150 rpm.

Tabela II 9. Estimativa dos efeitos das variáveis independentes (pH, temperatura e agitação) na produção de protease pela linhagem B26

Parâmetros	Efeito (U/mL)	Desvio Padrão	t (2)	p	Limite de Confiança (-95%)	Limite de Confiança (+95%)
Média	2,24	0,014	162,05	0,00004	2,18	2,30
1- pH (L)*	-3,29	0,032	-101,38	0,0001	-3,42	-3,15
2- Temperatura (L)*	-1,14	0,032	-35,03	0,00081	-1,27	-1,00
3- Agitação (L)*	0,26	0,032	7,87	0,01577	0,12	0,39
1 x 2*	0,50	0,032	15,43	0,00417	0,36	0,64
1 x 3	0	0,032	0,0	1,0	-0,14	0,14
2 x 3*	-0,59	0,032	-18,21	0,003	-0,73	-0,45

* Parâmetros estatisticamente significativos.

(L) Parâmetro linear

A Tabela II 10 apresenta os coeficientes de regressão, desvios padrões e limites de confiança para a produção de protease pela linhagem B26.

Tabela II 10. Resultados do coeficiente de regressão, desvio padrão e limites de confiança no estudo do efeito das variáveis independentes (pH, temperatura e agitação) na produção de protease pela linhagem B26

Parâmetros	Coefficiente de Regressão	Desvio Padrão	Limite de Confiança (-95%)	Limite de Confiança (+95%)
Média	2,24	0,014	2,18	2,30
1- pH (L)*	-1,64	0,016	-1,71	-1,57
2- Temperatura (L)*	-0,57	0,016	-0,64	-0,50
3- Agitação (L)*	0,13	0,016	0,06	0,20
1 x 2*	0,250	0,016	0,18	0,32
1 x 3	0,00	0,016	-0,07	0,07
2 x 3*	-0,30	0,016	-0,36	0,23

* Parâmetros estatisticamente significativos
(L) Parâmetro linear

A validade do modelo foi então verificada pela Análise de Variância (Anova) apresentada na Tabela II 11. O coeficiente de correlação obtido foi de 0,95. O valor do teste F calculado foi comparado ao valor do F tabelado para a distribuição de F a 95% de nível de confiança com os respectivos graus de liberdade. O F calculado para a produção de protease pela linhagem B26 foi de 3,52 vezes maior que o F tabelado, indicando que o modelo de primeira ordem é estatisticamente significativo e preditivo e descreve as respostas em função das variáveis analisadas.

Tabela II 11. Análise de variância no estudo do efeito das variáveis independentes (pH, temperatura e agitação dos frascos) na produção de protease pela linhagem B26

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Teste Fcal
Regressão	25,49	5	5,097	17,79
Resíduos	1,43	5	0,287	
Falta de Ajuste	1,43	3	0,476	
Erro Puro	0	2	0,002	
Total	26,92	10		

Coefficiente de correlação: R^2 : 0,95

$F_{tab\ 0,95;5;5} = 5,05$

$F_{cal}/F_{tab} = 3,52$

Os coeficientes de regressão não estatisticamente significativos a 95% de nível de confiança foram excluídos do modelo, sendo incorporados no resíduo total. A partir da validação dos parâmetros de estudo, obteve-se o modelo linear que representa o comportamento da atividade enzimática e que descreve as superfícies de resposta e curvas de contorno (Figura II 4) da produção de protease pela linhagem B26 (Equação 2).

Equação 2:

Atividade de protease = 2,24 - 1,64 . pH (L) - 0,57 . temperatura (L) + 0,13 . agitação (L) + 0,25 pH (L) . temperatura (L) - 0,30 temperatura (L) . agitação (L).

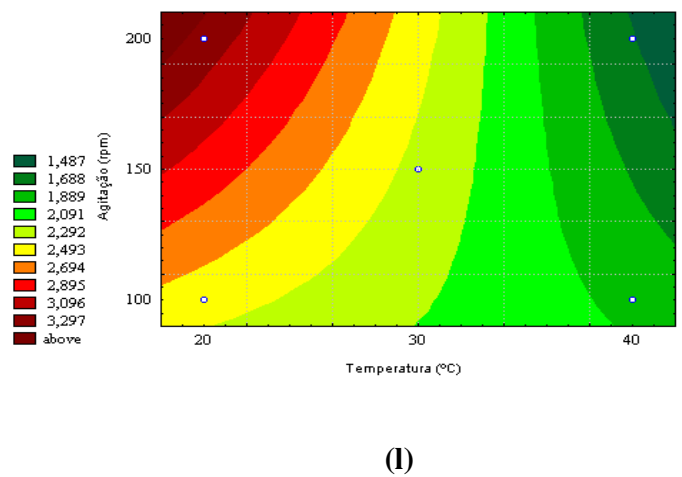
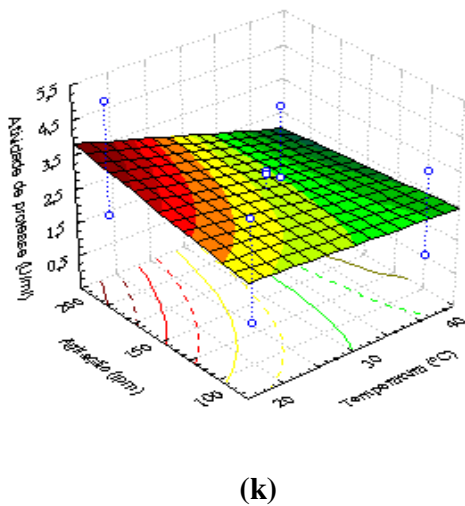
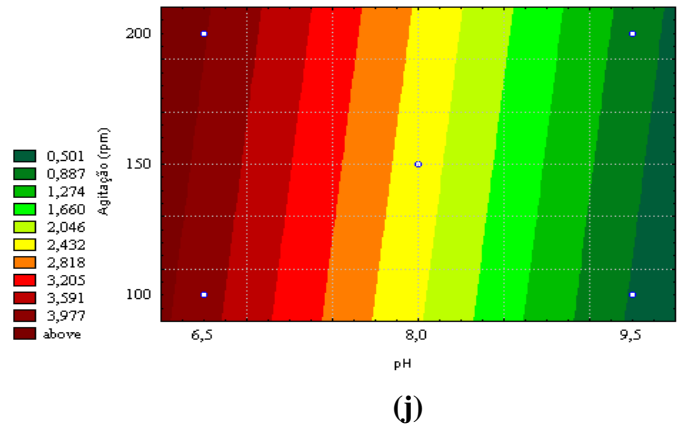
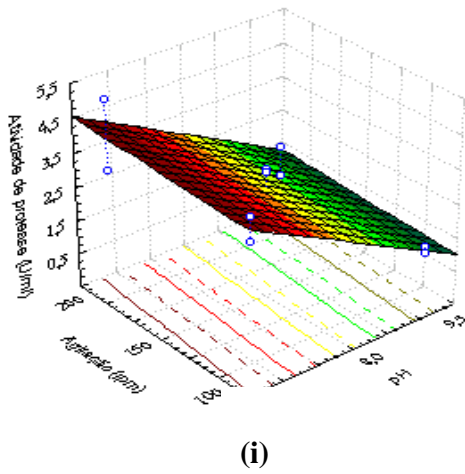
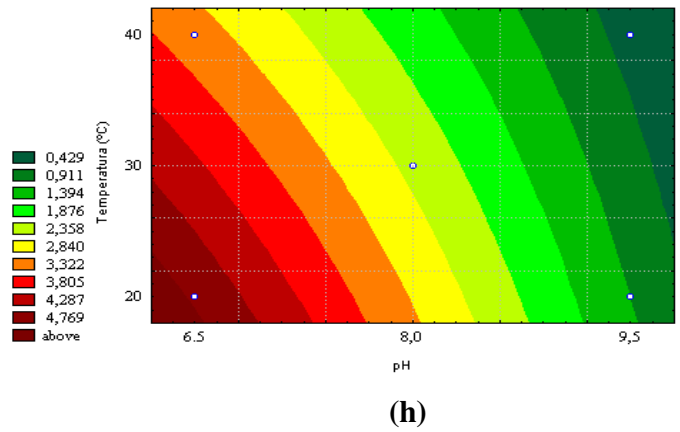
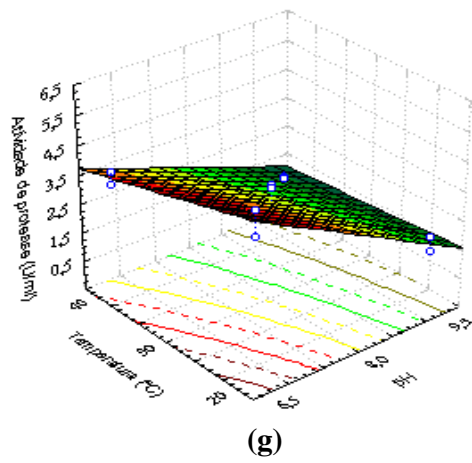


Figura II 4. Superfícies de resposta e curvas de contorno obtidas no planejamento experimental fatorial para a produção de protease pela linhagem B26 como resposta para: (g) e (h) pH e temperatura; (i) e (j) pH e agitação e (k) e (l) temperatura e agitação

A Tabela II 12 mostra o planejamento fatorial para a produção de protease pela linhagem *Cellulosimicrobium cellulans* 191, com seus valores reais e codificados para cada ensaio, assim como a variável dependente: atividade de protease lítica (U/mL).

Tabela II 12. Estudo do efeito do pH, temperatura e agitação na produção de protease pela linhagem *C. cellulans* 191, em diferentes tempos de fermentação, em frascos agitados

Ensaio	pH	Temperatura (°C)	Agitação (rpm)	Tempo de Fermentação		
				24h	30h	36h
				Atividade de protease (U/mL)		
1	-1 (6,5)	-1 (20)	-1 (100)	3,68	4,04	3,57
2	1 (9,5)	-1 (20)	-1 (100)	0,55	0,40	0,63
3	-1 (6,5)	1 (40)	-1 (100)	2,60	3,98	3,21
4	1 (9,5)	1 (40)	-1 (100)	0,00	0,14	0,00
5	-1 (6,5)	-1 (20)	1 (200)	3,06	4,25	3,29
6	1 (9,5)	-1 (20)	1 (200)	0,15	0,17	0,21
7	-1 (6,5)	1 (40)	1 (200)	3,00	3,33	2,04
8	1 (9,5)	1 (40)	1 (200)	0,03	0,19	0,00
9	0 (8,0)	0 (30)	0 (150)	2,75	2,96	2,3
10	0 (8,0)	0 (30)	0 (150)	3,01	2,77	2,36
11	0 (8,0)	0 (30)	0 (150)	2,64	2,74	2,65

A Figura II 5 mostra a produção de protease pela linhagem *C. cellulans* 191 após 24, 30 e 36 h de fermentação, nos ensaios realizados de acordo com o planejamento experimental fatorial.

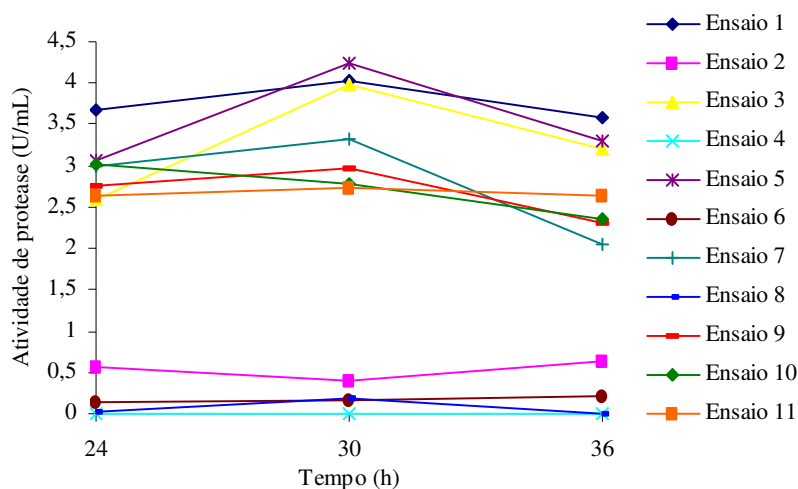


Figura II 5. Produção de protease pela linhagem *C. cellulans* 191 após 24, 30 e 36h de fermentação, nos ensaios realizados de acordo com o planejamento experimental fatorial

A análise estatística foi realizada com os valores de atividade enzimática obtidos após 30 h de fermentação, onde se obteve a maior atividade de protease da linhagem 191 (ensaio 5) (Tabela II 12 e Figura II 5).

Analisando os valores de atividade obtidos na Tabela II 12 e Figura II 5 após 30 h de fermentação, verifica-se um incremento na atividade de protease ao longo do planejamento, variando de atividade de 0,14 U/mL para o ensaio 4 (pH 9,5, 40°C e 100) até 4,25 U/mL de protease para o ensaio 5 (pH 6,5, 20°C e 200 rpm). Foi detectada 0,13 U/mL de β -1,3 glucanase e não foi detectada atividade de quitinase no sobrenadante do meio de cultura do extrato enzimático da linhagem *C. cellulans* 191, do ensaio 5, após 30 h de fermentação.

No estudo de produção de proteases pelas linhagens B26 e *Cellulosimicrobium cellulans* 191, os planejamentos experimentais realizados permitiram a visualização de incrementos na atividade enzimática utilizando diferentes combinações de pH, temperatura e agitação, em frascos agitados.

A Tabela II 13 apresenta o efeito das variáveis (pH, temperatura e agitação) sobre a produção de protease pela linhagem *C. cellulans* 191. O pH foi o único parâmetro estudado que exerceu algum efeito estatisticamente significativo sob a produção enzimática. O efeito do pH foi negativo. Os parâmetros temperatura, agitação dos frascos e as interações de todas as variáveis independentes não apresentaram efeito estatisticamente significativo na produção de protease pela linhagem 191. Dessa forma verificou-se que as condições para se obter maior produção de protease pela linhagem 191, dentre os valores estudados, são: valores de pH abaixo de 9,5. As condições de temperatura e a agitação, respectivamente, 30°C e 150 rpm, foram mantidas iguais às condições originais de fermentação.

Tabela II 13. Estimativa dos efeitos das variáveis independentes (pH, temperatura e agitação) na produção de protease pela linhagem *C. cellulans* 191

Parâmetros	Efeito (U/mL)	Desvio Padrão	t (2)	p	Limite de Confiança (-95%)	Limite de Confiança (+95%)
Média	2,27	0,036	63,11	0,0003	2,12	2,42
1- pH (L)*	-3,68	0,084	-43,56	0,0005	-4,04	-3,31
2- Temperatura (L)	-0,31	0,084	-3,62	0,0687	-0,67	0,06
3- Agitação (L)	-0,16	0,084	-1,84	0,2076	-0,52	0,21
1 x 2	0,19	0,084	2,19	0,1596	-0,18	0,55
1 x 3	0,07	0,084	0,77	0,5216	-0,30	0,43
2 x 3	-0,15	0,084	-1,72	0,2278	-0,51	0,22

* Parâmetros estatisticamente significativos
(L) Parâmetro linear

A Tabela II 14 apresenta os coeficientes de regressão, desvios padrões e limites de confiança para a atividade de protease da linhagem 191.

Tabela II 14. Resultados do coeficiente de regressão, desvio padrão e limites de confiança no estudo do efeito das variáveis independentes (pH, temperatura e agitação) na produção de protease pela linhagem *C. cellulans* 191

Parâmetros	Coeficiente de Regressão	Desvio Padrão	Limite de Confiança (-95%)	Limite de Confiança (+95%)
Média	2,27	0,036	2,12	2,42
1- pH (L)*	-1,84	0,042	-2,02	-1,66
2- Temperatura (L)	-0,15	0,042	-0,33	0,03
3- Agitação (L)	-0,08	0,042	-0,26	0,10
1 x 2	0,09	0,042	-0,09	0,27
1 x 3	0,03	0,042	-0,15	0,21
2 x 3	-0,07	0,042	-0,25	0,11

* Parâmetros estatisticamente significativos
(L) Parâmetro linear

A validade do modelo foi então verificada pela Análise de Variância (Anova) apresentada na Tabela II 15. O coeficiente de correlação obtido foi de 0,94. O valor do teste F calculado foi comparado ao valor do F tabelado para a distribuição de F a 95% de nível de confiança com os respectivos graus de liberdade. O F calculado para a produção de protease pela linhagem 191 foi de 26,38 vezes maior que o F tabelado, indicando que o modelo de primeira ordem é estatisticamente significativo e preditivo e descreve as respostas em função das variáveis analisadas.

Tabela II 15. Análise de variância no estudo do efeito das variáveis independentes (pH, temperatura e agitação) na produção de protease pela linhagem *C. cellulans* 191

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Teste Fcal
Regressão	27,011	1	27,011	134,54
Resíduos	1,807	9	0,201	
Falta de Ajuste	1,778	7	0,254	
Erro Puro	0,028	2	0,014	
Total	28,818	10		

Coeficiente de correlação: R^2 : 0,94

F_{tab 0,95;1;9} = 5,12

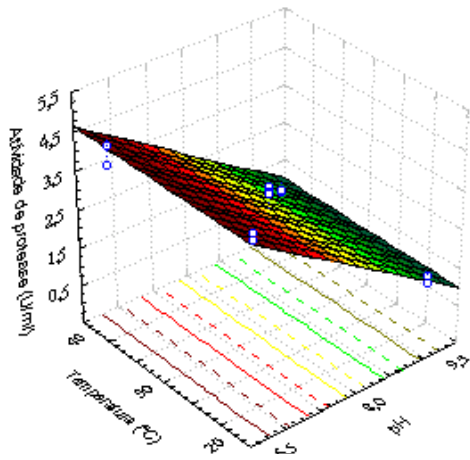
F_{cal}/F_{tab} = 26,38

Os coeficientes de regressão não estatisticamente significativos a 95% de nível de confiança foram excluídos do modelo, sendo incorporados no resíduo total. A partir da validação dos parâmetros de estudo, obteve-se o modelo linear que representa o

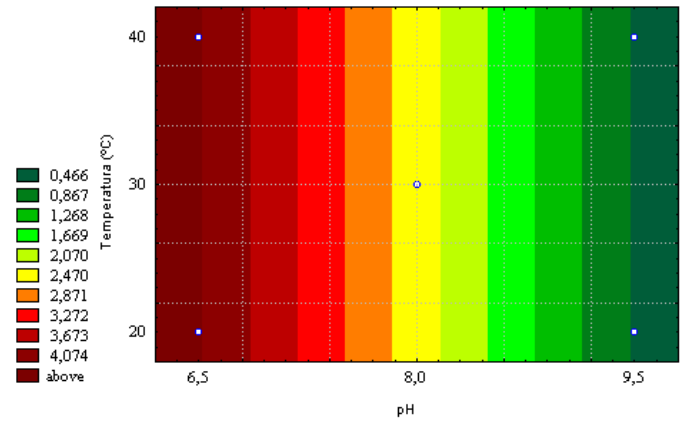
comportamento da atividade enzimática e que descreve as superfícies de resposta e curvas de contorno (Figura II 6) da atividade de protease da linhagem *C. cellulans* 191 (Equação 3).

Equação 3:

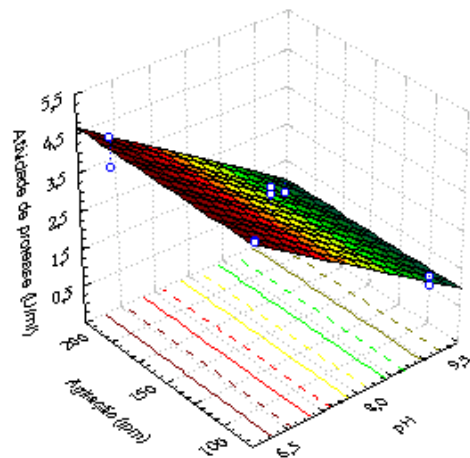
$$\text{Atividade de protease} = 2,27 - 1,84 \cdot \text{pH (L)}.$$



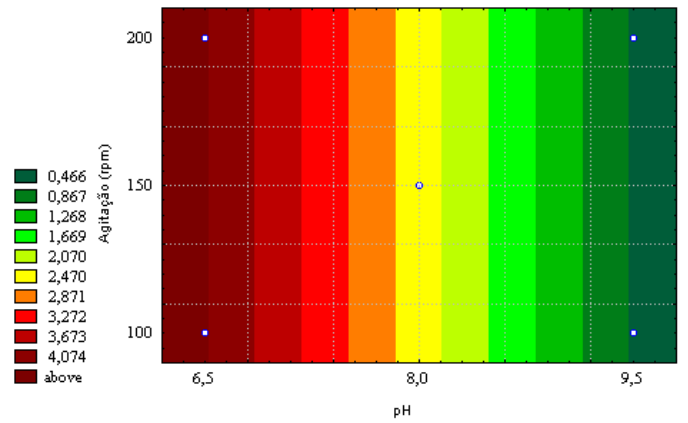
(m)



(n)



(o)



(p)

Figura II 6. Superfícies de resposta e curvas de contorno obtidas no planejamento experimental fatorial para a produção de protease pela linhagem *C. cellulans* 191 como resposta para: (m) e (n) pH e temperatura e (o) e (p) pH e agitação

Estudo da produção de quitinase pela linhagem *C. cellulans* 191

Foi realizado um planejamento fatorial para avaliar as variáveis independentes pH, temperatura e agitação na produção de quitinase pela linhagem *C. cellulans* 191.

A Tabela II 16 mostra o planejamento fatorial para a produção de quitinase pela linhagem 191, com seus valores reais e codificados para cada ensaio, assim como a variável dependente: atividade de quitinase (U/mL).

Tabela II 16. Estudo do efeito do pH, temperatura e agitação na produção de quitinase pela linhagem *C. cellulans* 191, em diferentes tempos de fermentação, em frascos agitados

Ensaio	pH	Temperatura (°C)	Agitação (rpm)	Tempo de Fermentação		
				72h	96h	120h
				Atividade de quitinase (U/ml)		
1	-1 (5,5)	-1 (25)	-1 (100)	0,37	0,84	0,96
2	1 (7,5)	-1 (25)	-1 (100)	0,70	0,98	0,97
3	-1 (5,5)	1 (35)	-1 (100)	0,19	0,51	0,59
4	1 (7,5)	1 (35)	-1 (100)	0,44	0,82	0,60
5	-1 (5,5)	-1 (25)	1 (200)	7,06	6,52	2,70
6	1 (7,5)	-1 (25)	1 (200)	5,88	5,61	5,40
7	-1 (5,5)	1 (35)	1 (200)	4,45	3,97	0,72
8	1 (7,5)	1 (35)	1 (200)	1,55	0,53	0,07
9	0 (6,5)	0 (30)	0 (150)	2,47	2,92	0,87
10	0 (6,5)	0 (30)	0 (150)	2,46	2,94	0,85
11	0 (6,5)	0 (30)	0 (150)	2,49	2,93	0,83

A Figura II 7 ilustra a atividade de quitinase da linhagem *C. cellulans* 191 após 72, 96 e 120 h de fermentação, nos ensaios realizados de acordo com o planejamento experimental fatorial.

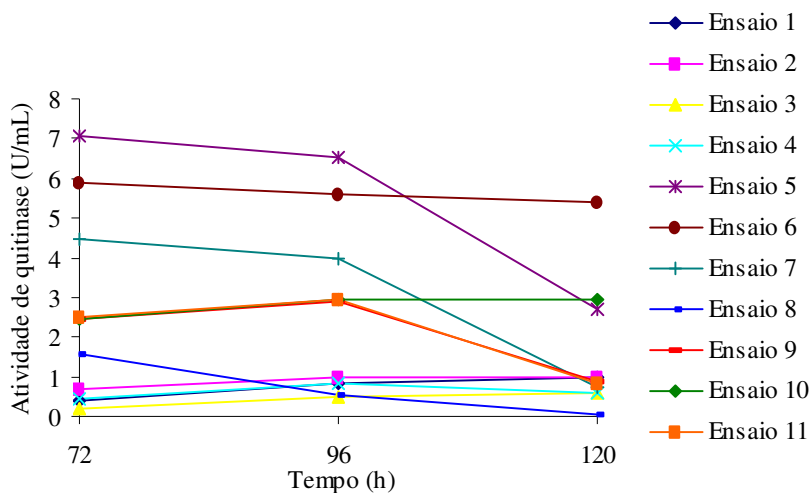


Figura II 7. Produção de quitinase pela linhagem *C. cellulans* 191 após 72, 96 e 120 h de fermentação, nos ensaios realizados de acordo com o planejamento experimental fatorial

A análise estatística foi realizada com os valores de atividade enzimática obtidos após 72 h de fermentação, onde se encontra o maior valor de quitinase (ensaio 5) (Tabela II 16 e Figura II 7).

Analisando os valores de atividade obtidos na Tabela II 16 e Figura II 7 após 72 h de fermentação, verifica-se um aumento na atividade de quitinase ao longo do planejamento, variando de 0,19 U/mL de quitinase para o ensaio 3 (pH 5,5, 35°C e 100 rpm) até 7,06 U/mL de quitinase para o ensaio 5 (pH 5,5, 25°C e 200 rpm). Foi detectada 0,11 U/mL de β -1,3 glucanase e 0,05 U/mL de protease no sobrenadante do meio de cultivo do extrato enzimático da linhagem 191, obtido no ensaio 5, após 72 h de fermentação.

A atividade de quitinase obtida pela fermentação da linhagem *C. cellulans* 191 em 100 mL de meio de cultivo C contendo 1,5 % de quitina neutralizada com pH inicial de 5,5, a 35°C e 100 rpm de agitação após 72 h de fermentação foi de 7,06 U/mL, indicando que foi obtido maior produção de quitinase quando comparada com o estudo realizado por Yamaguchi²⁰, em que foi obtido 4,03 U/mL utilizando a linhagem *C. cellulans* FXX e a mesma metodologia de determinação da atividade enzimática.

A Tabela II 17 apresenta o efeito das variáveis (pH, temperatura e agitação) sobre a produção de quitinase pela linhagem 191. O pH e a temperatura apresentaram efeitos negativos significativos na atividade enzimática; enquanto que a variável agitação dos frascos exerceu efeito positivo significativo. Todas as interações entre as variáveis independentes apresentaram efeito negativo estatisticamente significativo. A variável agitação dos frascos exerceu maior influência na produção enzimática, seguida da temperatura. O pH individualmente apresentou pouco efeito na resposta. Dessa forma verificou-se que as condições para se obter maior produção de quitinase pela linhagem 191, dentre os valores estudados, são: valores de pH abaixo de 7,5, temperaturas abaixo de 35°C e agitação dos frascos superior a 100 rpm. Para a continuidade do trabalho de produção de quitinase foram escolhidos as seguintes condições de produção de quitinase pela linhagem 191: pH 6,5, 25°C e 200 rpm para de agitação dos frascos.

Tabela II 17. Estimativa dos efeitos das variáveis independentes (pH, temperatura e agitação) na produção de quitinase pela linhagem *C. cellulans* 191

Parâmetros	Efeito (U/ml)	Desvio Padrão	t (2)	p	Limite de Confiança (-95%)	Limite de Confiança (+95%)
Média	2,55	0,005	553,86	0,000003	2,53	2,57
1- pH (L)*	-0,88	0,011	-81,01	0,000152	-0,92	-0,83
2- Temperatura (L)*	-1,85	0,011	-170,81	0,000034	-1,89	-1,80
3- Agitação (L)*	4,31	0,011	399,03	0,000006	4,26	4,36
1 x 2*	-0,45	0,011	-41,66	0,000576	-0,50	-0,40
1 x 3*	-1,17	0,011	-107,86	0,000086	-1,21	-1,12
2 x 3*	-1,63	0,011	-150,45	0,000044	-1,67	-1,58

* Parâmetros estatisticamente significativos.

(L) Parâmetro linear

A Tabela II 18 apresenta os coeficientes de regressão, desvios padrões e limites de confiança para a produção de quitinase pela linhagem *C. cellulans* 191.

Tabela II 18. Resultados do coeficiente de regressão, desvio padrão e limites de confiança no estudo do efeito das variáveis independentes (pH, temperatura e agitação) na produção de quitinase pela linhagem *C. cellulans* 191

Parâmetros	Coefficiente de Regressão	Desvio Padrão	Limite de Confiança (-95%)	Limite de Confiança (+95%)
Média	2,55	0,005	2,53	2,57
1- pH (L)*	-0,44	0,005	-0,46	-0,41
2- Temperatura (L)*	-0,92	0,005	-0,95	-0,90
3- Agitação (L)*	2,16	0,005	2,13	2,18
1 x 2*	-0,23	0,005	-0,25	-0,20
1 x 3*	-0,58	0,005	-0,61	-0,56
2 x 3*	-0,81	0,005	-0,84	-0,79

* Parâmetros estatisticamente significativos.

(L) Parâmetro linear

A validade do modelo foi então verificada pela Análise de Variância (Anova) apresentada na Tabela II 19. O coeficiente de correlação obtido foi de 0,99. O valor do teste F calculado foi comparado ao valor do F tabelado para a distribuição de F a 95% de nível de confiança com os respectivos graus de liberdade. O F calculado para a produção de quitinase pela linhagem 191 foi de 16,13 vezes maior que o F tabelado, indicando que o modelo de primeira ordem é estatisticamente significativo e preditivo e descreve as respostas em função das variáveis analisadas.

Tabela II 19. Análise de variância no estudo do efeito das variáveis independentes (pH, temperatura e agitação) na produção de quitinase pela linhagem *C. cellulans* 191

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Teste Fcal
Regressão	53,89	6	8,98	99,39
Resíduos	0,36	4	0,09	
Falta de Ajuste	0,36	2	0,18	
Erro Puro	0,00	2	1	
Total	54,25	10		

Coefficiente de correlação: R^2 : 0,99

F_{tab 0,95;6;4} = 6,16

F_{cal}/F_{tab} = 16,13

A partir da validação dos parâmetros de estudo, obteve-se o modelo linear que representa o comportamento da atividade enzimática e que descreve as superfícies de resposta e curvas de contorno (Figura II 8) da atividade de quitinase (Equação 4).

Equação 4:

$$\text{Atividade de quitinase} = 2,55 - 0,44 \cdot \text{pH (L)} - 0,92 \cdot \text{temperatura (L)} + 2,16 \cdot \text{agitação (L)} - 0,23 \cdot \text{pH (L)} \cdot \text{temperatura (L)} - 0,58 \cdot \text{pH (L)} \cdot \text{agitação (L)} - 0,81 \cdot \text{temperatura (L)} \cdot \text{agitação (L)}.$$

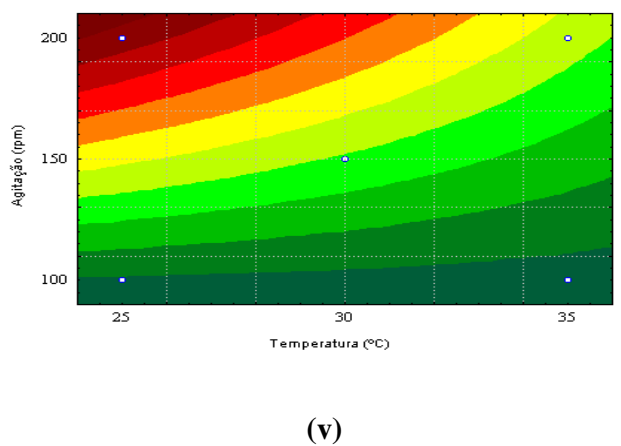
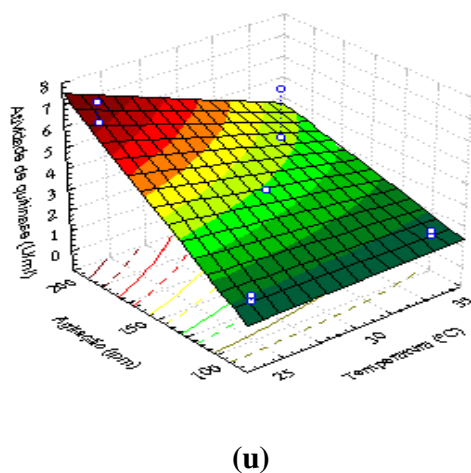
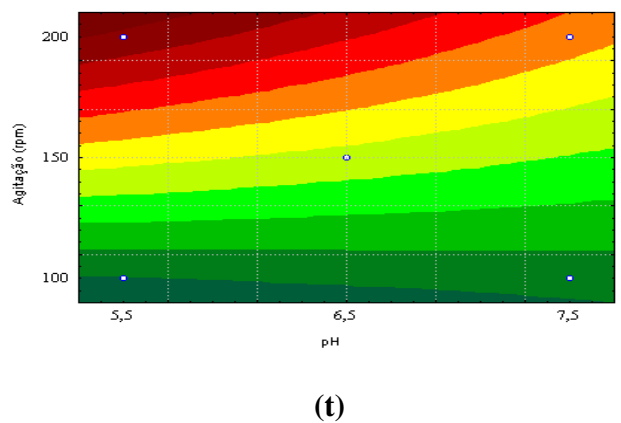
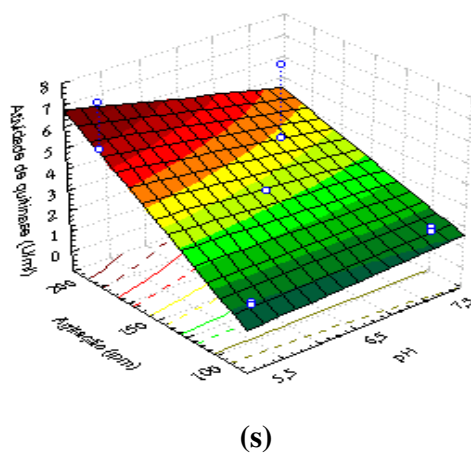
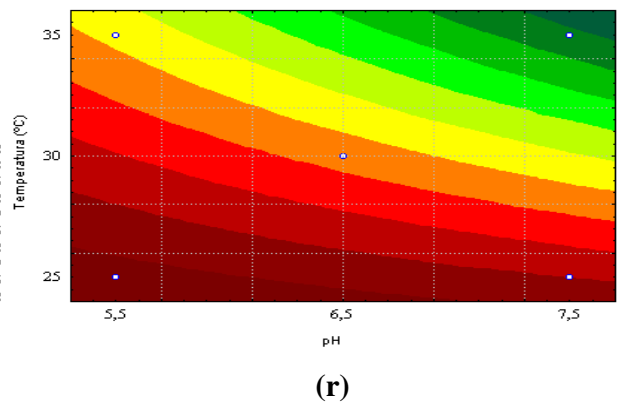
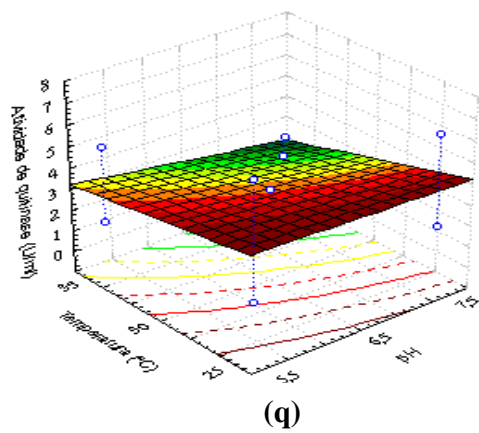


Figura II 8. Superfícies de resposta e curvas de contorno obtidas no planejamento experimental fatorial para a produção de quitinase pela linhagem *C. cellulans 191* como resposta para: (q) e (r) pH e temperatura; (s) e (t) pH e agitação e (u) e (v) temperatura e agitação

CONCLUSÕES

No planejamento fatorial para a análise das variáveis independentes (pH, temperatura e agitação) na produção de β -1,3 glucanase pela linhagem *C. cellulans* 191, em meio de cultivo A contendo 1 % de parede celular de levedura, em frascos agitados, foi observado que valores de pH acima de 6,5 e agitação dos frascos superior a 100 rpm são as melhores condições para a produção da enzima, dentre os valores estabelecidos. A temperatura na faixa estudada não influenciou a produção da enzima. Para a produção de β -1,3 glucanase pela linhagem *C. cellulans* 191 pode ser utilizado meio de cultivo A composto por 2,0 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,2 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 10 g/L de parede celular de levedura em tampão fosfato 0,2 M, pH 7,5; temperatura de 30°C e 200 rpm para a agitação dos frascos. Em estudo paralelo para a produção de β -1,3 glucanase pela linhagem 191 com frascos aletados em tampão fosfato 0,2M, pH 7,5, 30°C e 200 rpm de agitação foi obtido 1,14 U/mL de β -1,3 glucanase e não foi detectada atividade de protease e quitinase após 24 h de fermentação.

No planejamento fatorial para a análise das variáveis independentes (pH, temperatura e agitação) na produção de protease pela linhagem B26, em meio de cultivo B contendo 8 % de levedura seca, em frascos agitados, foi verificado que valores de pH abaixo de 9,5, temperaturas abaixo de 40°C e agitação dos frascos superior a 100 rpm são as melhores condições para a produção da enzima, dentre os valores estabelecidos. Para a produção de protease pela linhagem B26 pode ser utilizado meio de cultivo B composto por 2,0 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,2 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 80 g/L de levedura seca utilizada como indutor em tampão fosfato 0,15 M, pH 6,5; temperatura de 25°C e agitação de 150 rpm.

No planejamento fatorial para a análise das variáveis independentes (pH, temperatura e agitação) na produção de protease pela linhagem *C. cellulans* 191, em meio de cultivo B contendo 8 % de levedura seca, em frascos agitados, foi verificado que somente o pH influenciou positivamente a produção da enzima. Valores de pH abaixo de 9,5 são as melhores condições para a produção de protease pela linhagem *C. cellulans* 191. Para a produção de protease pela linhagem *C. cellulans* 191 pode ser utilizado meio de cultivo B composto por 2,0 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,2 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 80 g/L de

levedura seca utilizada como indutor em tampão fosfato 0,15 M, pH 6,5; temperatura de 30°C e agitação de 150 rpm.

No planejamento fatorial para a análise das variáveis independentes (pH, temperatura e agitação) na produção de quitinase pela linhagem *C. cellulans* 191, em meio de cultivo C contendo 1,5 % de quitina neutralizada, em frascos agitados, foi verificado que valores de pH abaixo de 7,5, temperaturas abaixo de 35°C e agitação dos frascos superior a 100 rpm são as melhores condições para a produção da enzima. Para a produção de quitinase pela linhagem *C. cellulans* 191 pode ser utilizado meio de cultivo C composto por 4,0 g/L de extrato de levedura; 2,0 g/L de triptona; 4,0 g/L de MgSO₄.7H₂O; 1,2 g/L de KH₂PO₄; 2,8 g/L de K₂HPO₄ e 15 g/L de quitina neutralizada utilizada como indutor, pH 6,5; 25°C e 200 rpm.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. 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*. *Biotechnol. Bioeng.* v. 30, p. 628, 1987.
2. Andrews, B. A.; Asenjo, J. A. Enzymatic lysis and disruption of microbial cells. *Tibtech.* v. 5, p. 273, 1987.
3. Sahai, A. S.; Manocha, M. S. Chitinase of fungi and plants: their involvement in morphogenesis and host-parasite interactions. *Microbiol. Rev.* v. 11, p. 317, 1993.
4. Selitrenikoff, C. P. *Appl. Env. Microbiol.* v. 67, p. 2883, 2001.
5. Théodore, K.; Panda, T. Application of response surface methodology to evaluate the influence of temperature and initial pH on the production of β -1,3-glucanase and carboxymethylcellulase from *Trichoderma harzianum*. *Enzyme Microb. Tech.* v. 17, n. 12, p. 1043, 1995.
6. Soares, G. A. M. Enzimas que lisam a parede celular de leveduras – Clonagem e sequenciamento do gene da β -1,3 glucanase lítica de *Cellulomonas cartae* 191. *Tese de Doutorado* - FEA - Universidade Estadual de Campinas, Brasil, 2002, p. 113.
7. Santos, L. F. Produção, purificação, caracterização e estudo da aplicação de uma protease alcalina produzida por *Cellulosimicrobium cellulans* 191. *Tese de Doutorado* - FEA - Universidade Estadual de Campinas, Brasil, 2004, 97 p.
8. Adinarayana, K.; Ellaine, P. Response surface optimization of the critical medium components for the production of alkaline protease by a newly isolated *Bacillus* sp. *J. Pharm. Pharm. Sci.* v. 5, p. 272, 2002.
9. Vaidya, R.; Vyas, P.; Chhatpar, H. S. Statistical optimization of medium components for the production of chitinase by *Alcaligenes xylosoxydans*. *Enzyme Microb. Tech.* v. 33, p. 92, 2003.
10. He, G. Q.; Tang, X. J.; Mukhtar, A. M.; Chen Q. H. Optimization of cultural conditions for thermostable beta-1,3-1,4-glucanase production by *Bacillus subtilis* ZJF-1A5. *J. Zhejiang. Univ. Sci.* v. 4, p. 719, 2003.

11. Tang, X. J.; He., G. Q.; Chen Q. H.; Zhang, X. Y.; Ali, A. M. Medium optimization for the production of thermal stable beta-glucanase by *Bacillus subtilis* ZJF-1A5 using response surface methodology. *Bioresource Technol.* v. 93, n. 2, p. 175, 2004.
12. Beshay, U.; El-Enshasy, H.; Ismail, I. M. K.; Moawad, H.; Ewa, W.; Abd-El-Ghany, S. β -Glucanase production from genetically modified recombinant *Escherichia coli*: Effect of growth substrates and development of a culture medium in shake flasks and stirred tank bioreactor. *Process Biochem.* v. 39, p. 307, 2003.
13. Fleuri, L. F; Sato, H. H. Produção, purificação, clonagem e aplicação de enzimas líticas. *Quim. Nova.* v. 28, n. 5, p. 871, 2005.
14. Scott, J. H.; Schekman, R. Lyticase: endoglucanase and protease activities that act together in yeast cell lysis. *J. Bacteriol.* v. 142, n. 2, p. 414, 1980.
15. Patil, R. S.; Ghormade, V.; Deshpande, M. V. Review: Chitinolytic enzymes: an exploration. *Enzyme Microb. Technol.* v. 26, p. 473, 2000.
16. Ferro, L. A. Produção, Purificação e Caracterização da enzima β -1,3 glucanase de *Cellulomonas cellulans* YLM-B191-1 e ação da enzima na parede celular de leveduras. *Tese de Doutorado* - FEA - Universidade Estadual de Campinas, Brasil, 2002, p. 175.
17. Yamamoto, N.; Sato, S.; Miki, H.; Park, Y.; Tadenuma, M. Taxonomic studies on yeast-lysing bacteria, and a new species *Rarobacter incanus* *J. Gen. Appl. Microbiol.* v. 39, p. 261, 1993.
18. Neto, B. D. B.; Scarminio, I. S.; Bruns, R. E. *Em Como fazer experimentos: planejamento e otimização de experimentos*; ed. Unicamp, 2001, p. 401.
19. Statistica[®] 5.0 from Statsoft Inc. (2325 East 13 th Street, Tulsa, OK, 74104, USA).
20. Yamaguchi, M. M. Seleção, produção e caracterização da enzima quitinase. *Tese de Doutorado* - FEA - Universidade Estadual de Campinas, Brasil, 2003, 83 p.
21. Saeki, K.; Iwata, J.; Yamazaki, S.; Watanabe, Y.; Tamai, Y. Purification and characterization of a yeast lytic β -1,3-glucanase from *Oerskovia xanthineolytica* TK-1. *J. Ferment. Bioeng.* v. 78, p. 407, 1994.
22. Santos, L. F. Caracterização bioquímica da protease lítica produzida por *Cellulomonas cartae* n^o 191 e estudo da lise enzimática de leveduras. *Dissertação de Mestrado* - FEA - Universidade Estadual de Campinas, Brasil, 2000, p. 71.
23. Somogyi, N. A new reagent for the determination of sugars. *J. Biol. Chem.* v. 195, p.

- 19, 1952.
24. Obata, T.; Iwata, H.; Namba, Y. The synergistic effects among β -1,3 glucanase from *Oerskovia* sp CK. on lysis of viable yeast cell. *Agr. Biol. Chem.* v. 41, p. 2387, 1977.
 25. Rowley, B. I.; Bull, A. T. Isolation of a yeast-lysing *Arthrobacter* species and the production of the lytic enzyme complex in batch and continuous-flow fermentors. *Biotechnol. Bioeng.* v. 19, p. 879, 1977.
 26. Réissig, J. L.; Strominger, J. L.; Leloir, L. F. A modified colorimetric method for the estimation of N-acetylamino sugar. *J. Biol. Chem.* v. 217, p. 959, 1955.
 27. Sandhu, D. K.; Wadhwa, V.; Bagga, P. S. Use of lytic enzymes for protoplast production in *Trichoderma reesei* QM9414. *Enzyme Microb. Tech.* v. 11, p. 21, 1989.

CAPÍTULO III: ESTUDO DA PRODUÇÃO DE β -1,3 GLUCANASES, PROTEASES E QUITINASES PELA LINHAGEM *Cellulosimicrobium cellulans* 191, EM FERMENTADOR DE 5L

RESUMO

O presente trabalho visou o estudo da produção de β -1,3 glucanases, proteases e quitinases pela linhagem *Cellulosimicrobium cellulans* 191 em fermentador de 5 L. Na fermentação do microrganismo em fermentador de 5 L foi obtido maior produção de β -1,3 glucanases (0,72 U/mL) após 24 h de fermentação a 30°C em meio de cultivo A utilizando-se aeração de 3 vvm, sendo que usando aeração de 1,5 vvm foi obtido 0,32 U/mL de β -1,3 glucanases após 24 h de fermentação a 30°C. Na fermentação do microrganismo em fermentador de 5 L foram obtidos dois picos de produção de proteases após 6 h (4,89 U/mL) e 33 h (6,14 U/mL) de fermentação a 30°C em meio de cultivo B utilizando-se aeração de 3,0 vvm, sendo que usando aeração de 1,5 vvm foi obtido 1,87 U/mL e 2,34 U/mL de proteases após 6 h e 30 h de fermentação a 30°C, respectivamente. Na fermentação do microrganismo em fermentador de 5 L foi obtido maior produção de quitinases (4,38 U/mL) após 144 h de fermentação a 25°C em meio de cultivo C utilizando-se aeração de 3 vvm, sendo que usando aeração de 1,5 vvm foi obtido 4,19 U/mL de quitinases após 168 h de fermentação a 25°C.

SUMMARY

The aim of this work was to study the production of β -1,3 glucanases, proteases and chitinases by *Cellulosimicrobium cellulans* strain 191 in a 5 L fermenter. In the 5 L fermenter, the highest production of β -1,3 glucanases (0.72 U/mL) was obtained using culture medium A after 24 h of fermentation at 30°C with 3 vvm of aeration, whereas using 1.5 vvm, 0.32 U/mL of β -1,3 glucanases were obtained after 24 h of fermentation at 30°C. In the production of protease in the 5 L fermenter using culture medium B and 1.5 vvm, 2 peaks were obtained: 1.87 U/mL after 6 h and 2.34 U/mL after 30 h of fermentation at 30°C, whilst with 3 vvm, 4.89 U/mL and 6.14 U/mL of protease were obtained after 6 h and 33 h of fermentation at 30°C, respectively. In the 5 L fermenter, the highest production of chitinase (4.38 U/mL) was obtained in culture medium C after 144 h of fermentation at 25°C and 3 vvm, while using 1.5 vvm, 4.19 U/mL of chitinase were obtained after 168 h of fermentation at 25°C.

INTRODUÇÃO

No desenvolvimento de processos bioquímicos, quando são encontradas condições econômicas adequadas de operação em escala de bancada, que frequentemente correspondem à alta produtividade e ao alto rendimento do produto de interesse, há a necessidade de se ampliar a escala¹. Na escala de bancada, devido à flexibilidade e menor custo de operação, devem ser obtidos dados básicos sobre o processo. As etapas básicas se referem, em geral, à seleção do microrganismo, constituição do melhor meio de cultivo, pH, temperatura, agitação e tempo de fermentação.

As linhagens *Cellulosimicrobium cellulans* 191 e B1 foram selecionadas como melhor produtoras de β -1,3 glucanases em meio de cultivo otimizado contendo 1% de parede celular de levedura. As linhagens *C. cellulans* 191 e B26 foram selecionadas como melhores produtoras de proteases em meio de cultivo otimizado contendo 8% de levedura seca; enquanto que a linhagem *C. cellulans* 191 foi selecionada como melhor produtora de quitinase em meio de cultivo otimizado contendo 1,5% de quitina neutralizada^{2,3}. Em ensaios de bancada, as melhores condições de pH, temperatura e agitação para a produção das enzimas líticas, assim como as interações desses parâmetros, foram estudadas por meio de planejamentos experimentais⁴. A linhagem *C. cellulans* 191, que apresentou a maior produtividade das enzimas em diferentes meio de cultivo, foi selecionada para o estudo de produção de β -1,3 glucanases, proteases e quitinases em fermentador de 5 L.

Rowley e Bull⁵ estudaram a produção do complexo enzimático extracelular (β -1,3 glucanase, mananase, manohidrolase e atividade proteolítica) produzido pelo microrganismo *Arthrobacter*. A produção do complexo não foi somente dependente do crescimento celular, mas também foi influenciada pelo aumento do substrato limitante. A produção de protease e a atividade lítica foram estudadas em batelada e em meio de cultivo contendo leveduras como substrato limitante. A taxa de crescimento máximo específico de *Arthrobacter* nestas condições foi de $0,22 \text{ hr}^{-1}$. As atividades de β -1,3 glucanase e protease foram obtidas na fase de crescimento exponencial do microrganismo, mas o máximo da atividade lítica não foi desenvolvido até o declínio da taxa de crescimento específico.

Felse e Panda⁶ investigaram a influência da velocidade de agitação na produção de quitinases por *Trichoderma harzianum* em biorreator. O autores verificaram que 224 rpm

foi a melhor velocidade de agitação para o crescimento celular e produção de quitinases. O rendimento de quitinases diminuiu drasticamente com o aumento da agitação, enquanto que o rendimento celular diminuiu, porém não rapidamente. No mesmo ano, os autores relataram que o pH controlado em 4,9; aeração de 1,51 min/L e 224 rpm foi a melhor combinação desses parâmetros obtida, através de um novo método de otimização, para a produção de quitinases por *T. harzianum* em biorreator⁷.

O interesse na produção de quitinases microbianas têm aumentado expressivamente, devido ao seu grande potencial de aplicações em diversas áreas. Felse e Panda⁸ relataram os problemas e perspectivas envolvidas na produção de quitinases em larga escala, especialmente sobre os estudos com biorreatores e novos métodos de fermentação.

A produção de uma protease extracelular de *Bacillus subtilis* AS1 398 foi ampliada para um biorreator de 11,5 L, onde foram investigadas a influência da aeração, volume do meio de cultivo e o diâmetro do orifício do pulverizador. Após 32 h de fermentação foi observada uma atividade enzimática 9,0% maior que a média obtida em frascos agitados. Os autores atribuíram esse aumento ao volume de "ar extra" injetado no biorreator⁹.

Ferro¹⁰ estudou a produção de β -1,3 glucanase pela linhagem *Cellulosimicrobium cellulans* 191 em fermentador Bioflo II em meio de cultivo composto de 5,0 g/L de tripticase peptona; 3,0 g/L de extrato de levedura; 3,0 g/L de extrato de malte; 0,12 g/L de catalase; 5,8 g/L de KH_2PO_4 ; 1,15 g/L de $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ e 0,264 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Foi obtido 0,11 U/mL de β -1,3 glucanase após 24 h de fermentação a 30°C.

Beshai *et al.*¹¹ descreveram a produção de β -1,3 glucanase de *Bacillus* sp. utilizando uma linhagem de *Escherichia coli* recombinante. A produção máxima de β -1,3 glucanase ocorreu após 28 h de fermentação, utilizando um meio de cultivo otimizado composto por: 7,0 g/L de lactose; 24,0 g/L de extrato de levedura e 5,0 g/L de NaCl. A fermentação em batelada em fermentador de 3 L utilizando o meio de cultivo otimizado mostrou uma produção de β -1,3 glucanase 1,03 vezes menor.

Liu *et al.*¹² estudaram a produção de quitinase pelo microrganismo *Verticillium lecanii*. A atividade de quitinase em 200 mL de meio de cultivo otimizado, fermentado em frascos agitados a 150 rpm e 24°C, foi de 9,95 mU/L. O estudo em grande escala foi conduzido em biorreatores de 5 e 30 L. Em biorreator de 5 L foi obtido 18,2 mU/mL de quitinase sob condições ótimas de aeração (0,6 vvm), pH (4,0) e agitação (150 rpm). A

atividade de quitinase em biorreator de 30 L aumentou para 19,9 mU/L, com aeração de 0,9 vvm, pH 4,0 a 24°C. O estudo mostrou que o pH e a agitação foram as variáveis com os efeitos mais significativos na produção de quitinase, entretanto, a agitação e a aeração podem ter afetado a concentração de oxigênio dissolvido e influenciado o crescimento de *V. lecanii* e a produção da enzima.

Rao *et al.*¹³ estudaram a produção de protease pelo microrganismo *Beauveria bassiana* em frascos agitados e em fermentadores de 5 e 30 L em meio de cultivo composto por 0,72% de pó de casca de camarão; 0,60% de farinha de soja; 0,19% de sacarose e 0,68% de extrato de levedura. A produção de protease em fermentador de 5 L foi menor quando comparado com a produção de protease em frascos agitados e fermentador de 30 L.

Este trabalho visou o estudo da produção de β -1,3 glucanases, proteases e quitinases pela linhagem *Cellulosimicrobium cellulans* 191 em fermentador de 5 L.

MATERIAL E MÉTODOS

Estudo da produção de β -1,3 glucanases, proteases e quitinases pela linhagem *Cellulosimicrobium cellulans* 191 em fermentador New Brunswick de 5 L, em diferentes condições de aeração

A produção de β -1,3 glucanases pela linhagem *C. cellulans* 191 foi estudada em fermentador New Brunswick Bioflow II de capacidade 5 L, utilizando meio de cultivo A composto por 2,0 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,2 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 10 g/L de parede celular de levedura em tampão fosfato $0,2 \text{ M}^{14}$; com 1,5 e 3 vvm (volume de ar por volume de meio por minuto) de aeração. As condições de pH, temperatura e agitação para a produção de β -1,3 glucanases foram selecionadas por meio de planejamento experimental (Capítulo II), e foram respectivamente, 7,5; 30°C e 200 rpm.

A produção de proteases pela linhagem *C. cellulans* 191 foi estudada em fermentador de 5 L em meio de cultivo B composto por 2,0 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,2 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 80 g/L de levedura seca utilizada como indutor em tampão fosfato $0,15 \text{ M}^{15}$; com 1,5 e 3 vvm de aeração. As condições de pH, temperatura e agitação para a produção de proteases foram selecionadas por meio de planejamento experimental (Capítulo II), e foram respectivamente, 6,5; 30°C e 150 rpm.

A produção de quitinases pela linhagem *C. cellulans* 191 foi estudada em fermentador de 5 L em meio de cultivo C composto por 4,0 g/L de extrato de levedura; 2,0 g/L de triptona; 4,0 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 1,2 g/L de KH_2PO_4 ; 2,8 g/L de K_2HPO_4 e 15 g/L de quitina neutralizada utilizada como indutor¹⁶; com 1,5 e 3 vvm de aeração. As condições de pH, temperatura e agitação para a produção de quitinases foram selecionadas por meio de planejamento experimental (Capítulo II), e foram respectivamente, 6,5; 25°C e 200 rpm.

As amostras foram coletadas em diferentes tempos de fermentação. As atividades de β -1,3 glucanases, proteases e quitinases nos sobrenadantes dos meios de cultivo foram determinadas como descrito nos itens abaixo. A alteração do pH do meio de cultivo foi determinada com o auxílio de potenciômetro. O crescimento celular foi estimado indiretamente através da medida de absorbância a 660 nm.

Determinação da atividade de β -1,3 glucanase

A atividade de β -1,3 glucanase foi determinada como descrito por Saeki *et al.*¹⁷ e Santos¹⁸. A mistura de 250 μ L de solução enzimática e 250 μ L de solução 1,0% de laminarina em tampão acetato de sódio 0,1 M, pH 5,5 foi incubada a 55°C por 30 min. A reação foi interrompida por aquecimento a 100°C por 5 min. Os açúcares redutores foram determinados pelo método de Somogyi¹⁹ utilizando-se glicose como açúcar padrão. Para controle foram determinados os açúcares redutores presentes na solução enzimática utilizando-se água destilada no lugar da solução de laminarina. Para ajuste do espectrofotômetro foi preparado um tubo branco utilizando-se água destilada no lugar da solução de laminarina. Uma unidade de atividade foi definida como a liberação de um μ mol de glicose por minuto por mL de solução enzimática.

Determinação da atividade de protease lítica

A atividade de protease foi determinada utilizando-se caseína como substrato como descrito por Obata *et al.*²⁰ e Rowley e Bull²¹. A mistura de reação contendo 1,5 mL de solução 2,0% de caseína; 1,0 mL de tampão fosfato 0,15 M, pH 7,5 e 0,5 mL de solução enzimática foi incubada a 30°C por 30 min. A reação foi paralisada pela adição de 3,0 mL de solução 0,4 M de ácido tricloroacético (TCA), seguida de filtração em papel Whatman 42. A absorbância do filtrado foi determinada a 280 nm, sendo uma unidade de atividade definida como aquela capaz de aumentar em uma unidade a absorbância do filtrado, nas condições do ensaio. Foi preparado um tubo branco para cada amostra, com a adição de TCA antes da adição da enzima.

Determinação da atividade de quitinase

A atividade de quitinase foi determinada baseada no método usando quitina coloidal^{21,22}, de acordo com a metodologia otimizada por Yamaguchi¹⁶. A quitina coloidal foi preparada como descrito por Fleuri². A mistura de 0,5 mL de solução enzimática e 0,5 mL de suspensão de quitina coloidal 0,2% em tampão citrato de sódio 0,1 M, pH 6,0 foi

incubada durante 60 min a 45°C. A mistura de reação foi resfriada em banho de gelo e centrifugada a 8.232 g por 10 min a 5°C. A mistura de 1,0 mL do sobrenadante e 50 µL de borato de potássio 0,8 M foi aquecida em banho em ebulição por 3 min e resfriada em banho de gelo. Em seguida foi adicionado 1,5 mL de solução 10% de dimetilaminobenzaldeído em ácido acético contendo 12,5% de HCl 10 N. A mistura foi incubada em banho-maria a 37°C durante 20 min e a absorbância foi determinada a 585 nm. Para a preparação do tubo branco foi utilizada solução enzimática inativada através de aquecimento durante 5 min em banho em ebulição. Uma unidade de atividade foi definida como 1 µmoL de N-acetilglicosamina formado nas condições de ensaio.

Todos os testes para a determinação das atividades enzimáticas foram realizados em duplicatas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Estudo da produção de β -1,3 glucanases, proteases e quitinases pela linhagem *Cellulosimicrobium cellulans* 191 em Fermentador New Brunswick de 5 L, em diferentes condições de aeração

Estudo da produção de β -1,3 glucanases

A produção de β -1,3 glucanases pela linhagem *C. cellulans* 191 em meio de cultivo A contendo 1% de parede celular de levedura em tampão fosfato 0,2 M, pH 7,5, em fermentador de 5 L, foi estudada em diferentes tempos de fermentação; a 30°C, 200 rpm e 1,5 e 3 vvm de aeração.

Tabela III 1. Estudo da produção de β -1,3 glucanase pela linhagem *C. cellulans* 191, em fermentador de 5 L, em meio de cultivo A contendo 1% de parede celular de levedura em tampão fosfato 0,2 M, pH 7,5 a 30°C, 200 rpm e 1,5 vvm

Tempo de Fermentação (h)	U/mL de β -1,3 glucanase	U/mL de protease	U/mL de quitinase	pH	Massa celular [Absorbância (660 nm)]
0	0	0	0	7,29	0,438
3	0	0	0	7,26	0,687
6	0,01	0	0	7,18	0,936
9	0,01	0	0	7,12	1,443
24	0,34	0	0	7,03	1,976
31	0,29	0	0	7,01	2,024
48	0,06	0	0	7,05	1,533
72	0,06	0	0	7,20	1,076
96	0,15	0	0	7,30	0,81
103	0,14	0	0	7,41	0,61

A Tabela III 1 e a Figura III 1 ilustram que na fermentação da linhagem *C. cellulans* 191 em fermentador de 5 L em meio de cultivo A contendo 1% de parede celular de levedura em tampão fosfato 0,2 M, pH 7,5, a 30°C, 200 rpm e 1,5 vvm de aeração, a β -1,3 glucanase foi produzida majoritariamente após 24 h de fermentação, atingindo atividade máxima de 0,34 U/mL de β -1,3 glucanase. O sobrenadante do meio de cultivo obtido após 24 h de fermentação apresentou 0,34 U/mL de β -1,3 glucanase e não foi detectada atividade

de protease e quitinase. O pH do meio de cultivo não apresentou variação significativa durante a fermentação (Tabela III 1).

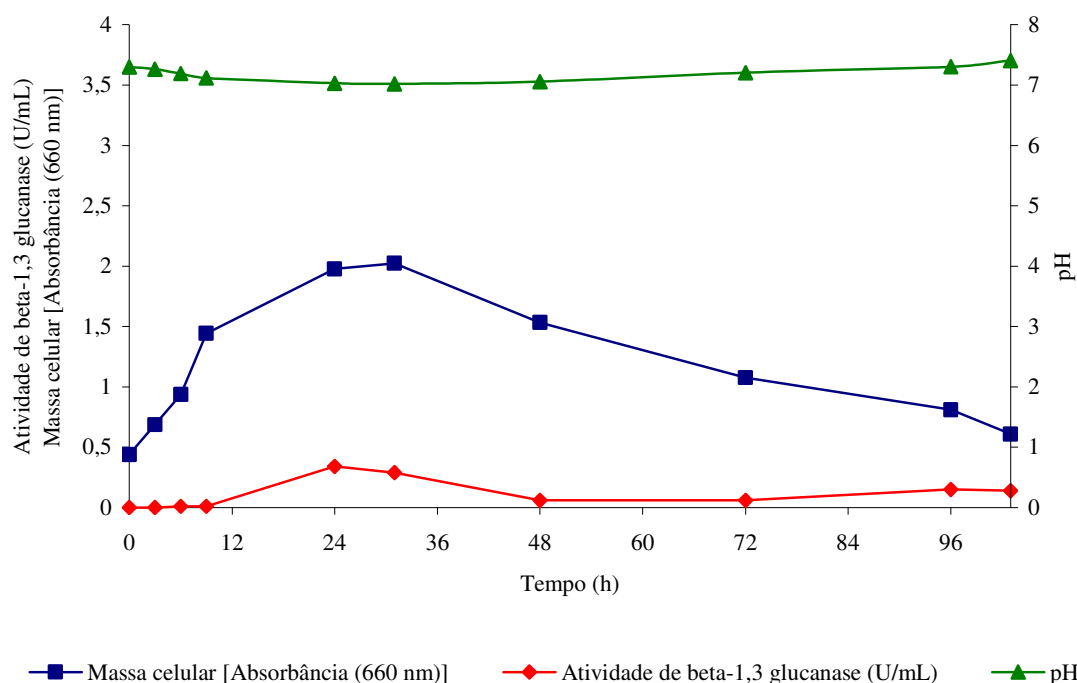


Figura III 1. Estudo da produção de β -1,3 glucanase pela linhagem *C. cellulans* 191, em fermentador de 5 L, em meio de cultivo A contendo 1% de parede celular de levedura em tampão fosfato 0,2 M, pH 7,5 a 30°C, 200 rpm e 1,5 vvm

A Tabela III 2 e a Figura III 2 ilustram que na fermentação da linhagem *C. cellulans* 191 em fermentador de 5 L em meio de cultivo A contendo 1% de parede celular de levedura em tampão fosfato 0,2 M, pH 7,5, a 30°C, 200 rpm e 3 vvm de aeração, a β -1,3 glucanase foi produzida no final da fase exponencial de crescimento atingindo atividade máxima de 0,72 U/mL de β -1,3 glucanase após 24 h de fermentação. O sobrenadante do meio de cultivo obtido após 24 h de fermentação apresentou 0,72 U/mL de β -1,3 glucanase e não foi detectada atividade de protease e quitinase (Tabela III 2). O pH do meio de cultivo não apresentou variação significativa durante a fermentação.

Tabela III 2. Estudo da produção de β -1,3 glucanase pela linhagem *C. cellulans* 191, em fermentador de 5 L, em meio de cultivo A contendo 1% de parede celular de levedura em tampão fosfato 0,2 M, pH 7,5 a 30°C, 200 rpm e 3,0 vvm

Tempo de Fermentação (h)	U/mL de β -1,3 glucanase	U/mL de protease	U/mL de quitinase	pH	Massa celular [Absorbância (660 nm)]
0	0	0	0	7,38	0,76
3	0,18	0	0	7,33	1,46
6	0,18	0	0	7,29	2,07
9	0,13	0	0	7,20	2,28
24	0,72	0	0	7,07	3,72
31	0,54	0	0	7,13	3,675
48	0,49	0	0	7,29	1,66
72	0,32	0	0	7,37	0,95
96	0,09	0	0	7,41	0,75
103	0,05	0	0	7,43	0,76

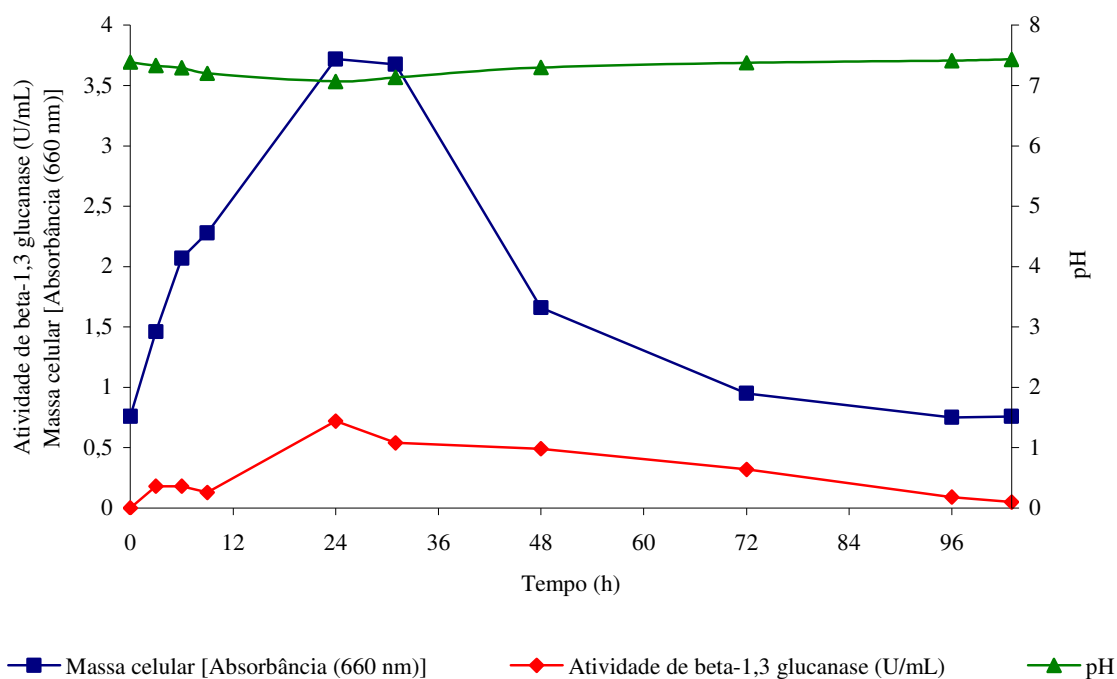


Figura III 2. Estudo da produção de β -1,3 glucanase pela linhagem *C. cellulans* 191, em fermentador de 5 L, em meio de cultivo A contendo 1% de parede celular de levedura em tampão fosfato 0,2 M, pH 7,5 a 30°C, 200 rpm e 3,0 vvm

Esses estudos indicam que o aumento da aeração de 1,5 vvm (Tabela III e Figura III 1) para 3 vvm (Tabela III 2 e Figura III 2) na produção de β -1,3 glucanase pela linhagem *C. cellulans* 191 em fermentador de 5 L em meio de cultivo A contendo 1% de parede celular de levedura em tampão fosfato pH 0,2 M, 7,5 a 30°C, 200 rpm, provoca um aumento de aproximadamente 2,12 vezes na atividade enzimática. No estudo com aeração de 1,5 vvm foi obtido 0,34 U/mL de β -1,3 glucanase após 24 h de fermentação do microrganismo *C. cellulans* 191, indicando uma produção aproximadamente 3,1 vezes maior que a obtida nos estudos descritos por Ferro¹⁰; enquanto que no estudo de produção com aeração de 3 vvm, foi obtida uma produção 5 vezes maior que a obtida por Ferro¹⁰.

A produção de β -1,3 glucanase de *Bacillus* sp. utilizando uma linhagem de *E. coli* recombinante foi 1,03 vezes menor em fermentador de 3 L, quando comparado com o estudo de produção da enzima em frascos agitados após 28 h de fermentação em meio de cultivo otimizado¹¹.

No estudo da produção de β -1,3 glucanase pela linhagem *C. Cellulans* 191 em frascos agitados, utilizando planejamento experimental, a maior atividade obtida foi de 0,64 U/mL após 24 h de fermentação, enquanto que a produção da enzima em frascos agitados aletados foi 1,14 U/mL após 24 h de fermentação. No presente estudo em fermentador de 5 L a 3 vvm, a produção de β -1,3 glucanase pela mesma linhagem utilizando o mesmo meio de cultivo foi de 0,72 U/mL após 24 h de fermentação; ou seja, uma produção 1,12 vezes maior em fermentador de 5 L do que em frascos agitados e 1,58 vezes menor em fermentador de 5 L do que em frascos agitados aletados.

Estudo da produção de protease

A produção de protease pela linhagem *C. cellulans* 191 em meio de cultivo B contendo 8% de levedura seca em tampão fosfato 0,15 M, pH 6,5, em fermentador de 5 L foi estudada em diferentes tempos de fermentação; a 30°C, 150 rpm e 1,5 e 3 vvm de aeração.

A Tabela III 3 e a Figura III 3 ilustram a produção de protease pela linhagem *C. cellulans* 191 em fermentador de 5 L em meio de cultivo B contendo 8% de levedura seca em tampão fosfato 0,15 M, pH 6,5 a 30°C, 150 rpm e 1,5 vvm de aeração. Foi detectado um

pico de atividade de protease na fase exponencial de crescimento atingindo atividade de 2,34 U/mL de protease após 6 h de fermentação. O segundo pico de protease foi verificado na fase estacionária de crescimento atingindo atividade máxima de 1,87 U/mL de protease após 30 h de fermentação. O pH do meio de cultivo variou de 6,33 no início da fermentação para 5,41 no final da fermentação (Tabela III 3).

Tabela III 3. Estudo da produção de protease pela linhagem *C. cellulans* 191, em fermentador de 5 L, em meio de cultivo B contendo 8% de parede celular de levedura em tampão fosfato 0,15 M, pH 6,5 a 30°C, 150 rpm e 1,5 vvm

Tempo de Fermentação (h)	U/mL de β -1,3 glucanase	U/mL de protease	U/mL de quitinase	pH	Massa celular [Absorbância (660 nm)]
0	0	0	0	6,33	0,364
3	0	0,02	0	6,18	0,386
6	0	2,34	0	6,16	0,8
9	0	1,70	0	6,07	1,233
24	0	1,29	0	5,82	1,581
27	0	0,96	0	5,81	1,662
30	0	1,87	0	5,76	1,53
33	0	1,76	0	5,75	1,535
48	0	0,06	0	5,65	0,615
72	0	0,06	0	5,41	0,62

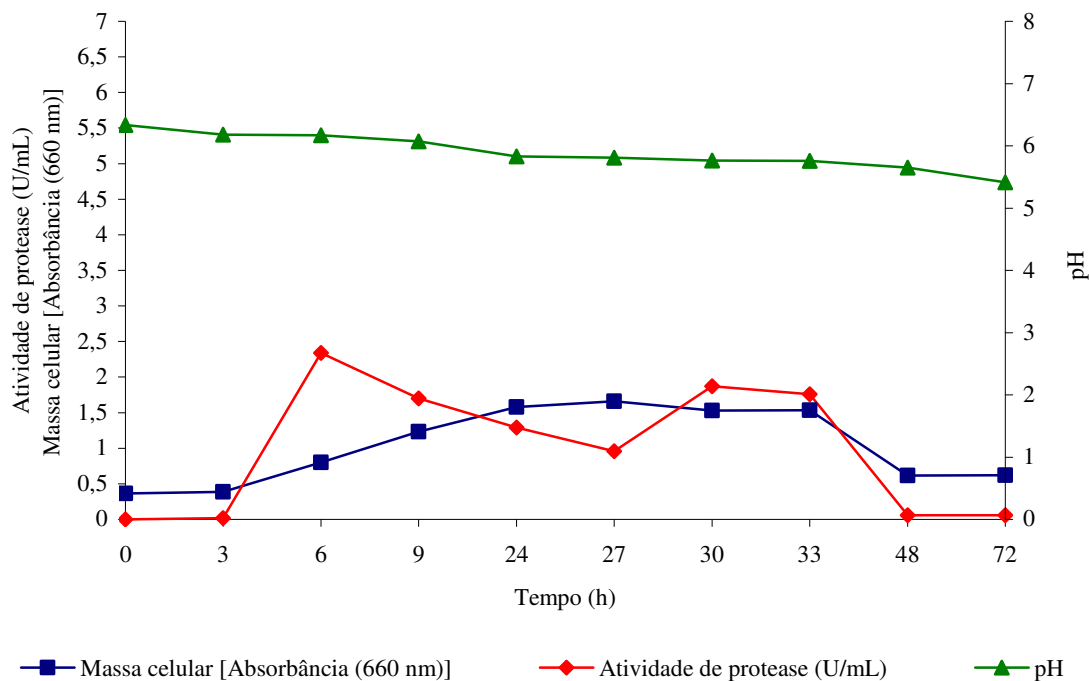


Figura III 3. Estudo da produção de protease pela linhagem *C. cellulans* 191, em fermentador de 5 L, em meio de cultivo B contendo 8% de levedura seca em tampão fosfato 0,15 M, pH 6,5 a 30°C, 150 rpm e 1,5 vvm

A Tabela III 4 e a Figura III 4 ilustram que na fermentação da linhagem *C. cellulans* 191 em fermentador de 5 L em meio de cultivo B contendo 8% de levedura seca em tampão fosfato 0,15 M, pH 6,5, a 30°C, 150 rpm e 3 vvm de aeração, a protease foi produzida também em dois momentos. O primeiro pico de protease foi observado na fase exponencial de crescimento atingindo atividade de 4,89 U/mL de protease após 6 h de fermentação. O segundo pico de protease foi observado no final da fase estacionária de crescimento atingindo atividade máxima de 6,14 U/mL de protease após 33 h de fermentação. O aparecimento de picos de atividade enzimática sugere, provavelmente, a existência de isoformas de protease. Não foi detectada nenhuma atividade de β -1,3 glucanase e quitinase nos sobrenadantes do meio de cultivo B para a produção de protease em fermentador de 5 L. O pH do meio de cultura variou de 6,35 no início da fermentação para 5,13 no final da fermentação (Tabela III 4).

Tabela III 4. Estudo da produção de protease pela linhagem *C. cellulans* 191, em fermentador de 5 L, em meio de cultivo B contendo 8% de levedura seca em tampão fosfato 0,15 M, pH 6,5 a 30°C, 150 rpm e 3,0 vvm

Tempo de Fermentação (h)	U/mL de β -1,3 glucanase	U/mL de protease	U/mL de quitinase	pH	Massa celular [Absorbância (660 nm)]
0	0	0,14	0	6,35	0,39
3	0	3,67	0	6,25	0,92
6	0	4,89	0	6,18	1,2
9	0	3,46	0	6,12	1,83
24	0	3,48	0	5,81	3,57
27	0	3,39	0	5,79	3,54
30	0	3,86	0	5,76	3,6
33	0	6,14	0	5,77	3,6
48	0	3,13	0	5,59	2,56
72	0	2,28	0	5,14	1,28

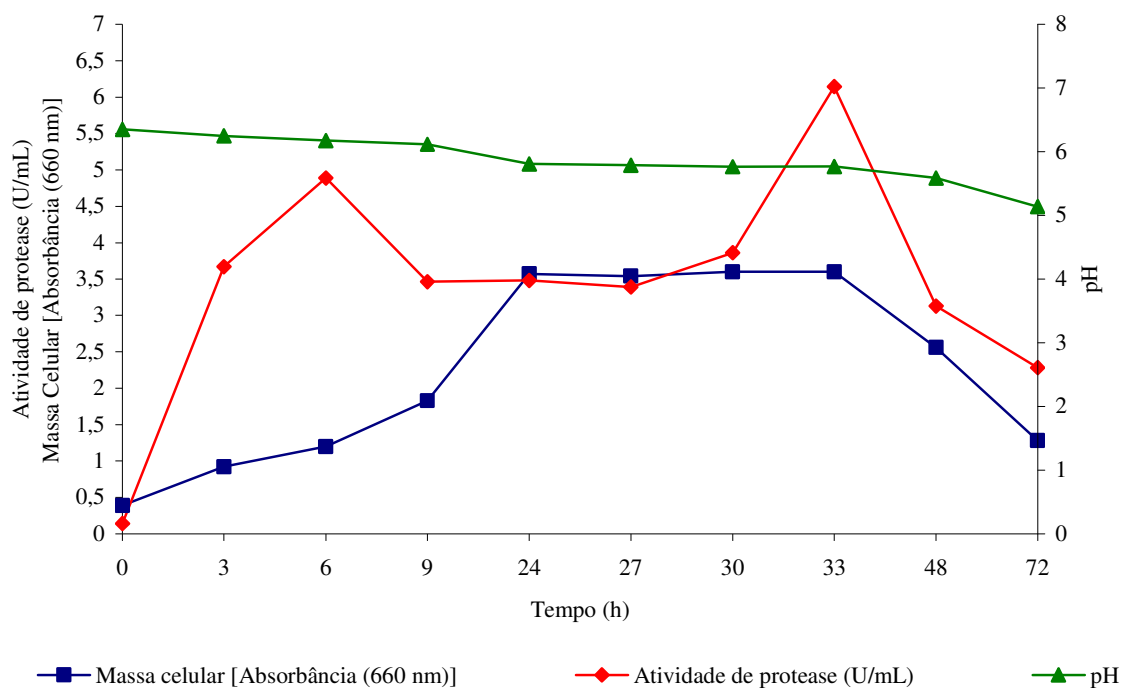


Figura III 4. Estudo da produção de protease pela linhagem *C. cellulans* 191, em fermentador de 5 L, em meio de cultivo B contendo 8% de levedura seca em tampão fosfato 0,15 M, pH 6,5 a 30°C, 150 rpm e 3,0 vvm

Na fermentação da linhagem *C. cellulans* 191 em fermentador de 5 L, a utilização de aeração de 3 vvm, resultou em atividade 2 vezes maior para a protease produzida na fase exponencial (1º pico) e 3,3 vezes maior para a protease produzida na fase estacionária (2º pico) em relação a fermentação com aeração de 1,5 vvm. Não foi detectada nenhuma atividade de β -1,3 glucanase e quitinase nos sobrenadantes do meio de cultivo B para a produção de protease em fermentador de 5 L.

Rowley e Bull⁵ verificaram que o complexo enzimático de *Arthrobacter* continha atividade de β -1,3 glucanase e de protease. A produção das enzimas foi dependente do crescimento celular e coincidiu com a fase de crescimento exponencial do microrganismo.

A produção de uma protease extracelular de *Bacillus subtilis* AS1 398 em biorreator de 11,5 L foi cerca de 9% maior que a média de atividade obtida em frascos agitados após 32 h de fermentação⁹.

A produção de protease por *Beauveria bassiana* foi estudada em frascos agitados e em fermentadores de 5 e 30 L. A produção de protease em frascos agitados foi similar à produção em fermentador de 30 L e menor em relação à produção em fermentador de 5 L¹³.

No estudo de produção de protease pela linhagem *C. Cellulans* 191 em frascos agitados, utilizando planejamento experimental, a maior atividade obtida foi de 4,25 U/mL após 30 h de fermentação. No presente estudo em fermentador de 5 L e 3 vvm, a produção de protease pela mesma linhagem utilizando o mesmo meio de cultivo foi de 4,89 U/mL após 6 h de fermentação e 6,14 U/mL após 33 h de fermentação.

Estudo da produção de quitinase

A produção de quitinase pela linhagem *C. cellulans* 191 em meio de cultivo C contendo 1,5% de quitina neutralizada em fermentador de 5 L, foi estudada em diferentes tempos de fermentação; a 25°C, 200 rpm e 1,5 e 3 vvm de aeração.

Tabela III 5. Estudo da produção de quitinase pela linhagem *C. cellulans* 191, em fermentador de 5 L, em meio de cultivo C contendo 1,5% de quitina neutralizada a 25°C, 200 rpm e 1,5 vvm

Tempo de Fermentação (h)	U/mL de β -1,3 glucanase	U/mL de protease	U/mL de quitinase	pH	Massa celular [Absorbância (660 nm)]
0	0	0	0,07	6,44	0,036
24	0	0	0,44	6,69	0,093
31	0	0	0,33	6,71	0,228
48	0	0	0,15	6,67	0,396
72	0	0	0,18	6,67	0,616
96	0	0	0,31	6,45	0,7455
120	0	0	1,65	6,80	0,759
144	0	0	2,94	6,92	0,7713
168	0	0	4,19	6,97	0,78
192	0	0	2,72	7,02	0,75

A Tabela III 5 e a Figura III 5 ilustram que na fermentação da linhagem *Cellulosimicrobium cellulans* 191 em fermentador de 5 L em meio de cultivo C contendo 1,5% de quitina neutralizada a 25°C, 200 rpm e 1,5 vvm de aeração, a maior produção de quitinase foi produzida após 168 h de fermentação (4,19 U/mL de quitinase), no final da fase estacionária. O pH do meio de cultivo apresentou oscilações na faixa de pH compreendida entre 6,44 a 7,02 durante a fermentação (Tabela III 5).

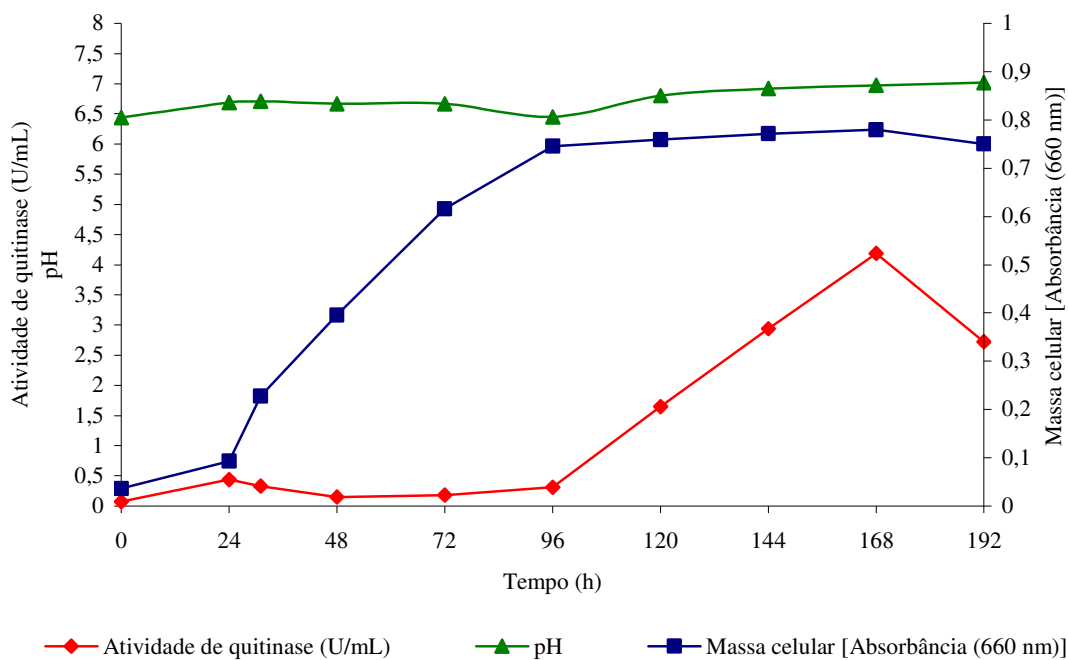


Figura III 5. Estudo da produção de quitinase pela linhagem *C. cellulans* 191, em fermentador de 5 L, em meio de cultivo C contendo 1,5% de quitina neutralizada a 25°C, 200 rpm e 1,5 vvm

A Tabela III 6 e a Figura III 6 ilustram que na fermentação da linhagem *C. cellulans* 191 em fermentador de 5 L contendo meio de cultivo C com 1,5 % de quitina neutralizada a 25°C, 200 rpm e 3 vvm de aeração, a quitinase foi majoritariamente produzida após 144 h de fermentação, coincidindo com a faixa de declínio ou morte do microrganismo. Foi obtido 4,38 U/mL de quitinase e não foi detectada atividade de β -1,3 glucanase e protease após 144 h de fermentação. O pH do meio de cultivo apresentou oscilações na faixa de pH compreendida entre 6,58 a 7,30 durante a fermentação (Tabela III 6).

Tabela III 6. Estudo da produção de quitinase pela linhagem *C. cellulans* 191, em fermentador de 5 L, em meio de cultivo C contendo 1,5% de quitina neutralizada a 25°C, 200 rpm e 3,0 vvm

Tempo de Fermentação (h)	U/mL de β -1,3 glucanase	U/mL de protease	U/mL de quitinase	pH	Massa celular [Absorbância (660 nm)]
0	0	0	0	6,58	0,15
24	0	0	0	7,02	0,23
31	0	0	0,14	7,18	0,27
48	0	0	0,72	7,30	0,435
72	0	0	0,88	6,76	0,56
96	0	0	1,01	6,76	0,84
120	0	0	1,83	6,72	0,784
144	0	0	4,38	6,62	0,54
168	0	0	2,64	6,73	0,48
192	0	0	2,32	6,84	0,31

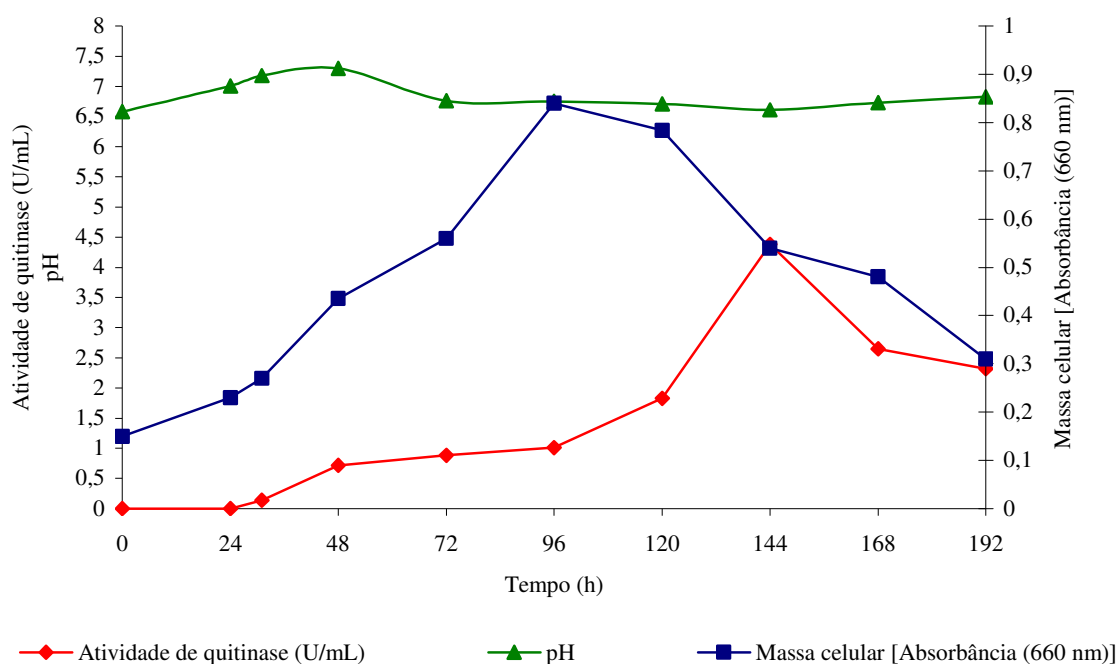


Figura III 6. Estudo da produção de quitinase pela linhagem *C. cellulans* 191, em fermentador de 5 L, em meio de cultivo C contendo 1,5% de quitina neutralizada a 25°C, 200 rpm e 3,0 vvm

O aumento da aeração de 1,5 vvm para 3 vvm no cultivo da linhagem *C. cellulans* 191 em fermentador de 5 L, resultou em diminuição do tempo para a obtenção da atividade máxima de quitinase. Utilizando-se aeração de 1,5 vvm e 3 vvm de aeração foram obtidos, respectivamente 4,19 U/mL e 4,38 U/mL, após 168 h e 144 h de incubação.

No estudo de produção da quitinase por *Verticillium lecanii* em frascos agitados e biorreatores de 5 e 30 L, os autores verificaram que agitação e a aeração afetaram a concentração de oxigênio dissolvido e influenciaram positivamente no crescimento do microrganismo e na produção da enzima, uma vez que o aumento da aeração implicou na produção de maior quantidade da enzima de interesse¹².

No estudo de produção de quitinase em frascos agitados foi obtido 7,06 U/mL após 72 h de fermentação, enquanto que em fermentador de 5 L utilizando-se aeração de 3 vvm foi obtido 4,38 U/mL da enzima após 144 h de incubação, indicando uma produção 1,61 vezes maior em frascos agitados quando comparada à produção em fermentador de 5 L.

CONCLUSÕES

Em fermentador de 5 L a maior produção de β -1,3 glucanase (0,72 U/mL) foi obtida após 24 h de fermentação pela *C. cellulans* 191 em meio de cultivo A composto por 2,0 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,2 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 10 g/L de parede celular de levedura em tampão fosfato 0,2 M, 7,5; a 30°C, 200 rpm e aeração de 3 vvm.

Em fermentador de 5 L a maior produção de protease foi obtida através da fermentação da linhagem *C. cellulans* 191 em meio de cultivo B composto por 2,0 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,2 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 80 g/L de levedura seca utilizada como indutor em tampão fosfato 0,15 M, 6,5; a 30°C, 150 rpm e aeração de 3 vvm. Foram obtidos na fase exponencial 4,89 U/mL de protease I e na fase estacionária 6,14 U/mL de protease II, após, respectivamente, 6 e 33 h de incubação.

Em fermentador de 5 L a maior produção de quitinase (4,38 U/mL) foi obtida após 144 h de fermentação da linhagem *C. cellulans* 191 em meio de cultivo C composto por 4,0 g/L de extrato de levedura; 2,0 g/L de triptona; 4,0 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 1,2 g/L de KH_2PO_4 ; 2,8 g/L de K_2HPO_4 e 15 g/L de quitina neutralizada utilizada como indutor a 25°C, 200 rpm e aeração de 3 vvm.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Schmidell, W.; Lima, U. A.; Aquarone, E.; Borzani, W. *Biotechnologia Industrial* Em: Variação de Escala. v. 2, 2005.
2. Fleuri, L. F. Produção de β -1,3 glucanases, proteases líticas e quitinases por microrganismos e aplicação na lise de leveduras. *Dissertação de Mestrado* - FEA - Universidade Estadual de Campinas, Brasil, 2003, 141 p.
3. Fleuri, L. F.; Sato, H. H. Produção, purificação, clonagem e aplicação de enzimas líticas. *Quim. Nova*. v. 28, n. 5, p. 871, 2005.
4. Fleuri, L. F.; Sato, H. H. Estudo da influência do pH, agitação e temperatura na produção de beta-1,3 glucanase, protease lítica e quitinase pela linhagem *Cellulosimicrobium cellulans* 191. *CD-Room XV Simpósio Nacional de Bioprocessos*. Recife, PE, 2005.
5. Rowley, B. I.; Bull, A. T. Isolation of a yeast-lysing *Arthrobacter* species and the production of the lytic enzyme complex in batch and continuous-flow fermentors. *Biotechnol. Bioeng.* v. 19, p. 879, 1977.
6. Felse, P. A.; Panda, T. Production of microbial chitinases. *Bioprocess and Biosystems Eng.* v. 23 , n. 2, p. 127, 1999.
7. Felse, P. A.; Panda, T. Self-directing optimization of parameters for extracellular chitinase production by *Trichoderma harzianum* in batch mode. *Process Biochem.* v. 34 , n. 6-7, p. 563, 1999.
8. Felse, P. A.; Panda, T. Submerged culture production of chitinase by *Trichoderma harzianum* in stirred tank bioreactors – the influence of agitator speed. *Biochem. Eng. J.* v. 4 , n. 2, p. 115, 2000.
9. Yuguo, Z.; Zhao, W.; Xiaolong, C.; Chunhua, Z. Production of extracellular protease from crude substrates with dregs in an external-loop airlift bioreactor with lower ratio of height to diameter. *Biotechnol. Prog.* v. 17 , n. 2, p. 273, 2001.
10. Ferro, L. A. Produção, Purificação e Caracterização da enzima β -1,3 glucanase de *Cellulomonas cellulans* YLM-B191-1 e ação da enzima na parede celular de leveduras. *Tese de Doutorado* - FEA - Universidade Estadual de Campinas, Brasil, 2002, p 175.
11. Beshay, U.; El-Enshasy, H.; Ismail, I. M. K.; Moawad, H.; Ewa, W.; Abd-El-Ghany, S. β -Glucanase production from genetically modified recombinant *Escherichia coli*: Effect

- of growth substrates and development of a culture medium in shake flasks and stirred tank bioreactor. *Process Biochem.* v. 39, p. 307, 2003.
12. Liu, B. L.; Kao, P. M.; Tzeng, Y. M.; Feng, K. C. Production of chitinase from *Verticillium lecanii* F091 using submerged fermentation. *Enzyme Microb. Tech.* v. 33, p. 410, 2003.
 13. Rao, Y. K.; Lu, S.; Liu, B.; Tzeng, Y. Enhanced production of an extracellular protease from *Beauveria bassiana* by optimization of cultivation processes. *Biochem. Eng. J.* v. 28, n. 1, p. 57, 2006.
 14. Soares, G. A. M. Enzimas que lisam a parede celular de leveduras – Clonagem e sequenciamento do gene da β -1,3 glucanase lítica de *Cellulomonas cartae* 191. *Tese de Doutorado* - FEA - Universidade Estadual de Campinas, Brasil, 2002, p. 113.
 15. Santos, L. F. Produção, purificação, caracterização e estudo da aplicação de uma protease alcalina produzida por *Cellulosimicrobium cellulans* 191. *Tese de Doutorado* – Universidade Estadual de Campinas, Brasil, 2004, 97 p.
 16. Yamaguchi, M. M. Seleção, produção e caracterização da enzima quitinase. *Tese de Doutorado* - FEA - Universidade Estadual de Campinas, Brasil, 2003, 83 p.
 17. Saeki, K.; Iwata, J.; Yamazaki, S.; Watanabe, Y.; Tamai, Y. Purification and characterization of a yeast lytic β -1,3-glucanase from *Oerskovia xanthineolytica* TK-1. *J. Ferment. Bioeng.* v. 78, p. 407, 1994.
 18. Santos, L. F. Caracterização bioquímica da protease lítica produzida por *Cellulomonas cartae* n^o 191 e estudo da lise enzimática de leveduras. *Dissertação de Mestrado* - FEA - Universidade Estadual de Campinas, Brasil, 2000, p. 71.
 19. Somogyi, N. A new reagent for the determination of sugars. *J. Biol. Chem.* v. 195, p. 19, 1952.
 20. Obata, T.; Iwata, H.; Namba, Y. The synergistic effects among β -1,3 glucanase from *Oerskovia* sp CK. on lysis of viable yeast cell. *Agr. Biol. Chem.* v. 41, p. 2387, 1977.
 21. Réissig, J. L.; Strominger, J. L.; Leloir, L. F. A modified colorimetric method for the estimation of N-acetyl amino sugar. *J. Biol. Chem.* v. 217, p. 959, 1955.
 22. Sandhu, D. K.; Wadhwa, V.; Bagga, P. S. Use of lytic enzymes for protoplast production in *Trichoderma reesei* QM9414. *Enzyme Microb. Tech.* v. 11, p. 21, 1989.

CAPÍTULO IV: PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO DE β -1,3 GLUCANASES, PROTEASES E QUITINASES DA LINHAGEM *Cellulosimicrobium cellulans* 191

RESUMO

O presente trabalho visou a produção das enzimas β -1,3 glucanases, proteases e quitinases da linhagem *Cellulosimicrobium cellulans* 191 em frascos agitados e a purificação parcial das enzimas em colunas de troca iônica e filtração em gel. Na fermentação do microrganismo em meios de cultivo A, B e C, em frascos agitados, foram obtidos respectivamente, 1,12 U/mL de β -1,3 glucanase; 4,2 U/mL de protease e 6,9 U/mL de quitinase. A β -1,3 glucanase foi purificada 11,83 vezes com rendimento de 25% em resina de troca iônica DEAE-Sephadex A50. A β -1,3 glucanase apresentou massa molecular de 45 KDa em eletroforese SDS-PAGE. Na purificação das proteases em resina de troca iônica DEAE-Sephadex A50 foram obtidas três frações de proteases denominadas P1, P2 e P3. A fração P3 apresentou duas bandas de massas moleculares de 14 e 16 KDa em eletroforese SDS-PAGE. A quitinase foi purificada cerca de 6,65 vezes com rendimento de 46,61% em resina de filtração em gel Sepharose CL4B200 e apresentou massa molecular de 61 KDa em eletroforese SDS-PAGE.

SUMMARY

The aim of this work was to study the production of β -1,3 glucanases, proteases and chitinases by *Cellulosimicrobium cellulans* 191 in shaken flasks, and the partial purification of the enzymes using ion-exchange columns and gel filtration. In the fermentation of the microorganism in shaken flasks using culture media A, B and C, 1.12 U/mL of β -1,3 glucanase; 4.2 U/mL of protease and 6.9 U/mL of chitinase were obtained, respectively. The β -1,3 glucanase was purified 11.83 times with a yield of 25% using a DEAE-Sephadex A50 ion-exchange resin. The β -1,3 glucanase presented a molecular mass of 45 KDa in SDS-PAGE electrophoresis. In the purification of the proteases using a DEAE-Sephadex A50 ion-exchange resin, three protease fractions were obtained, namely P1, P2 and P3. Fraction P3 presented two proteins with molecular weights of 14 and 16 KDa in SDS-PAGE electrophoresis. The chitinase was purified about 6.65 times with a yield of 46.61% using a Sepharose CL4B200 gel filtration resin, and presented a molecular mass of 61 KDa in SDS-PAGE electrophoresis.

INTRODUÇÃO

As enzimas celulares são encontradas na forma de misturas complexas onde estão presentes em um grande número e sob diferentes formas. Além das enzimas, encontram-se inúmeras proteínas sem função catalítica e outros produtos celulares. Para um estudo aprofundado deve-se purificar a enzima a ser estudada. Enzimas em estado impuro podem ser aplicadas para finalidades específicas e em muitos casos são requeridas por serem de fácil obtenção e de baixo custo. As enzimas purificadas apresentam a vantagem de estarem livres de outras enzimas e substâncias que interferem nos substratos desviando as reações específicas. Além disso, comercialmente são muito mais valorizadas. As preparações enzimáticas comerciais como a Lyticase de *Arthrobacter luteus* e Lyticase recombinante expressa em *Escherichia coli* para a lise de leveduras e para obtenção de protoplastos são encontradas na forma bruta e na forma parcialmente purificada¹.

Shimoi *et al.*² purificaram enzimas líticas produzidas por *Rarobacter faecitabidus*, uma bactéria capaz de lisar células de leveduras isolada de sistema de tratamento de água. O complexo de enzimas líticas era composto de uma β -1,3 glucanase e duas proteases. A massa molecular das duas proteases e da β -1,3 glucanase foram estimadas em 35, 33 e 82 KDa, respectivamente, por eletroforese em gel poliacrilamida SDS. Estas proteases podiam reduzir a turbidez de suspensões de levedura. Por este tratamento, quase todas as células testadas perderam sua viabilidade, enquanto que o número de células de leveduras não diminuiu sob observação ao microscópio. A β -1,3 glucanase sozinha não diminuiu a turbidez da suspensão de leveduras nem afetou a viabilidade das células, mas a β -1,3 glucanase combinada com as duas proteases lisaram completamente as células de levedura.

Ventom e Asenjo³ estudaram as características bioquímicas da β -1,3 glucanase excretada por *Oerskovia xanthineolytica* LL-G109. A massa molecular da enzima foi estimada em 12 KDa através de filtração em gel. A β -1,3 glucanase purificada mostrou atividade lítica limitada em levedura, mas foi estimulada duas e cinco vezes, respectivamente pelas duas proteases.

A β -1,3 glucanase de *Oerskovia xanthineolytica* TK-1 foi purificada em coluna de DEAE-Sephacel, DEAE-Toyopearl 650M e Bio-Gel P-2 e caracterizada. A enzima

apresentou massa molecular estimada em 40 KDa. A β -1,3 glucanase atuou sobre o substrato como uma endoenzima⁴.

A β -1,3 glucanase de *Oerskovia xanthineolytica* LL-G109 foi purificada através de eletroforese em gel SDS-poliacrilamida, apresentando massa molecular de aproximadamente 27,19 KDa^{5,6}.

Uma β -1,3 glucanase da linhagem *Cellulosimicrobium cellulans* 191 de massa molecular de 17,1 KDa foi purificada e caracterizada por Ferro⁷. A β -1,3 glucanase foi purificada do sobrenadante do meio de cultivo através de ultrafiltração e cromatografia em coluna de CM-Sepharose CL-6B. A enzima purificada apresentou atividade ótima a 55°C e pH ótimo na faixa de pH entre 4,5 – 6,5. A β -1,3 glucanase purificada apresentou-se estável na faixa de pH 5,5-6,5 e foi inativada a temperaturas superiores a 55°C. A enzima foi capaz de hidrolisar as ligações glicosídicas da laminarina atuando como uma endoenzima. A β -1,3 glucanase purificada mostrou-se capaz de lisar a parede celular de *Saccharomyces cerevisiae* ATCC26602 sem a necessidade de protease. Através da microscopia eletrônica de varredura, observou-se que as enzimas líticas da linhagem *C. cellulans* 191 foram capazes de alterar a superfície celular de leveduras.

Uma β -1,3 glucanase da linhagem *C. cellulans* 191 de massa molecular de 57 KDa foi purificada do sobrenadante do meio de cultivo através de ultrafiltração (membrana de exclusão de 10 KDa) e cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-Sepharose equilibrada em pH 5,5⁸.

A β -1,3 glucanase alcalina produzida por *Bacillus clausii* NM1 foi purificada por precipitação com sulfato de amônio, cromatografia de troca iônica com DEAE-Sepharose FF e filtração em gel com Sephacryl S-200HR. A massa molecular da enzima purificada foi estimada em 71 KDa por eletroforese em gel de SDS-PAGE⁹.

Entre os fungos a β -1,3 glucanase é principalmente produzida pelo gênero *Trichoderma*. Thrane *et al.*¹⁰ purificou uma endo-1,3- β glucanase do filtrado de uma cultura de *Trichoderma harzianum* por filtração em gel utilizando coluna Sephacryl S-300R e focalização isoelétrica, para aplicar no controle do fitopatógeno *Pythium* spp. A enzima apresentou uma pequena massa molecular em torno de 17 KDa. Noronha e Ulhoa¹¹ purificaram uma β -1,3 glucanase de *Trichoderma harzianum* através de várias etapas cromatográficas realizadas subsequentemente. As amostras concentradas da enzima foram

purificadas em coluna Sephacryl S-200. As frações que apresentaram β -1,3 glucanases foram aplicadas em coluna Fenil-Sepharose e as frações que continham atividade de β -1,3 glucanase foram aplicadas em coluna CM-Sepharose. A enzima foi purificada 65 vezes e foi obtido 0,32% de rendimento. Através de SDS-PAGE a massa molecular foi estimada em aproximadamente 29 KDa. Bara *et al.*¹² verificaram que o fungo *Thichoderma asperellum* produz pelo menos duas β -1,3 glucanases extracelulares na presença de parede celular de *Rhizoctonia solani* como indutor. A β -1,3 glucanase foi purificada por filtração em gel e cromatografia de troca iônica. A massa molecular da *exo*- β -1,3 glucanase purificada foi estimada em 83,1 KDa utilizando eletroforese SDS-PAGE. A enzima foi ativa somente sobre glucanas contendo ligações glicosídicas β -1,3, atuando sobre a laminarina como uma exoenzima para formar glicose.

Diversas proteases e quitinases microbianas tem sido descritas na literatura.

A protease e a quitinase da linhagem *Cellulosimicrobium cellulans* foram purificadas em colunas de troca iônica, respectivamente, por Santos¹³ e Yamaguchi¹⁴.

A quitinase de *Cellulomonas flavigena* NTOU foi concentrada e purificada através de colunas Q-Cartridge e Superdex 75 HR. As massas moleculares da quitinase estimada por filtração em gel e SDS-PAGE foram respectivamente; 34,2 KDa e 32,5 KDa¹⁵. Três linhagens de *Bacillus* foram isoladas e três isoformas de endoquitinases (L, M e S) foram purificadas e caracterizadas. As isoformas L, M e S apresentaram diferentes massas moleculares (71, 62 e 53 KDa), temperaturas ótimas de atividade (75, 65 e 75°C), pH ótimos de atividade (6,5; 5,5; 5,5) e pI (5,3; 4,8 e 4,7)¹⁶.

A quitinase do microrganismo *Bacillus cereus* YQ-308 foi purificada através de cromatografia em coluna DEAE-Sepharose CL-6B seguido por Sephacryl S-200. A quitinase apresentou massa molecular de 48 KDa em SDS-PAGE e foi capaz de inibir a extensão da hifa do fungo *Fusarium oxysporum* e *Pythium ultimum*¹⁷. A quitinase de *Bacillus* sp. 13.26 foi purificada por meio de precipitação com sulfato de amônio e coluna de DEAE-Sepharose CL-6B e apresentou massa molecular de 60 KDa em SDS-PAGE¹⁸. A quitinase de *Streptomyces* sp. NK1057 foi purificada por meio de cromatografia em coluna contendo resina de filtração em gel Sephadex G-100¹⁹.

Quitinases são produzidas por fungos na presença de quitina. A quitinase proveniente do filtrado da cultura de *Metarhizium anisopliae* foi purificada por precipitação

com sulfato de amônio seguido de cromatografia de troca iônica em DEAE- Sephacel. A enzima purificada de massa molecular de 30 KDa foi capaz de hidrolisar o p-nitrofenil- β -N-diacetilquitobiose²⁰.

Uma enzima quitinolítica foi purificada do filtrado da cultura de *Trichoderma harzianum* T198 por precipitação com sulfato de amônio seguido por cromatografia de afinidade com quitina e liberação com ácido acético 10%. A massa molecular da enzima foi estimada em 28 KDa através de cromatografia de filtração em gel e 27,5 KDa em SDS-PAGE. A enzima apresentou atividade sobre uma grande variedade de quitina com mais de duas unidades de N-acetilglicosamina. Análises em HPLC dos produtos de hidrólise demonstraram que a enzima é uma exoquitinase e que libera somente unidades de N-acetilglicosamina²¹.

O fungo filamentoso *Paecilomyces lilacinus* é utilizado como agente de biocontrole contra nematóides parasitas de plantas. Ovos de nematóides e cutículas são os sítios de infecção para os agentes de biocontrole que penetram através da produção de enzimas líticas. *P. lilacinus* foi cultivado em meio líquido e a produção de proteases e quitinases foram induzidas pela presença de gema de ovo e quitina, respectivamente. A serina protease foi purificada do meio de cultivo usando coluna de afinidade com Sepharose-bacitracina. Foram verificadas três formas de protease, das quais duas apresentavam a extremidade C-terminal truncada. Atividade de quitinase também foi verificada no sobrenadante do meio de cultivo, e após separação por focalização isoeletrica, seis proteínas apresentaram atividade. A atividade de quitinase foi confirmada sobre gel não desnaturante de uma e duas dimensões usando quitina glicol como substrato. Duas das proteínas apresentaram similaridade com endoquitinases através de experimentos com a seqüência de aminoácidos da região N-terminal²².

Este trabalho visou a produção e purificação parcial de β -1,3 glucanase, protease e quitinase da linhagem *Cellulosimicrobium cellulans* 191.

MATERIAL E MÉTODOS

Produção de β -1,3 glucanases, proteases e quitinases pela linhagem *Cellulosimicrobium cellulans* 191, respectivamente nos meios de cultivos A, B e C, em frascos agitados, nas condições de pH, temperatura e agitação estabelecidas previamente através de planejamentos experimentais

A β -1,3 glucanase foi produzida, em frascos agitados aletados, em meio de cultivo A composto por 2,0 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,2 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 10 g/L de parede celular de levedura em tampão fosfato 0,2 M, pH 7,5. Os frascos foram incubados a 30°C, 200 rpm durante 24 h.

A protease foi produzida, em frascos agitados, em meio de cultivo B composto por 2,0 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,2 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 80 g/L de levedura seca utilizada como indutor em tampão fosfato 0,15 M, pH 6,5. Os frascos foram incubados a 30°C, 150 rpm durante 30 h.

A quitinase foi produzida, em frascos agitados, em meio de cultivo C composto por 4,0 g/L de extrato de levedura; 2,0 g/L de triptona; 4,0 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 1,2 g/L de KH_2PO_4 ; 2,8 g/L de K_2HPO_4 e 15 g/L de quitina neutralizada utilizada como indutor. Os frascos foram incubados a 25°C, 200 rpm durante 72 h.

Para a preparação do pré-inóculo, uma alçada da cultura de 24 h do microrganismo em tubo inclinado de meio TYM foi inoculada separadamente em frascos Erlenmeyers de 500 mL contendo 100 mL do meio de cultivo a ser utilizado. Alíquotas de 10 mL de pré-inóculo foram transferidas assepticamente para frascos Erlenmeyers de 500 mL contendo 90 mL do mesmo meio de cultivo. Os frascos foram incubados sob condições específicas para a produção de cada enzima. Após incubação, os meios de cultivo obtidos no item anterior, foram centrifugados a 7.840 g durante 10 min a 5°C e os sobrenadantes utilizados como preparação enzimática bruta.

As atividades de β -1,3 glucanases, proteases e quitinases nos sobrenadantes dos meios de cultivo foram determinadas como descrito no capítulo anterior.

Purificação parcial das enzimas β -1,3 glucanase, protease e quitinase da linhagem *Cellulosimicrobium cellulans* 191

Purificação parcial de β -1,3 glucanase através de cromatografia em coluna de troca iônica DEAE-Sephadex A50

A preparação bruta (20 mL) de β -1,3 glucanase (1,12 U/mL) foi aplicada em coluna de DEAE-Sephadex A50 de 2,5 cm de diâmetro e 40 cm de comprimento, equilibrada em tampão fosfato de sódio 0,01 M, pH 6,5. As proteínas adsorvidas foram eluídas pela aplicação de 250 mL do mesmo tampão usando-se gradiente de sal (de 0 a 1 M de NaCl). As frações de 5 mL foram coletadas a cada 12,5 min.

Purificação parcial de protease através de cromatografia em coluna de troca iônica DEAE-Sephadex A50

A preparação bruta (20 mL) de protease (4,2 U/mL) foi aplicada em coluna de DEAE-Sephadex A50 de 2,5 cm de diâmetro e 40 cm de comprimento, equilibrada em tampão fosfato de sódio 0,01 M, pH 7,0. As proteínas adsorvidas foram eluídas pela aplicação de 250 mL do mesmo tampão usando-se gradiente de sal (de 0 a 1 M de NaCl). As frações de 5 mL foram coletadas a cada 12,5 min.

Purificação parcial de quitinase através de cromatografia em coluna de filtração em gel Sepharose CL4B200

A preparação bruta (5,0 mL) de quitinase (6,9 U/mL) foi aplicada em coluna de Sepharose CL4B200 de 1,5 cm de diâmetro e 30 cm de comprimento, equilibrada em tampão fosfato de sódio 0,01 M, pH 7,0. As proteínas adsorvidas foram eluídas pela aplicação de 50 mL do mesmo tampão. As frações de 1,5 mL foram coletadas a cada 3,5 min.

O curso de eluição das proteínas foi acompanhado pela medida da absorbância a 280 nm. As frações contendo atividades enzimáticas de interesse foram reunidas, dialisadas contra água destilada e liofilizadas. As atividades de β -1,3 glucanases, proteases e

quitinases foram determinadas como descrito no capítulo anterior. A concentração de proteína das soluções enzimáticas foi determinada com o método de Lowry²³, usando ovoalbumina como padrão.

Eletroforese da β -1,3 glucanase, protease e quitinase em gel SDS-poliacrilamida

As frações G1 com atividade de β -1,3 glucanase, P3 com atividade de protease e Q1 com atividade de quitinase, foram concentradas por liofilização, ressuspensas e aplicadas em gel de dodecil sulfato de sódio-poliacrilamida a 12% (SDS-PAGE), como descrito por Laemmli²⁴. A eletroforese foi desenvolvida em duas etapas: a 80 V por aproximadamente 30 min e a 120 V por aproximadamente 2 h.

Após o desenvolvimento da eletroforese, os géis foram lavados três vezes por 20 min com uma solução fixadora de etanol (30%) e ácido acético (10%) em água destilada. Em seguida, o gel foi corado com Coomassie Blue R250.

A mistura padrão de proteínas continha fosforilase b (94,0 KDa), albumina bovina (67 KDa), ovoalbumina (43,0 KDa), anidrase carbônica (30,0 KDa), inibidor de tripsina de soja (20,1 KDa) e α -lactoalbumina (14,0 KDa).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Produção de β -1,3 glucanase, protease e quitinase pela linhagem *Cellulosimicrobium cellulans* 191, respectivamente em meios de cultivos A, B e C, em frascos agitados, nas condições de pH, temperatura e agitação estabelecidas nos planejamentos experimentais

Foi obtido 1,12 U/mL de β -1,3 glucanase através da fermentação da linhagem 191, em frascos agitados aletados, em meio de cultivo A com tampão fosfato 0,2 M, pH 7,5, a 30°C e 200 rpm, após 24 h de incubação.

Foi obtido 4,2 U/mL de protease através da fermentação da linhagem 191, em frascos agitados, em meio de cultivo B com tampão fosfato 0,15 M, pH 6,5, a 30°C e 150 rpm, após 30 h de incubação.

Foi obtido 6,9 U/mL de quitinase através da fermentação da linhagem 191, em frascos agitados, em meio de cultivo C com pH inicial 6,5, a 25°C e 200 rpm, após 72 h de incubação.

Purificação parcial das enzimas β -1,3 glucanase, protease e quitinase da linhagem *Cellulosimicrobium cellulans* 191

Purificação parcial de β -1,3 glucanase através de cromatografia em coluna de troca iônica DEAE-Sephadex A50 e eletroforese em SDS-PAGE

Na etapa preliminar foi testado o fracionamento enzimático por precipitação com sulfato de amônio (40, 60 e 80% de saturação) do extrato bruto de β -1,3 glucanase.

Procedimentos de purificação são onerosos e, por isso, para que se justifique seu uso devem ser obtidos bons resultados. Foi verificado que na etapa de concentração com sulfato de amônio a atividade específica da preparação obtida era inferior à atividade específica da preparação enzimática bruta. Dessa forma, para a purificação da β -1,3 glucanase, o extrato enzimático bruto foi aplicado diretamente na coluna de troca iônica.

A Figura IV 1 ilustra a purificação da β -1,3 glucanase em coluna de DEAE-Sephadex A50 equilibrada em tampão fosfato 0,01 M, pH 6,5. A enzima foi eluída da

resina utilizando-se o tampão contendo 0,6 M de NaCl. Foi obtido um pico de β -1,3 glucanase, o qual foi denominado de G1 (Figura IV 1). A β -1,3 glucanase foi purificada 11,92 vezes e o rendimento da enzima foi de 25% (Tabela IV 1).

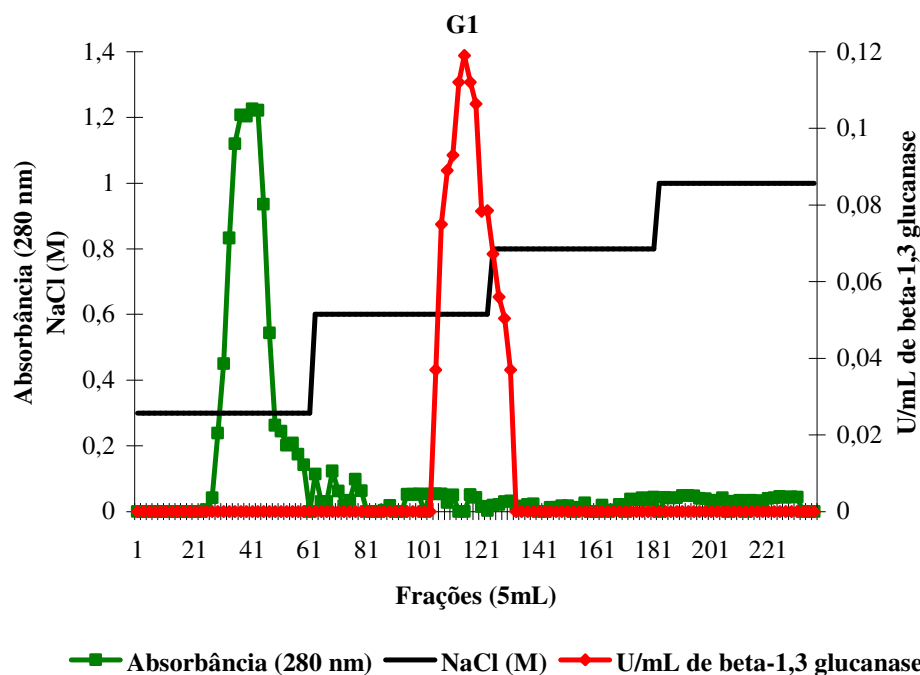
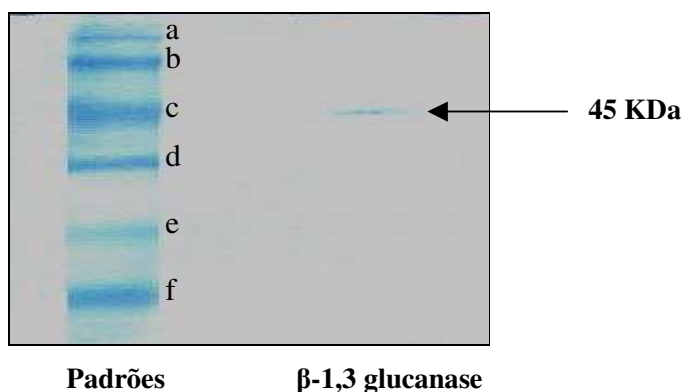


Figura IV 1. Purificação da β -1,3 glucanase da linhagem *Cellulosimicrobium cellulans* 191 através de cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-Sephadex A50

Tabela IV 1. Purificação da β -1,3 glucanase da linhagem *Cellulosimicrobium cellulans* 191 em coluna de DEAE-Sephadex A50

Extratos	Volume (mL)	U/mL de β -1,3 glucanase	U total de β -1,3 glucanase	Proteína (mg/mL)	Proteína Total (mg)	Ativ. Espec. de β -1,3 glucanase (U/mg)	Rendimento de β -1,3 glucanase (%)	Fator de Purificação
Bruto	20	1,12	22,4	9,18	183,6	0,12	100	1
G1	50	0,112	5,6	0,078	3,9	1,43	25	11,92

A Figura IV 2 ilustra a eletroforese da β -1,3 glucanase purificada em gel SDS-PAGE, indicando a presença de uma única banda de proteína. A β -1,3 glucanase purificada apresentou massa molecular de 45 KDa (Figura IV 3).



Padrões: a- fosforilase b (94,0 KDa); b- albumina bovina (67,0 KDa); c- ovoalbumina (43,0 KDa); d- anidrase carbônica (30,0 KDa); e- inibidor de tripsina de soja (20,1 KDa); f- α -lactoalbumina (14,0 KDa)

Figura IV 2. Eletroforese da β -1,3 glucanase purificada em gel SDS-poliacrilamida

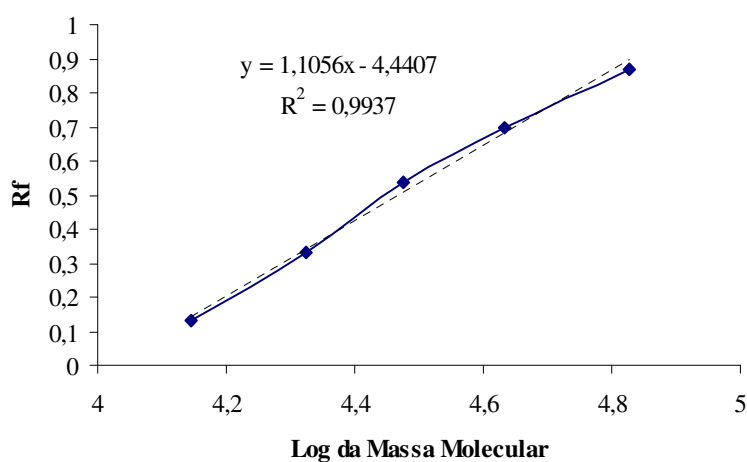


Figura IV 3. Relação entre o Rf e o log da massa molecular das proteínas em gel SDS-poliacrilamida para a determinação da massa molecular da β -1,3 glucanase purificada

Diferentes métodos de purificação de β -1,3 glucanases têm sido relatados na literatura. A β -1,3 glucanase de *Oerskovia xanthineolytica* TK-1 foi purificada em coluna de DEAE-Sephacel, DEAE-Toyopearl 650M e Bio-Gel P-2 e caracterizada. A enzima foi purificada 21 vezes e apresentou massa molecular estimada em 40 KDa⁴.

A β -1,3 glucanase de *Oerskovia xanthineolytica* LL-G109 foi purificada em coluna HR 16/10 Q-Sepharose FF. Em eletroforese em gel SDS, a enzima apresentou massa molecular de aproximadamente 27,19 KDa⁵. Ferrer *et al.*⁶ prosseguiram os procedimentos de purificação desta enzima através de ultrafiltração e duas colunas consecutivas de HR 16/10 Q-Sepharose FF em diferentes valores de pH (pH 8,5 e 5,0).

Uma β -1,3 glucanase da linhagem *Cellulomonas cellulans* 191 (*Cellulosimicrobium cellulans*) de 17,1 KDa foi purificada e caracterizada. A β -1,3 glucanase foi purificada do sobrenadante do meio de cultura através de ultrafiltração e cromatografia em coluna de CM-Sepharose CL6B (purificação de 78,2 vezes e rendimento de 5,53%). A β -1,3 glucanase purificada mostrou-se capaz de lisar a parede celular de *Saccharomyces cerevisiae* ATCC26602 sem a necessidade de protease. Através da microscopia eletrônica de varredura, observou-se que as enzimas líticas da linhagem *C. cellulans* 191 foram capazes de alterar a superfície celular de leveduras⁷.

Uma β -1,3 glucanase de massa molecular de 57 KDa da linhagem *Cellulosimicrobium cellulans* 191 foi purificada do sobrenadante no meio de cultura através de ultrafiltração (membrana de exclusão de 10 KDa) e cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-Sepharose equilibrada em pH 5,5. A enzima foi purificada 1,18 vezes quanto à atividade de β -1,3 glucanase e 5,1 vezes quanto à atividade de liticase⁸.

A β -1,3 glucanase alcalina produzida por *Bacillus clausii* NM1 foi purificada 124 vezes por precipitação com sulfato de amônio, cromatografia de troca iônica com DEAE-Sepharose FF e filtração em gel com Sephacryl S-200HR com rendimento de 41,8%. A massa molecular da enzima purificada foi estimada em 71 KDa por eletroforese em gel de SDS-PAGE⁹.

Thrane *et al.*¹⁰ purificou uma endo- β -1,3glucanase do filtrado de uma cultura de *Trichoderma harzanium* através de filtração em gel utilizando coluna Sephacryl S-300R e focalização isoelétrica, sendo obtido fator de purificação de 12,5 vezes e rendimento de 13%. Em eletroforese em gel SDS, a enzima apresentou massa molecular em torno de 17 KDa. Os autores relataram que a β -1,3glucanase pode ser aplicada no controle do fitopatógeno *Pythium* spp.

Noronha e Ulhoa¹¹ purificaram uma β -1,3 glucanase de *Trichoderma harzianum* através de várias etapas cromatográficas. As amostras concentradas da enzima foram

purificadas em coluna Sephacryl S-200. As frações que apresentaram β -1,3 glucanases foram aplicadas em coluna Fenil-Sepharose e as frações que continham atividade de β -1,3 glucanase foram aplicadas em coluna CM-Sepharose. A enzima foi purificada 65 vezes e foi obtido 0,32% de rendimento. Através de SDS-PAGE a massa molecular foi estimada em aproximadamente 29 KDa.

Thichoderma asperellum produz pelo menos duas β -1,3 glucanases extracelulares na presença de parede celular de *Rhizoctonia solani* como indutor. A β -1,3 glucanase foi purificada por filtração em gel em coluna Sephacryl S-100 e cromatografia de troca iônica em coluna de Q-Sepharose Fast Flow, sendo obtido fator de purificação de 35,7 vezes e rendimento de 9,5%. A massa molecular da exo- β -1,3 glucanase purificada foi estimada em 83,1 KDa utilizando eletroforese SDS-PAGE¹².

Purificação da protease através de cromatografia em coluna de troca iônica DEAE- Sephadex A50 e eletroforese em SDS-PAGE

O fracionamento do extrato enzimático bruto de protease com sulfato de amônio (40, 60 e 80% de saturação) não resultou em boa recuperação da enzima, desta forma o sobrenadante do meio de cultivo foi utilizado como preparação bruta para a etapa de purificação.

A Figura IV 4 ilustra a purificação da protease da linhagem *C. cellulans* 191 em coluna de DEAE-Sephadex A50 equilibrada em tampão fosfato 0,01 M, pH 7,0. As proteases foram adsorvidas na resina e eluídas com a solução tampão contendo 0,8 M de NaCl. Foram obtidos três picos de proteases, os quais foram denominados de P1, P2 e P3. Os picos P1, P2 e P3 apresentaram os seguintes fatores de purificação e rendimentos, respectivamente: 10,24 e 1,78%; 18,20 e 2,45% e 12,92 e 8,52% (Tabela IV 2).

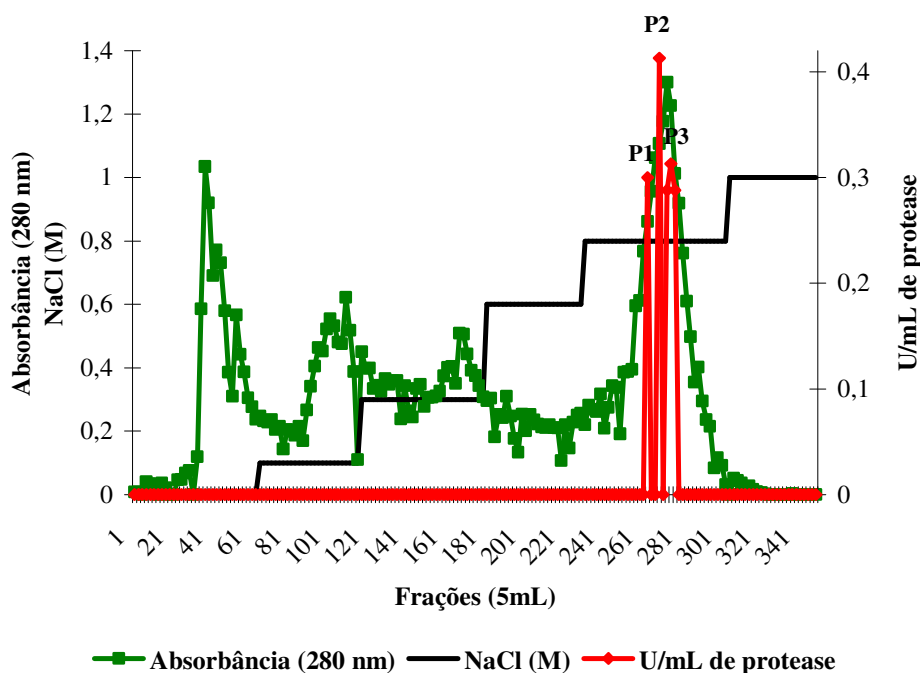


Figura IV 4. Purificação da protease da linhagem *Cellulosimicrobium cellulans* 191 através de cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-Sephadex A50

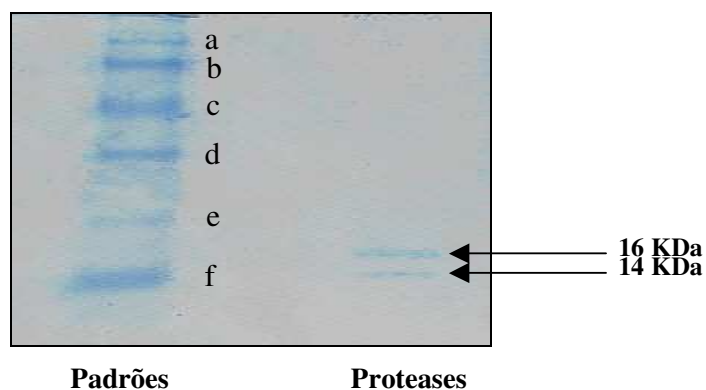
Tabela IV 2. Purificação da protease da linhagem *Cellulosimicrobium cellulans* 191 em coluna de DEAE-Sephadex A50

Extratos	Volume (mL)	U/mL de Protease	U total de Protease	Proteína (mg/mL)	Proteína Total (mg)	Ativ. Espec. Protease (U/mg)	Rendimento de Protease (%)	Fator de Purificação
Bruto	20	4,2	84	7,88	157,6	0,53	100	1
P1	5	0,299	1,495	0,055	0,275	5,43	1,78	10,24
P2	5	0,413	2,065	0,043	0,214	9,65	2,45	18,20
P3	25	0,286	7,15	0,042	1,05	6,81	8,52	12,85

Para a continuidade dos estudos foi escolhido a fração de protease P3, que apresentou maior rendimento e fator de purificação de 12,85 dentre as frações ativas.

A Figura IV 5 ilustra a eletroforese da fração de protease P3, que foi selecionada para a aplicação na lise de leveduras e na formação de compostos antioxidantes. Em gel

SDS-PAGE a fração P3 apresentou duas bandas de proteínas. A banda 1 apresentou massa molecular de 16 KDa; enquanto a banda 2 apresentou massa molecular de 14 KDa (Figura IV 6).



Padrões: a- fosforilase b (94,0 KDa); b- albumina bovina (67,0 KDa); c- ovoalbumina (43,0 KDa); d- anidrase carbônica (30,0 KDa); e- inibidor de tripsina de soja (20,1 KDa); f- α -lactoalbumina (14,0 KDa)

Figura IV 5. Eletroforese da fração de protease P3 em gel SDS-poliacrilamida

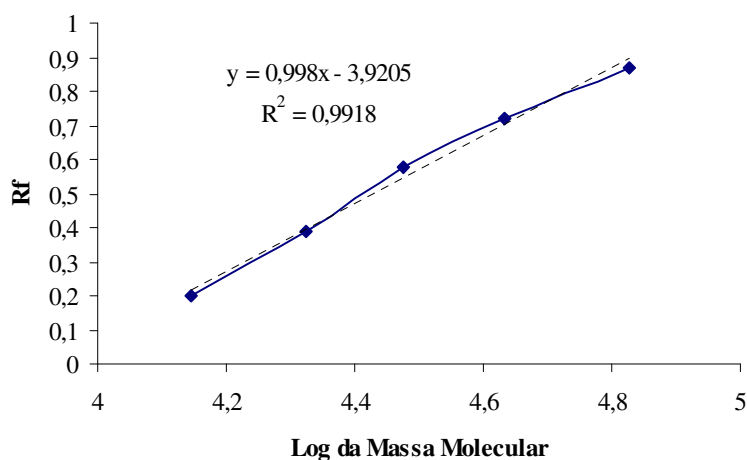


Figura IV 6. Relação entre o Rf e o log da massa molecular das proteínas em gel SDS-poliacrilamida para a determinação da massa molecular da fração de protease P3 parcialmente purificada

Saeki *et al.*⁴ purificaram e caracterizaram uma protease alcalina de *Oerskovia xanthineolytica* TK-1. A enzima foi purificada cerca de 39,6 vezes através de ultrafiltração, coluna de Fenil-Sepharose CL 4B e DEAE-Sephadex com rendimento de 19%. A massa molecular da enzima em eletroforese em gel de poliácridamida SDS foi de 20 KDa.

Santos¹³ purificou uma protease alcalina da linhagem *Cellulosimicrobium cellulans* 191 através de precipitação com sulfato de amônio 40% de saturação, coluna de troca iônica DEAE-Sepharose e Q-Sepharose e obteve um fator de purificação de 16,8 vezes e rendimento de 7,8%. A protease alcalina apresentou massa molecular 55 KDa, estimada por filtração em gel Sephacryl S-200.

O fungo filamentosso *Paecilomyces lilacinus* foi cultivado em meio líquido e a produção de proteases e quitinases foram induzidas pela presença de gema de ovo e quitina, respectivamente. A serina protease foi purificada do meio de cultivo usando coluna de afinidade com Sepharose-bacitracina, enquanto que a quitinase foi purificada em coluna de DEAE-Sephacel²².

Purificação parcial de quitinase através de cromatografia em coluna de filtração em gel Sepharose CL4B200 e eletroforese em SDS-PAGE

Foram realizados vários estudos de purificação parcial de quitinase em resinas de troca iônica. No primeiro estudo de purificação do extrato bruto de quitinase da linhagem *C. cellulans* 191 em coluna de DEAE-Sephadex A50 equilibrada em tampão fosfato 0,02 M, pH 7,0, a quitinase não foi adsorvida na coluna e a recuperação da enzima foi baixa. Em seguida, foi testada a purificação da quitinase em coluna de DEAE-Sephacel DCL6B equilibrada em tampão fosfato 0,01 M, pH 6,5. Nessas condições a quitinase não foi adsorvida na resina e foi eluída com o mesmo tampão, sendo obtido um fator de purificação de cerca de 3,5 vezes e um rendimento de 12,38%. Em coluna de DEAE-Sephacel DCL6B equilibrada em tampão fosfato 0,01 M, pH 8,0, a quitinase foi inativada, uma vez que não foi detectada atividade de quitinase nas frações eluídas. A quitinase foi purificada 6,65 vezes com recuperação de 46,62% utilizando-se coluna de filtração em gel Sepharose CL4B200 equilibrada em tampão fosfato 0,01 M, pH 7,0 (Figura IV 7 e Tabela IV 3).

A Figura IV 7 ilustra a purificação da quitinase da linhagem *C. cellulans* 191 em coluna de Sepharose CL4B200 equilibrada em tampão fosfato 0,01 M, pH 7,0 em que foi obtido um pico de quitinase, o qual foi denominado de fração Q1.

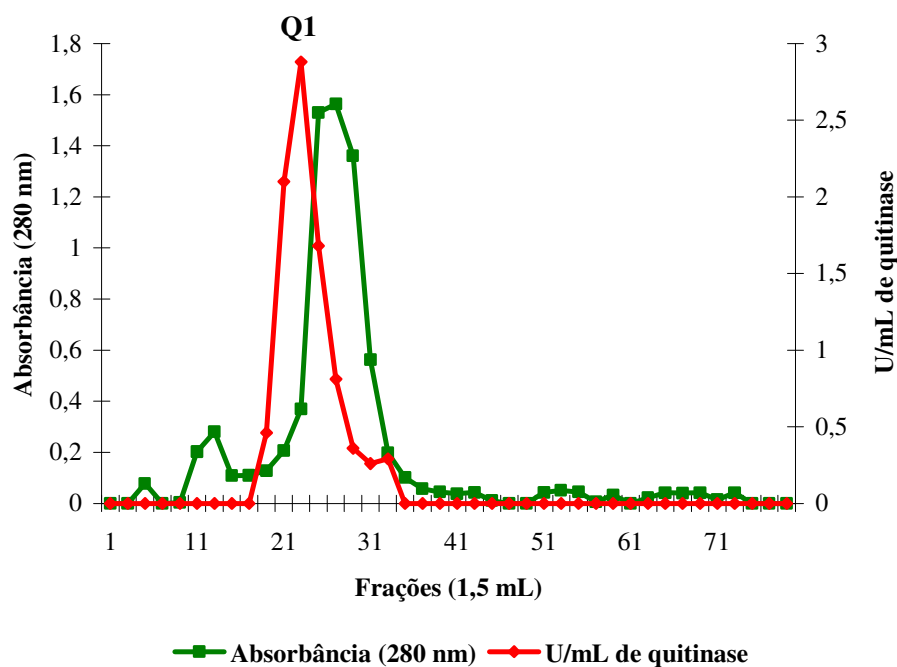
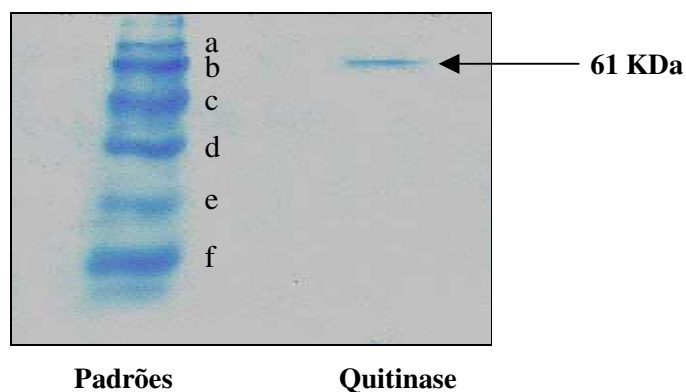


Figura IV 7. Purificação da quitinase da linhagem *Cellulosimicrobium cellulans* 191 em coluna de Sepharose CL4B200

Tabela IV 3. Purificação da quitinase da linhagem *Cellulosimicrobium cellulans* 191 em coluna de Sepharose CL4B200

Extratos	Volume (mL)	U/mL de quitinase	U total de quitinase	Proteínas (mg)	Proteínas Total (mg)	Ativ. Espec. de quitinase	Rendimento de quitinase (%)	Purificação
Bruto	5	6,9	34,5	16,63	83,15	0,41	100	1
Q1	6	2,68	16,08	0,98	5,88	2,73	46,61	6,65

A Figura IV 8 ilustra a eletroforese da quitinase purificada em gel SDS-PAGE, indicando a presença de uma única banda de proteína. A quitinase purificada apresentou massa molecular de 61 KDa em gel SDS-poliacrilamida (Figura IV 9).



Padrões: a- fosforilase b (94,0 KDa); b- albumina bovina (67,0 KDa); c- ovoalbumina (43,0 KDa); d- anidrase carbônica (30,0 KDa); e- inibidor de tripsina de soja (20,1 KDa); f- α -lactoalbumina (14,0 KDa)

Figura IV 8. Eletroforese da quitinase purificada em gel SDS-poliacrilamida

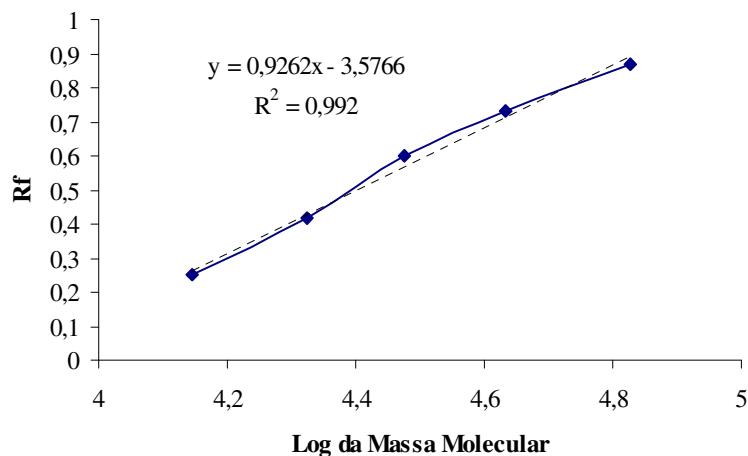


Figura IV 9. Relação entre o Rf e o log da massa molecular das proteínas em gel SDS-poliacrilamida para a determinação da massa molecular da quitinase purificada

Yamaguchi¹⁴ purificou a quitinase de *Cellulomonas cellulans* Fxx por fracionamento do sobrenadante do meio de cultivo com sulfato de amônio 80% de saturação e adsorção em coluna DEAE-Sepharose em tampão fosfato 0,02 M, pH 7,0

através de um sistema de FPLC. Foram obtidas duas frações, sendo que a fração de maior atividade foi purificada 6,29 vezes com rendimento de 12,01%.

A quitinase de *Cellulomonas flavigena* NTOU foi concentrada e purificada cerca de 20 vezes através de coluna Q-Cartridge, cromatografia de interação hidrofóbica e coluna Superdex 75-HR com rendimento de 5,64%. As massas moleculares das quitinases estimadas por filtração em gel e SDS-PAGE foram respectivamente; 34,2 KDa e 32,5 KDa¹⁵.

Três isoformas de endoquitinases (L, M e S) foram purificadas do meio de cultivo da linhagem *Bacillus* sp. MH-1 por cromatografia de afinidade com quitina e coluna Mono P. As isoformas L, M e N foram purificadas 20, 18 e 24 vezes com recuperação de 2,2%, 0,67% e 1,1%, respectivamente. As enzimas L, M e N apresentaram, em SDS-PAGE, respectivamente, massas moleculares de 71, 62 e 53 KDa¹⁶.

A quitinase de *Metarhizium anisopliae* foi purificada por precipitação com sulfato de amônio seguido de cromatografia de troca iônica em DEAE-Sephacel. A enzima purificada apresentou massa molecular de 30 KDa em SDS-PAGE²⁰.

Uma enzima quitinolítica foi purificada do filtrado da cultura de *Trichoderma harzianum* T198 por precipitação com sulfato de amônio seguida por cromatografia de afinidade com quitina, sendo obtido fator de purificação de 12,8 vezes e rendimento de 18%. A massa molecular da enzima foi estimada em 28,0 KDa através de cromatografia de filtração em gel e 27,5 KDa em SDS-PAGE²¹.

As preparações de β -1,3 glucanase, fração de protease P3 e quitinase parcialmente purificadas serão utilizadas nos experimentos de aplicação das enzimas e referidas como preparações purificadas.

CONCLUSÕES

Na fermentação da linhagem *C. cellulans* 191, em frascos agitados aletados, em meio de cultivo A composto por 2,0 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,2 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 10 g/L de parede celular de levedura em tampão fosfato 0,2 M, pH 7,5, a 30°C e 200 rpm, foi obtido 1,12 U/mL de β -1,3 glucanase após 24 h de fermentação. A β -1,3 glucanase foi purificada em coluna de DEAE-Sephadex A50 equilibrada em tampão fosfato 0,01M, pH 6,5. A enzima foi eluída no mesmo tampão contendo 0,6 M de NaCl e foi purificada 11,83 vezes com rendimento de 25%. A β -1,3 glucanase apresentou massa molecular de 45 KDa em eletroforese SDS-PAGE.

Na fermentação da linhagem *C. cellulans* 191, em frascos agitados, em meio de cultivo B composto por 2,0 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,2 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 80 g/L de levedura seca utilizada como indutor em tampão fosfato 0,15 M, pH 6,5, a 30°C e 150 rpm, foi obtido 4,2 U/mL de protease após 30 h de fermentação. As proteases foram purificadas em coluna de DEAE-Sephadex A50 equilibrada em tampão fosfato 0,01M, pH 7,0. As proteases foram eluídas no mesmo tampão contendo 0,8 M de NaCl. Foram obtidas três frações de proteases denominadas P1, P2 e P3 que apresentaram os seguintes fatores de purificação e rendimentos, respectivamente: 10,24 e 1,78; 18,20 e 2,45% e 12,92% e 8,52%. A fração 3 apresentou duas bandas de massas moleculares de 14 e 16 KDa em eletroforese SDS-PAGE.

Na fermentação da linhagem *C. cellulans* 191, em frascos agitados, em meio de cultivo C composto por 4,0 g/L de extrato de levedura; 2,0 g/L de triptona; 4,0 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 1,2 g/L de KH_2PO_4 ; 2,8 g/L de K_2HPO_4 e 15 g/L de quitina neutralizada utilizada como indutor de pH 6,5, a 25°C e 200 rpm, foi obtido 6,9 U/mL de quitinase após 72 h de fermentação. A quitinase foi purificada 6,65 vezes em coluna de filtração em gel Sepharose CL4B200 equilibrada em tampão fosfato 0,01 M, pH 7,0, com rendimento de 46,61%. A quitinase purificada apresentou massa molecular de 61 KDa em eletroforese SDS-PAGE.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Fleuri, L. F.; Sato, H. H. Produção, purificação, clonagem e aplicação de enzimas líticas. *Quim. Nova.* v. 28, n. 5, p. 871, 2005.
2. Shimoi, H.; Muranaka, Y.; Sato, S.; Saito, K.; Tadenuma, M. Purification of the enzymes responsible for the lysis of yeast cell by *Rarobacter faecitabidus*. *Agr. Biol. Chem.* v. 55, p. 371, 1991.
3. Ventom, A. M.; Asenjo, J. A. Purification of the major glucanase of *Oerskovia xanthineolytica* LL-G109. *Biotech. Tech.* v. 4, n. 3, p. 165, 1990.
4. Saeki, K.; Iwata, J.; Yamazaki, S.; Watanabe, Y.; Tamai, Y. Purification and characterization of a yeast lytic β -1,3-glucanase from *Oerskovia xanthineolytica* TK-1. *J. Ferment. Bioeng.* v. 78, p. 407, 1994.
5. Parrado J.; Escudero, P. R.; Conejero-Lara, F.; Kotik, N.; Ponting, C. P.; Asenjo, J. A.; Dobson, C. M. Molecular characterization of a thermoactive beta-1,3-glucanase from *Oerskovia xanthineolytica*. *Biochim. Biophys. Acta.* v. 1296, p. 145, 1996.
6. Ferrer, P.; Hedegaard, L.; Halkier, T.; Diers, I.; Savva, D.; Asenjo, J. A. Molecular cloning of a lytic β -1,3 glucanase gene from *Oerskovia xanthineolytica* LLG109. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* v. 782, p. 555, 1996.
7. Ferro, L. A.; Produção, Purificação e Caracterização da enzima β -1,3 glucanase de *Cellulomonas cellulans* YLM-B191-1 e ação da enzima na parede celular de leveduras. *Tese de Doutorado* - FEA - Universidade Estadual de Campinas, Brasil, 2002, 175 p.
8. Soares, G. A. M. Enzimas que lisam a parede celular de leveduras – Clonagem e sequenciamento do gene da β -1,3 glucanase lítica de *Cellulomonas cartae* 191. *Tese de Doutorado* - FEA - Universidade Estadual de Campinas, Brasil, 2002, 113 p.
9. Miyanishi, N.; Hamada, N.; Kobayashi, T.; Imada, C.; Watanabe, E. Purification and characterization of a novel extracelular β -1,3 glucanase produced by *Bacillus clausii* NM1 isolated from ezo abalone *Haliotis discus hannai*. *J. Biosci. Bioeng.* v. 95, p. 45, 2003.
10. Thrane, C.; Tronsmo, A.; Jensen, D. F. Endo-1,3- β -glucanase and cellulase from *Trichoderma harzianum*: purification and partial characterization, induction of

- biological activity against plant pathogenic *Pythium* spp. *Eur. Plant Pathol.* v. 103, p. 331, 1997.
11. Noronha, E. F.; Ulhoa, C. J. Characterization of a 29-KDa β -1,3 glucanase from *Trichoderma harzianum*. *Microbiol. Lett.* v. 183, p. 119, 2000.
 12. Bara, M. T. F.; Lima, A. L.; Ulhoa, C. J. Purification and characterization of an exo- β -1,3 glucanase produced by *Trichoderma asperellum*. *FEMS Microbiol. Lett.* v. 219, p. 81, 2003.
 13. Santos, L. F. Produção, purificação, caracterização e estudo da aplicação de uma protease alcalina produzida por *Cellulosimicrobium cellulans* 191. *Tese de Doutorado - FEA - Universidade Estadual de Campinas, Brasil*, 2004, 97 p.
 14. Yamaguchi, M. M. Seleção, produção e caracterização da enzima quitinase. *Tese de Doutorado - FEA - Universidade Estadual de Campinas, Brasil*, 2003, 83 p.
 15. Chen, C.; Hsu, M.; Jiang, S. Purification and characterization of an exo-N,N'-diacetylchitobiohydrolase-like enzyme from *Cellulomonas flavigena* NTOU 1. *Enzyme Microb. Technol.* v. 20, p. 191, 1997.
 16. Sakai, K.; Yokota, A.; Kurokawa, H.; Wakayama, M.; Moriguchi, M. Purification and characterization of three thermostable endochitinases of a novel *Bacillus* strain, MH-1, isolated from chitin-containing compost. *Appl. Environ. Microbiol.* v. 64, p. 3397, 1998.
 17. Chang, W. T.; Chen, C. S.; Wang, S. L. An antifungal chitinase produced by *Bacillus cereus* with shrimp and crab shell powder as a carbon source. *Current Microbiol.* v. 47, n. 2, p. 102, 2003.
 18. Yuli, P. E.; Suhartono, M. T.; Rukayadi, Y.; Hwang, J. K.; Pyun, Y. R. Characteristics of thermostable chitinase enzymes from the Indonesian *Bacillus* sp 13.26. *Enzyme and Microbial Technol.* v. 35, p. 147, 2004.
 19. Nawani, N. N.; Kapadnis, B. P. Production dynamics and characterization of chitinolytic system of *Streptomyces* sp NK1057, a well equipped chitin degrader. *World J Microbiol. Biotech.* v. 20, n. 5, p. 487, 2004.
 20. De Siqueira Pinto, A.; Barreto, C. C.; Schrank, A.; Ulhoa, C. J.; Henning Vainstein, M. Purification and characterization of an extracellular chitinase from the entomopathogen *Metarhizium anisopliae*. *Can. J. Microbiol.* v. 43, p. 322, 1997.

21. Deane, E. E.; Whipps, J. M.; Lynch, J. M.; Peberdy, J. F. The purification and characterization of *Trichoderma harzianum* exochitinase. *Biochim. Biophys. Acta.* v. 1383, p. 101, 1998.
22. Khan, A.; Williams, K.; Molloy, M. P.; Nevalainen, H. Purification and characterization of serine protease and chitinases from *Paecilomyces lilacinus* and detection of chitinase activity on 2D gels. *Protein Expression Purif.* v. 32, p. 210, 2003.
23. Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, L. A.; Randall, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* v. 193, p. 265, 1951.
24. Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* v. 227, p. 680, 1970.

CAPÍTULO V: APLICAÇÕES DE β -1,3 GLUCANASE, PROTEASE E QUITINASE DA LINHAGEM *Cellulosimicrobium cellulans* 191

RESUMO

O presente trabalho visou a aplicação das preparações purificadas de β -1,3 glucanase e protease da linhagem *Cellulosimicrobium cellulans* 191 e das preparações bruta e purificada da quitinase da linhagem *C. cellulans* 191. A β -1,3 glucanase purificada da linhagem *C. cellulans* 191 apresentou atividade de lise de diversas leveduras e foi capaz de formar protoplastos da levedura *Saccharomyces cerevisiae* KL-88. O pré-tratamento das leveduras com protease P3 purificada não aumentou a lise das leveduras com a β -1,3 glucanase. A quitinase purificada foi capaz de lisar algumas espécies de fungos sob observação em microscópio óptico, mas não foi capaz de inibir, em placas de ágar batata dextrose, o crescimento dos fungos testados. A preparação bruta de quitinase apresentou halo de inibição do crescimento de alguns fungos estudados em placas de ágar batata dextrose. Os produtos formados pela reação da β -1,3 glucanase purificada sobre a laminarina e da protease purificada sobre a levedura seca apresentaram poder antioxidante.

SUMMARY

The aim of this work was the application of purified preparations of β -1,3 glucanase and protease and of crude and partially purified preparations of chitinase, all obtained from *Cellulosimicrobium cellulans* strain 191. The purified β -1,3 glucanase presented lysis activity against several yeasts and was able to form protoplasts from the *Saccharomyces cerevisiae* KL-88 yeast. The purified protease P3 from *C. cellulans* strain 191 showed no yeast cell lysis activity. The purified chitinase from *C. cellulans* strain 191 was able to lyse some fungal species under observation in an optical microscope, but was unable to inhibit the growth of the fungi tested in potato dextrose agar plates. The crude chitinase preparation presented growth inhibition halos in potato dextrose agar plates with some of the fungi studied. The products formed from the reaction between the purified β -1,3 glucanase and laminarin and between the purified protease and the dry yeast presented antioxidant power.

INTRODUÇÃO

As enzimas β -1,3 glucanases, proteases e quitinases na forma bruta e parcialmente purificadas apresentam diversas aplicações biotecnológicas.

Uma grande quantidade de produtos podem ser isolados e purificados da célula microbiana com o auxílio da lise enzimática^{1,2,3} como, por exemplo: peptídeos, polissacarídeos, proteínas recombinantes, ácidos nucléicos, pigmentos, enzimas, lipídeos, entre outros. Além do potencial de aplicação na preparação de protoplastos, fusão celular e transformação de leveduras, pode-se ressaltar sua aplicação na obtenção de enzimas intracelulares, preparação do polissacarídeo glucana, extração alcalina de proteínas de leveduras, pré-tratamento para lise mecânica de células em Dyno-Mill, produção de extrato de levedura, extração de pigmentos de leveduras vermelhas como por exemplo extração do pigmento vermelho astaxantina de *Phaffia rhodozyma*⁴ e lise de microrganismos que provocam a cárie dentária⁵. A lise de células de leveduras com enzimas permite seletividade na liberação de produtos, independe da escala e pode ser realizada em condições de pH e temperatura que não implicam na desnaturação de produtos celulares de interesse⁶.

As enzimas líticas podem ser utilizadas para a lise da parede celular de leveduras para diferentes finalidades, como: preparação de extrato de levedura⁷; aumento da eficiência de desintegrador mecânico para extração de compostos intracelulares e ligados à célula⁸; aumento da digestibilidade de ração animal^{8,9}; preservação de alimentos^{10,11}; obtenção de fonte de proteína unicelular para animais e humanos¹²; aumento do valor alimentício de cereais quando se utilizam altas proporções de polissacarídeos sem amido¹³; obtenção de mananas de diferentes fontes que apresentam atividade antioxidante e antimutagênica¹⁴; melhoramento da clarificação e filtração de vinhos¹⁵; síntese de novos substratos para β -1,3 e β -1,4 glucanases por meio de reações de transglicosilação catalisadas por β -1,3 glucanases¹⁶; redução da viscosidade do produto final no processo de fabricação de cerveja⁹; elucidação da estrutura, composição e mecanismo da síntese da parede celular de leveduras¹⁷⁻²⁵.

As enzimas quitinolíticas apresentam inúmeras aplicações no ramo da indústria e agricultura. As quitinases podem ser utilizadas no controle de fungos patógenos de plantas

e insetos. Há também, um crescente interesse na produção de quitinooligossacarídeos biologicamente ativos através da utilização das quitinases. Essas enzimas podem ainda ser aplicadas na produção de fonte de proteína unicelular, preparação de enzimas micolíticas e na formação de protoplastos fúngicos²⁶.

Alguns trabalhos relatam as aplicações de quitinases e β -1,3 glucanases no setor agrotecnológico. Wiwat *et al.*²⁷ produziram quitinase a partir de *Bacillus circulans* 41 para uso como suplemento de bioinseticida de *B. thuringiensis* para o controle de larvas de lepidópteros. Zhang e Yuen²⁸ utilizaram um sistema lítico composto por quitinase, protease, β -1,3 glucanase e lipase para o controle de manchas nas folhas de centeio causadas por *Biopolaris sorokiniana*.

β -1,3 glucanases e quitinases produzidas por plantas em resposta às infecções causadas por microrganismos patogênicos têm sido purificadas e utilizadas para testes de atividade antifúngica. Sela-Buurlage *et al.*²⁹ verificaram a atividade antifúngica de diferentes isoformas de quitinases e β -1,3 glucanases do tabaco contra esporos de *Fusarium solani*. Ji e Kùc³⁰ observaram a atividade fungicida de β -1,3 glucanase e quitinase de pepino (*Cucumis sativus* L.) sobre *Colletotrichum lagenarium*. Beffa *et al.*³¹ verificaram que β -1,3 glucanases de plantas com atividade antifúngica apresentam função na patogênese viral, atuando sobre o vírus do tabaco de Havana 425 e sobre *Nicotiniana glauca* (vírus que causa necrose no tabaco). Kim e Hwang³² utilizaram uma β -1,3 glucanase purificada de raiz de pimenta para inibir o crescimento das hifas do fungo *Phytophthora capsici*. O efeito sinérgico da β -1,3 glucanase e de uma quitinase também produzida pela pimenta ocasionou inibição do crescimento das hifas de *F. oxysporum* var. *cucumerinum* e *P. capsici*. O mecanismo de resposta de plantas infectadas induz a produção de β -1,3 glucanases e quitinases. Essas enzimas estão relacionadas à patogênese e são indicadoras do sistema de resistência da planta. Em geral, são encontradas em compartimentos onde há as lesões causadas por fungos e vírus infectantes^{33,34}.

As enzimas líticas, principalmente β -1,3 glucanases e quitinases, também são produzidas por microrganismos que exercem função antagônica aos fitopatógenos. À essas enzimas se atribuiu o efeito de fungitoxicidade sobre o patógeno e a eficácia do biocontrole de organismos antagonistas⁶.

Este trabalho visou a aplicação das preparações purificadas de β -1,3 glucanase, protease e das preparações bruta e purificada da quitinase da linhagem *Cellulosimicrobium cellulans* 191, no estudo da lise e formação de protoplastos de leveduras, lise e inibição de fungos e obtenção de compostos antioxidantes.

MATERIAL E MÉTODOS

Aplicações das enzimas purificadas

Aplicação da β -1,3 glucanase e protease purificadas na lise de leveduras

A capacidade das preparações enzimáticas purificadas de β -1,3 glucanase e protease P3 de lisar a parede celular de leveduras foi testada com células viáveis de *Saccharomyces cerevisiae* KL-88, *Saccharomyces capensis*, *Debaromyces vanriji*, *Pachysolen tannophilus*, *Kluyveromyces drosophilarum*, *Candida glabrata*, *Hansenula mrakii* e *Pichia membranaefaciens*.

Obtenção das suspensões de células de leveduras

Para a obtenção de células de leveduras, uma alçada das culturas de leveduras crescidas em tubos inclinados de meio YEPD composto de 1% de extrato de levedura, 2% de peptona, 2% de glicose e 2% de ágar, foi transferida para frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio YEPD líquido. Os frascos foram incubados em agitador rotatório a 30°C, 100 rpm por 20 h. As células foram coletadas por centrifugação a 7.840 g por 10 min a 5°C e lavadas duas vezes com água destilada. Estas células foram ressuspensas em tampão fosfato 0,1 M, pH 6,5 até obter-se uma suspensão com densidade ótica igual a 1,68 a 660 nm. As suspensões de células de leveduras foram utilizadas para o teste de lise enzimática da parede celular pelas enzimas β -1,3 glucanase e protease P3 purificadas, como descrito a seguir.

Determinação da atividade lítica

A atividade de lise foi determinada segundo o método de Ventom e Asenjo³⁵ modificado. A mistura para lise enzimática de células de leveduras continha 1 mL de suspensão celular, enzima (s) purificada (s) e tampão fosfato 0,1 M, pH 6,5 para completar o volume para 2 mL³⁶. Para a lise de leveduras com β -1,3 glucanase purificada, a mistura de reação contendo 0,1 U da enzima purificada/mL de suspensão, foi incubada a 30°C por

1, 2 e 3 h, sob agitação em tempos regulares. Para a lise de leveduras com protease P3 e β -1,3 glucanase purificadas, a mistura de reação contendo 0,15 U de protease P3 purificada/mL de suspensão foi pré-tratada a 30°C por 1 h e em seguida adicionado 0,1 U de β -1,3 glucanase purificada/mL de suspensão, e incubada a 30°C por 1, 2 e 3 h, sob agitação em tempos regulares.

Simultaneamente, foi preparado, como referência, um tubo branco onde no lugar da solução enzimática purificada foi acrescentado tampão fosfato 0,1 M, pH 6,5.

A atividade lítica foi determinada pela diminuição da turbidez da suspensão de levedura e calculada por modificação do método descrito por Obata *et al.*³⁶ através das equações:

$$\text{DO Branco T0}' - \text{DO Branco T60}' = X$$

$$\text{DO Amostra T0}' - \text{DO Amostra T60}' = Y$$

$$\text{Absorbância obtida} = Y - X$$

Uma unidade de liticase foi definida como a diminuição de 0,1 unidades de absorbância nas condições de ensaio a 660 nm.

Aplicação da β -1,3 glucanase purificada na lise de leveduras - Observação em microscópio óptico

As leveduras foram incubadas com β -1,3 glucanase purificada (0,1 U/mL de suspensão) a 30°C por 3 h e a lise foi observada em microscópio óptico com aumento de 1000 vezes (imersão). Como controle utilizou-se leveduras em tampão sem adição da enzima, incubadas no mesmo tempo e temperatura.

Aplicação da β -1,3 glucanase purificada na formação de protoplastos - Observação em microscópio óptico

As células da levedura *Saccharomyces cerevisiae* KL-88, obtidas como descrito anteriormente, foram coletadas por centrifugação e ressuspendidas em solução isotônica de KCl 0,7 M em tampão fosfato 0,2 M, pH 6,5. A mistura de reação contendo 1 mL da suspensão de levedura com densidade ótica igual a 1,68 a 660 nm e 0,1 U de β -1,3 glucanase purificada/mL de suspensão, foi incubada a 30°C por 2 h, e a formação de

protoplastos foi observada em microscópio óptico com aumento de 1000 vezes (imersão). Como controle foi utilizada mistura de reação contendo as leveduras em solução isotônica sem a adição da enzima, incubada no mesmo tempo e temperatura.

Aplicação da quitinase purificada na lise de fungos – Observação em microscópio óptico

Obtenção de células fúngicas

Os fungos *Rhizopus oligosporus*, *Mucor miehei*, *Penicillium* sp., *Aspergillus oryzae*, *Streptomyces phaeochromogenes*, *Aspergillus niger*, *Paecilomyces* sp. e *Trichoderma viride* foram utilizados para o estudo de lise. Os fungos foram crescidos em placas contendo meio de cultivo ágar batata dextrose por 10 dias a 28°C. Uma alçada de cada fungo foi transferida assepticamente para frascos Erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL do meio de cultivo composto por 10 g/L de amido solúvel; 0,3 g/L de caseína livre de vitaminas; 2,0 g/L de KNO₃; 2,0 g/L de NaCl; 0,05 g/L de MgSO₄. 7 H₂O; 0,01 g/L de FeSO₄. 7 H₂O e 0,02 g/L de CaCO₃ e incubados a 28°C a 150 rpm por 20 h. Esse procedimento foi realizado para promover a germinação dos esporos. Após a germinação, o material foi centrifugado a 2.822 g por 6min a 5°C. O micélio foi lavado 3 vezes com água destilada e ressuspendido em tampão fosfato 0,2 M, pH 5,8.

Aplicação da quitinase purificada na lise de fungos

A mistura de reação contendo 0,5 mL de suspensão fúngica em tampão fosfato 0,2 M, pH 5,8 e 0,5 U de quitinase purificada/mL de suspensão do fungo, foi incubada a 30°C por 2 h, sob agitação em tempos regulares. A lise celular foi observada em microscópio óptico com aumento de 1000 vezes (imersão). Como controle foi utilizada mistura de reação contendo a suspensão fúngica sem a adição da enzima, incubada no mesmo tempo e temperatura.

Aplicação das preparações bruta e purificada de quitinase na inibição de fungos

Para a detecção da atividade inibitória das preparações bruta e purificada de quitinase sobre fungos, uma alíquota de 0,5 mL de suspensão de fungo foi adicionada em poço de 0,25 cm de diâmetro na parte central de placas de ágar batata dextrose. No 1º e 2º dia foi aplicado 0,5 U de preparação bruta ou purificada no poço central das placas. As placas foram incubadas a 28°C por 10 dias. A atividade inibitória da quitinase purificada sobre fungos foi determinada pela medida do diâmetro do halo de inibição como descrito por Roberts *et al.*³⁷.

Aplicação das enzimas β -1,3 glucanase, protease P3 e quitinase purificadas na formação de compostos antioxidantes

Foram utilizados diferentes substratos para a atuação das enzimas purificadas. Após incubação das enzimas com os substratos, foi determinada a atividade antioxidante na mistura de reação.

A laminarina (Sigma), a glucana insolúvel³⁸ e a parede celular de levedura (Prodesa) foram utilizadas como substrato para β -1,3 glucanase purificada. A mananaproteína³⁹, a levedura seca (Fleischmann) e a levedura autoclavada³⁸ foram utilizadas como substrato para a protease purificada; enquanto que a quitina coloidal³⁸, a quitina neutralizada³⁸, e a *swollen* quitina⁴⁰, foram utilizadas como substrato para a quitinase purificada.

A mistura de reação contendo 0,5% do substrato em tampão fosfato 0,5 M, pH 6,0 e a enzima parcialmente purificada (0,1 U de β -1,3 glucanase purificada/mL de suspensão ou 0,15 U de protease purificada/mL de suspensão ou 0,5 U de quitinase purificada/mL de suspensão) foram incubadas a 50°C por 30 e 60 min. Após o tempo de reação, a mistura foi centrifugada por 3 min a 6.000 rpm a temperatura ambiente. A atividade antioxidante no sobrenadante da mistura de reação, foi determinada pelo método do DPPH.

Atividade seqüestrante do radical DPPH pelos produtos formados pela ação das enzimas purificadas sobre diferentes substratos

A medida da atividade seqüestrante de radicais DPPH (1,1-difenil-2-picrilidrazil) foi realizada de acordo com metodologia descrita por Zhu *et al.*⁴¹ e Chen *et al.*⁴². O DPPH é um radical livre estável que aceita um elétron ou radical hidrogênio para tornar-se uma molécula diamagnética e desta forma, é reduzida na presença de um antioxidante. Na forma de radical, o DPPH possui uma absorção característica a 517 nm, a qual desaparece após a redução pelo hidrogênio cedido de um composto antioxidante. Adicionou-se 2,5 mL da solução do radical DPPH (0,1 mg/100mL) à mistura de 0,5 mL do sobrenadante da mistura de reação enzimática e a diminuição da absorbância foi medida a 517 nm após 30 min. As amostras que apresentaram atividade antioxidante foram monitoradas até 120 min. A atividade anti-radical foi determinada em termos de porcentagem de inibição (PI), a qual foi calculada através da taxa de declínio da absorção da solução de DPPH dos produtos formados, após o tempo de reação, com a absorção da solução controle, de acordo com a fórmula:

$$PI (\% \text{ de inibição}) = [A(0) - A(t) / A(0)] \times 100$$

Onde A (0) = Abs da solução referência de DPPH-etanol (80%)

A (t) = Abs da solução DPPH-produto após diferentes tempos de reação

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Aplicação da β -1,3 glucanase e protease P3 purificadas na lise de leveduras

A Tabela v 1 e a Figura v 1 ilustram a atividade de lise de leveduras das preparações purificadas de β -1,3 glucanase e protease P3. A lise das leveduras *Saccharomyces cerevisiae* KL-88, *Saccharomyces capensis*, *Debaromyces vanriji*, *Pachysolen tannophilus*, *Kluyveromyces drosophilarum*, *Candida glabrata*, *Hansenula mrakii* e *Pichia membranaefaciens*, utilizando 0,1 U de β -1,3 glucanase purificada/mL de suspensão celular, aumentou gradativamente com o aumento do tempo de exposição da levedura à enzima.

Após 3 h de incubação com a β -1,3 glucanase purificada, as linhagens *D. vanriji* (52,96% de lise relativa), *P. tannophilus* (100% de lise relativa) e *H. mrakii* (81,15% de lise relativa) mostraram-se mais sensíveis à ação da β -1,3 glucanase purificada, enquanto que as linhagens *S. cerevisiae* KL-88 (15,12% de lise relativa), *S. capensis* (10,87% de lise relativa) e *C. glabrata* (8,43% de lise relativa) mostraram-se mais resistentes à ação da enzima. As linhagens *K. drosophilarum* e *P. membranaefaciens* apresentaram porcentagem relativa de lise de 20,64% e 21,93%, respectivamente.

A utilização de 0,15 U de protease P3 purificada/mL de suspensão celular como pré-tratamento seguido da adição de 0,1 U de β -1,3 glucanase purificada/mL de suspensão celular, resultou, em geral, na diminuição da porcentagem de lise celular das leveduras. Em alguns casos não houve lise na presença de protease P3 (*S. capensis*, *D. vanriji* e *C. glabrata*).

Tabela v 1. Estudo da lise de *Saccharomyces cerevisiae* KL-88, *Saccharomyces capensis*, *Debaromyces vanriji*, *Pachysolen tannophilus*, *Kluyveromyces drosophilum*, *Candida glabrata*, *Hansenula mrakii* e *Pichia membranaefaciens* utilizando as preparações de β -1,3 glucanase e protease P3 purificadas

Leveduras	% Atividade Relativa de Lise					
	Enzima (tempo de reação)					
	β -1,3 glucanase (1h)	β -1,3 glucanase (2h)	β -1,3 glucanase (3h)	Protease P3 (1h) + β -1,3 glucanase (1h)	Protease P3 (1h) + β -1,3 glucanase (2h)	Protease P3 (1h) + β -1,3 glucanase (3h)
<i>S. cerevisiae</i> KL-88	3,76	8,37	15,12	3,03	3,55	3,77
<i>S. capensis</i>	4,96	8,16	10,87	0,00	0,00	0,00
<i>D. vanriji</i>	28,62	28,14	52,96	0,00	0,00	0,00
<i>P. tannophilus</i>	89,97	91,35	100,00	40,95	58,86	62,16
<i>K. drosophilum</i>	16,91	17,02	20,64	3,88	8,56	8,76
<i>C. glabrata</i>	5,67	6,37	8,43	0,00	0,00	0,00
<i>H. mrakii</i>	24,13	46,96	81,15	2,37	10,08	16,25
<i>P. membranaefaciens</i>	10,67	17,7	21,93	6,28	20,21	20,56

A parede celular de *Saccharomyces cerevisiae* é composta por 48 a 60% de glucana, 20 a 23% de mananaproteínas e 0,6 a 2,7% de quitina^{5,10,11}. A parede celular de outras leveduras são pouco estudadas. A composição da parede celular varia conforme a espécie e gênero de levedura e de acordo com as condições de cultivo¹⁷. Segundo Osumi²¹, a parede celular de *Saccharomyces pombe* é composta principalmente de β -glucana e α -galactomanana. Aguilar-Uscanga²⁵ relatou a variabilidade da composição da parede celular de *S. cerevisiae* devido às diferentes condições de crescimento. Neste trabalho a β -1,3 glucanase purificada da linhagem *C. cellulans* 191 atuou diferentemente na lise das leveduras, provavelmente devido à diferença na composição da parede celular das leveduras.

O pré-tratamento com protease seguido do tratamento com β -1,3 glucanase resultou em menor lise em relação ao tratamento somente com a β -1,3 glucanase. Diversos pesquisadores relataram que para a lise da parede celular, a protease deve atuar primeiro³⁶ ou que as enzimas líticas (proteases e β -1,3 glucanases) devem agir sinergicamente na lise da parede celular, sendo que as proteases degradam a camada externa de mananaproteína e as β -1,3 glucanases degradam a camada interna de glucana^{5,11}. Neste estudo foi verificado

que a β -1,3 glucanase purificada de *C. cellulans* 191 lisou a parede celular de diferentes leveduras sem a necessidade de protease lítica. O pré-tratamento das leveduras com a protease purificada P3 seguido de tratamento com a β -1,3 glucanase purificada, resultou em menor lise das leveduras, provavelmente porque a protease hidrolisou a β -1,3 glucanase diminuindo a atividade da mesma. A protease purificada P3 sozinha não apresentou capacidade de lisar a parede celular das leveduras estudadas.

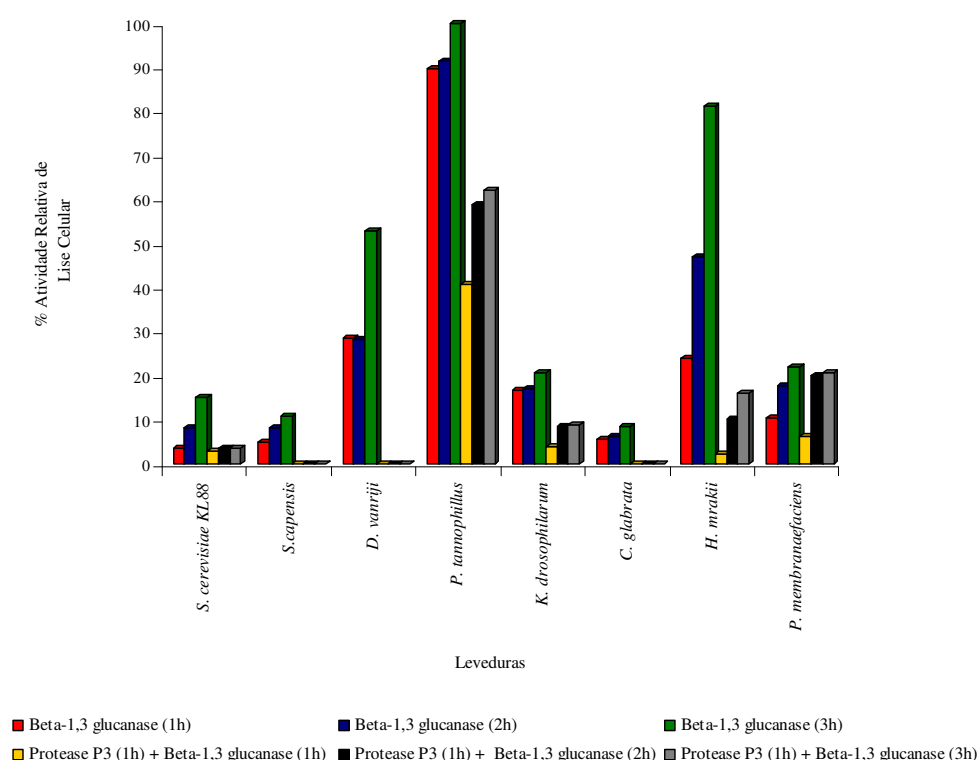


Figura v 1. Estudo da lise de *Saccharomyces cerevisiae* KL-88, *Saccharomyces capensis*, *Debaromyces vanriji*, *Pachysolen tannophilus*, *Kluyveromyces drosophilorum*, *Candida glabrata*, *Hansenula mrakii* e *Pichia membranaefaciens* utilizando as preparações de β -1,3 glucanase e protease P3 purificadas

Em estudo anterior³⁸ verificou-se que a preparação bruta de β -1,3 glucanase da linhagem *Cellulosimicrobium cellulans* 191 fracionada com sulfato de amônio 60% de saturação, apresentou atividade de lise das leveduras *Kluyveromyces lodderi*, *Saccharomyces cerevisiae* (levedura de panificação Fleischmann), *Saccharomyces*

cerevisiae (levedura de panificação Itaiquara) e sobre as linhagens *killer Saccharomyces cerevisiae* KL-88, *Saccharomyces diastaticus* NCYC 713, *Saccharomyces cerevisiae* NCYC 1001, *Candida glabrata* NCYC 388, *Kluyveromyces marxianus* NCYC 587 e *Hansenula mrakii* NCYC 500. As linhagens *Kluyveromyces marxianus* NCYC 587 e *Hansenula mrakii* NCYC 500 mostraram-se mais sensíveis à ação das β -1,3 glucanases e as linhagens de levedura Itaiquara e *Candida glabrata* NCYC 388 mostraram-se mais resistentes a ação das β -1,3 glucanases, quando comparada com a susceptibilidade das células da linhagem de *S. cerevisiae* KL-88 à preparação enzimática. O pré-tratamento das suspensões das leveduras com a preparação bruta de protease da linhagem *Cellulosimicrobium cellulans* 191, fracionada com sulfato de amônio 60% de saturação, diminuiu a lise das leveduras principalmente quando utilizada em altas concentrações.

Guilloux-benatier *et al.*¹ estudaram a atividade de lise da β -1,3 glucanase produzida pela bactéria *Oenococcus oeni* sobre células de *Saccharomyces cerevisiae* em diferentes fases de crescimento. Os autores verificaram que a β -1,3 glucanase foi capaz de lisar células viáveis e mortas de *S. cerevisiae*, sendo que as células nas fases de crescimento exponencial e na fase estacionária, foram lisadas mais facilmente. Kaneko *et al.*² verificaram que as células de leveduras são mais susceptíveis à lise enzimática quando tratadas com 2-mercaptoetanol ou cisteína. O 2-mercaptoetanol exerce o papel de uma protease lítica, destruindo a camada externa de mananaproteína da parede celular e permitindo o acesso da β -1,3 glucanase à camada de glucana. A fração A da preparação comercial Zymolyase, composta por uma β -1,3 glucanase, é capaz de causar lise da parede celular de leveduras somente na presença de 2-mercaptoetanol. As glucanases de alta massa molecular (maiores que 50 KDa) necessitam de uma protease para degradar a parede celular de leveduras, enquanto que as glucanases de baixa massa molecular (entre 12 e 29 KDa) podem lisar células de leveduras sem a presença de protease. Atravessando a camada externa de mananaproteína, as glucanases de baixa massa molecular conseguem ter acesso à camada interna de glucana. Além da massa molecular, a estrutura terciária das glucanases também é um fator importante, pois dependendo do arranjo, a enzima pode ou não atravessar a camada de mananaproteína e atingir a camada de glucana para provocar a lise celular³.

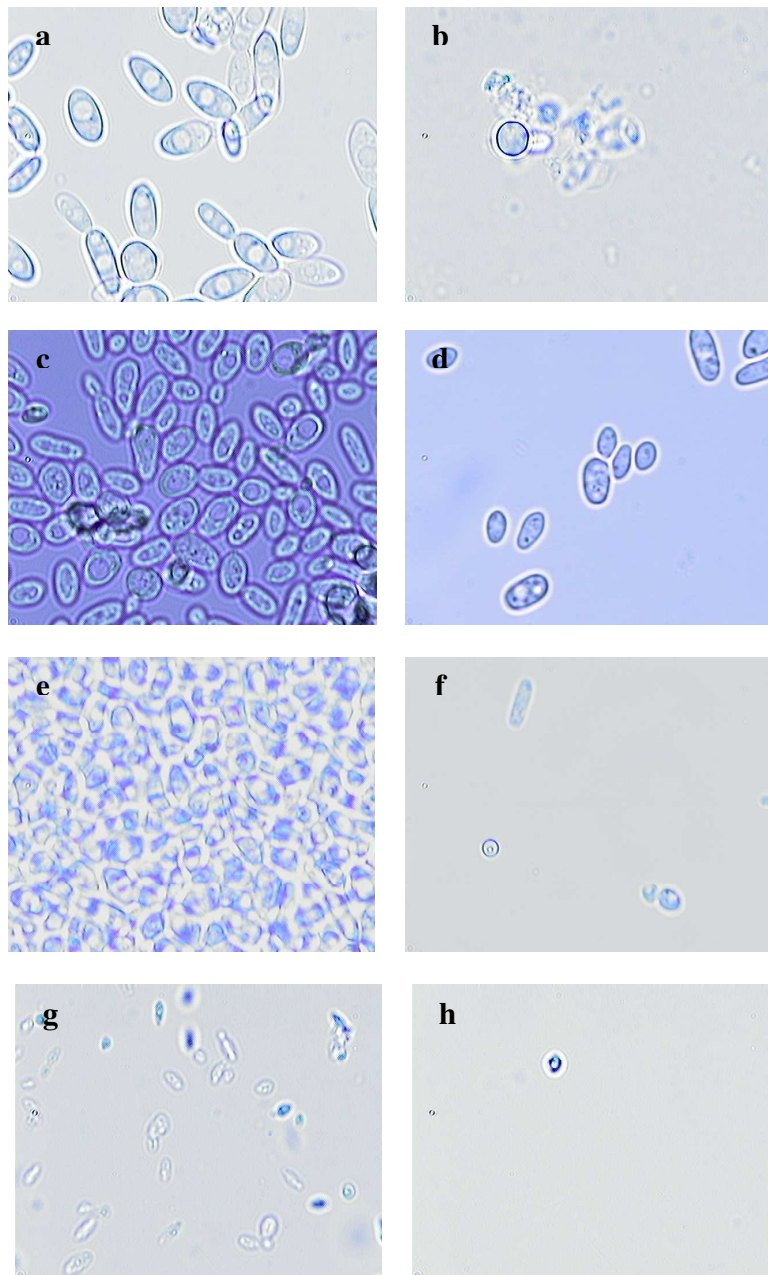
A Tabela v 1 ilustra que a β -1,3 glucanase purificada da linhagem *Cellulosimicrobium cellulans* 191 de 45 KDa em SDS-PAGE, foi capaz de lisar extensivamente células viáveis das leveduras *Debaromyces vanriji*, *Pachysolen tannophilus* e *Hansenula mrakii*, sem a presença de protease.

A enzima lisou, em menor proporção as leveduras *Saccharomyces cerevisiae* KL-88, *Saccharomyces capensis*, *Kluyveromyces drosophilarum*, *Candida glabrata* e *Pichia membranaefaciens*.

A adição de protease P3 purificada da linhagem *Cellulosimicrobium cellulans* 191 prejudicou a ação de lise da β -1,3 glucanase, sobre as leveduras testadas.

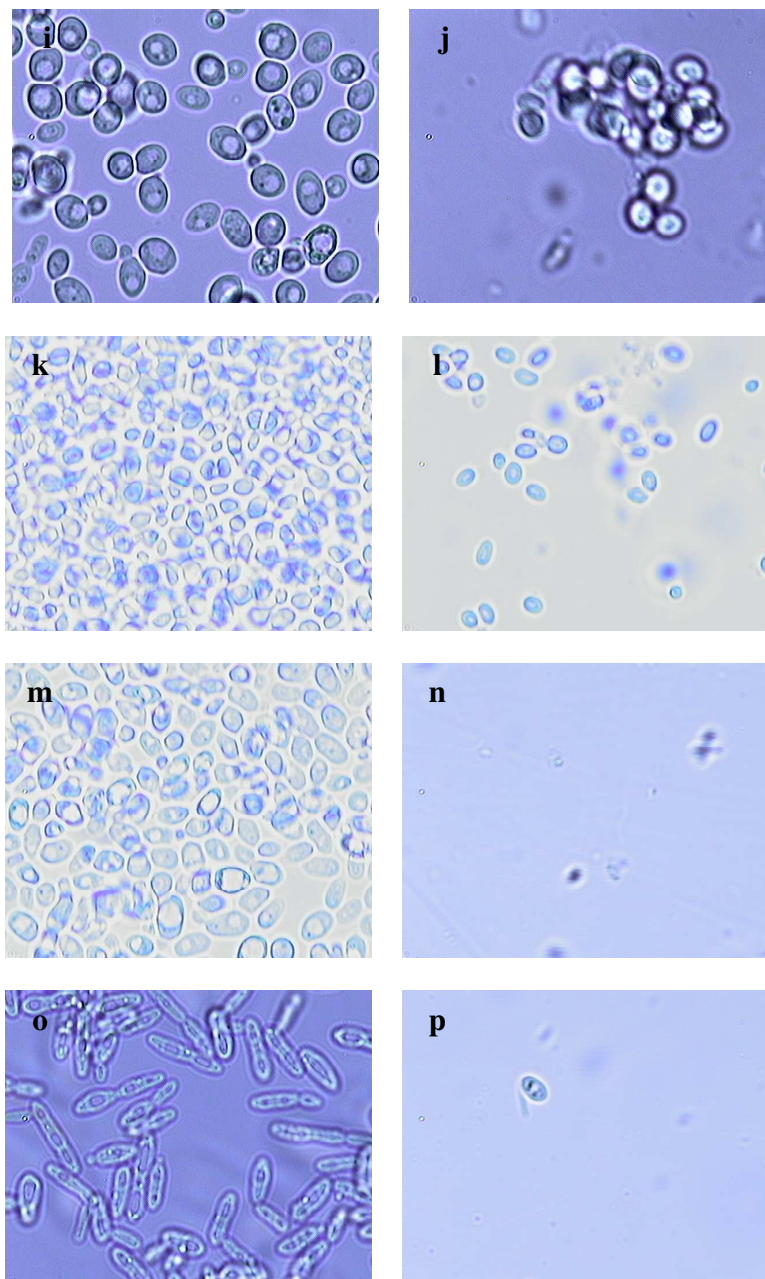
Aplicação da β -1,3 glucanase purificada na lise de leveduras - Observação em microscópio óptico

As Figuras v 2a, v 2c, v 2e, v 2g, v 2i, v 2k, v 2m e v 2o ilustram as células de leveduras em tampão fosfato 0,2 M, pH 6,5 sem tratamento com β -1,3 glucanase purificada; enquanto que as Figuras v 2b, v 2d, v 2f, v 2h, v 2j, v 2l, v 2n e v 2p ilustram as células de leveduras em tampão fosfato 0,1 M, pH 6,5 tratadas com 0,1 U de β -1,3 glucanase purificada/ mL de suspensão.



Observação em microscópio óptico com aumento de 1000 vezes (imersão), sendo: a- Controle *S. cerevisiae* KL88; b- *S. cerevisiae* KL88 tratada com β -1,3 glucanase purificada; c- Controle *S. capensis*; d- *S. capensis* tratada com β -1,3 glucanase purificada; e- Controle *K. drosophilarum*; f- *K. drosophilarum* tratada com β -1,3 glucanase purificada; g- Controle *P. tannophilus*; h- *P. tannophilus* tratada com β -1,3 glucanase purificada;

Figura v 2. Lise de leveduras com β -1,3 glucanase purificada



Observação em microscópio óptico com aumento de 1000 vezes (imersão), sendo: i- Controle *P. membranaefaciens*; j- *P. membranaefaciens* tratada com β -1,3 glucanase purificada; k- Controle *C. glabrata*; l- *C. glabrata* tratada com β -1,3 glucanase purificada; m- Controle *H. mrakii*; n- *H. mrakii* tratada com β -1,3 glucanase purificada; o- Controle *D. vanriji* e p- *D. vanriji* tratada com β -1,3 glucanase purificada

Figura v 2. Lise de leveduras com β -1,3 glucanase purificada

Verificou-se diminuição no número de células de leveduras, quando as leveduras foram tratadas com a β -1,3 glucanase purificada da linhagem *Cellulosimicrobium cellulans* 191, a 30°C por 3 h.

Estes resultados somados aos descritos anteriormente indicam que a β -1,3 glucanase purificada da linhagem *C. cellulans* 191 é capaz de lisar sozinha vários gêneros e espécies de leveduras, sem a presença de protease.

Shimoi *et al.*⁴³ purificaram enzimas líticas produzidas por *Rarobacter faecitabidus*, uma bactéria capaz de lisar células de leveduras. As enzimas consistiram de uma β -1,3 glucanase (82 KDa em SDS-PAGE) e duas proteases (35 e 33 KDa em SDS-PAGE). As proteases foram capazes de reduzir a turbidez de suspensões de leveduras, entretanto o número de células de leveduras não diminuiu sob observação ao microscópio. A β -1,3 glucanase não diminuiu a turbidez das suspensões de leveduras, mas combinada com as duas proteases lisaram as células de levedura completamente.

No presente estudo, a β -1,3 glucanase purificada (45 KDa em SDS-PAGE) da linhagem *Cellulosimicrobium cellulans* 191, foi capaz de diminuir a turbidez de suspensões de células de leveduras e diminuir o número de células sob observação ao microscópio.

Aplicação da β -1,3 glucanase purificada na formação de protoplastos - Observação em microscópio óptico

A β -1,3 glucanase purificada da linhagem *C. cellulans* 191 foi utilizada para a formação de protoplastos de *S. cerevisiae* KL88. A Figura \surd 3 ilustra a formação de protoplastos da levedura em microscópio óptico com aumento de 1000 vezes (imersão), após a incubação das suspensões de leveduras a 30°C por 2 h com 0,1 U de β -1,3 glucanase purificada /mL de suspensão.

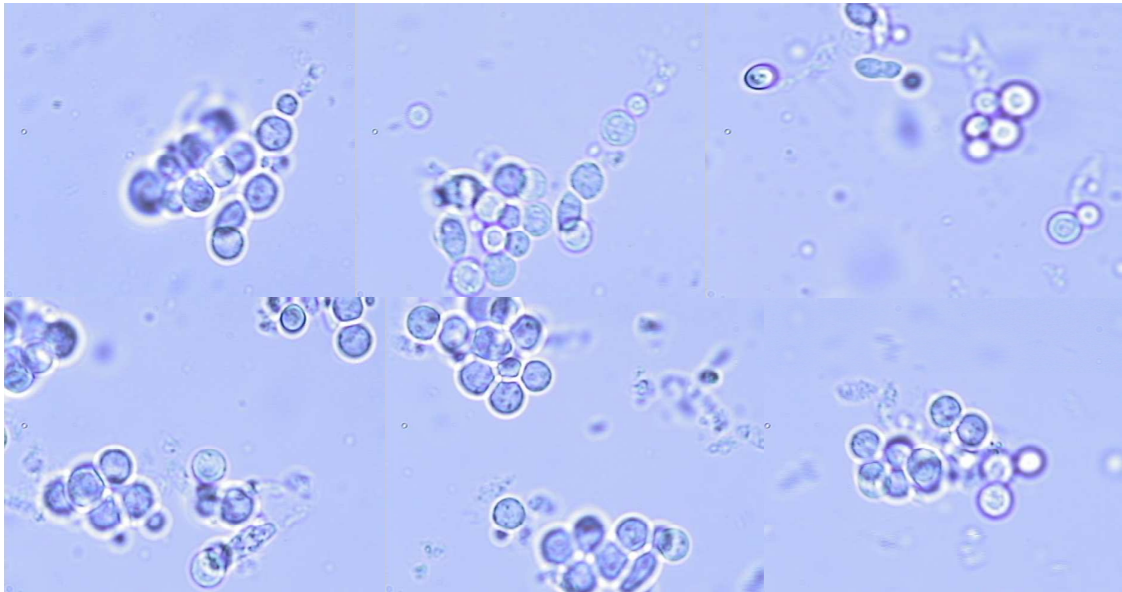


Figura v 3. Protoplastos obtidos a partir de células de *Saccharomyces cerevisiae* KL-88 após ação da β -1,3 glucanase purificada da linhagem *C. cellulans* 191 – Observação em microscópio óptico com aumento de 1000 vezes (imersão)

Assim como a preparação comercial Novozym 234 (Figura v 4), a β -1,3 glucanase purificada da linhagem *C. cellulans* 191 foi capaz de formar protoplastos de *Saccharomyces cerevisiae* KL-88 (Figura v 3).

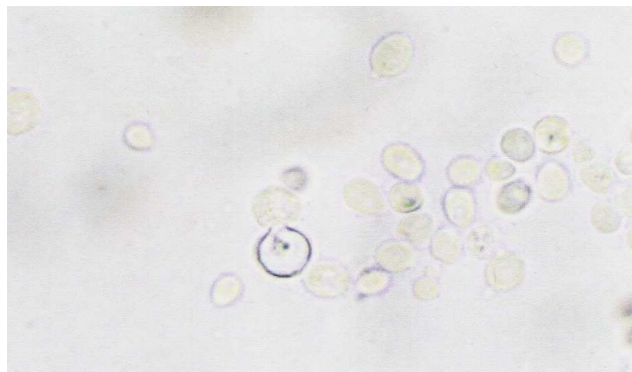


Figura v 4. Protoplastos obtidos a partir de células de *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 26602 após ação da Novozym 234 (preparação comercial) – Observação em microscópio óptico com aumento de 1000 vezes (imersão)⁴⁴

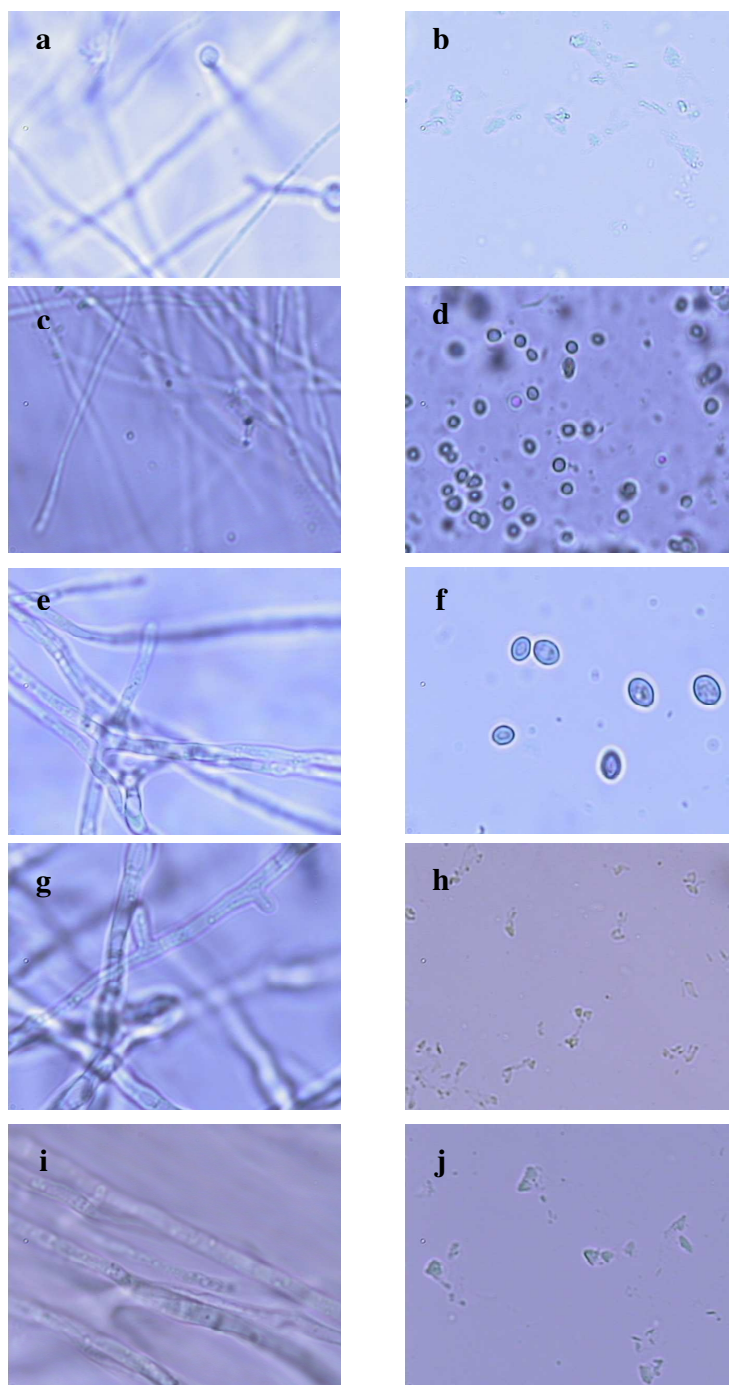
Aplicação da quitinase purificada na lise de fungos – Observação em microscópio óptico

A quitinase purificada da linhagem *C. cellulans* 191 foi utilizada para o estudo da lise dos fungos *Rhizopus oligosporus*, *Mucor miehei*, *Penicillium* sp., *Aspergillus oryzae*, *Streptomyces phaeochromogenes*, *Aspergillus niger*, *Paecilomyces* sp. e *Trichoderma viride*; através da observação em microscópio óptico com aumento de 1000 vezes (imersão).

A Figura v 5 ilustra a lise dos fungos *R. oligosporus*, *M. miehei*, *Penicillium* sp., *S. phaeochromogenes* e *T. viride* pela quitinase purificada, em relação aos seus respectivos controles.

Os fungos *A. oryzae*, *A. niger* e *Paecilomyces* sp. não apresentaram nenhuma alteração na estrutura celular após tratamento com a 0,5 U de quitinase purificada/mL de suspensão, em relação aos seus respectivos controles.

Com exceção dos fungos *Penicillium* sp. (Figura v 5c e v 5d) e *R. oligosporus* (Figura v 5e e v 5f), os outros fungos foram altamente lisados, uma vez que foi verificado somente a presença de fragmentos nas lâminas analisadas em microscópio óptico em imersão.

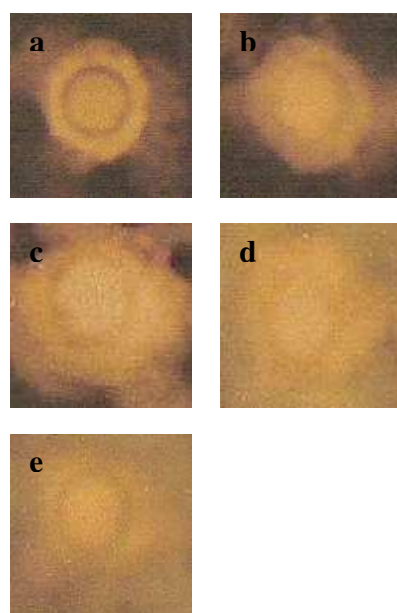


Observação em microscópio óptico com aumento de 1000 vezes (imersão), sendo: a- Controle *M. miehei*; b- *M. miehei* tratado com quitinase purificada; c- Controle *Penicillium*; d- *Penicillium* tratado com quitinase purificada; e- Controle *R. oligosporus*; f- *R. oligosporus* tratado com quitinase purificada; g- Controle *S. phaeochromogenes*; h- *S. phaeochromogenes* tratado com quitinase purificada; i- Controle *T. viride*; j- *T. viride* tratado com quitinase purificada

Figura 5. Lise de fungos com quitinase purificada

Aplicação das preparações bruta e purificada de quitinase na inibição de fungos

O crescimento dos fungos *R. oligosporus*, *M. miehei*, *S. phaeochromogenes*, *Paecylomyces* sp. e *T. viride* em placas de ágar batata dextrose foi inibido pela preparação bruta de quitinase da linhagem *Cellulosimicrobium cellulans* 191, sendo que foram observados halos de inibição de 1,2; 1,2; 1,1; 1,35 e 0,8 cm de diâmetro (Figura v 6). O crescimento dos fungos *Penicillium* sp., *A. oryzae* e *A. niger* não foi inibido pela preparação bruta de quitinase da linhagem *C. cellulans* 191. A preparação purificada de quitinase não foi capaz de inibir o crescimento dos fungos estudados. Este resultado sugere que a inibição do crescimento de fungos ocorre pelo efeito sinérgico da quitinase com outras enzimas e/ou pela presença no extrato bruto de substâncias de ação anti-fúngica.



Fungos: a- *R. oligosporus*, b- *M. miehei*, c- *S. phaeochromogenes*, d- *Paecylomyces* sp.; e- *T. viride*

Figura v 6. Inibição do crescimento de fungos em placas de ágar batata dextrose utilizando a preparação bruta da quitinase da linhagem *Cellulosimicrobium cellulans* 191

Sela-Buurlage *et al.*²⁹ verificaram a atividade antifúngica de diferentes isoformas de quitinases e β -1,3 glucanases do tabaco. Isoformas de quitinases e β -1,3 glucanases

vacuolares apresentaram atividade contra esporos de *Fusarium solani*, resultando na lise de hifas e inibição do crescimento através de atuação sinérgica.

Ji e Kùc³⁰ descreveram a atividade antifúngica de β -1,3 glucanase e quitinase de pepino (*Cucumis sativus* L.) sobre *Colleotrichum lagenarium*. Os autores estudaram uma β -1,3 glucanase ácida e três isoformas de quitinase, designadas A, B e C. A ação individual da β -1,3 glucanase e da quitinase C sobre o fungo provocou inibição da germinação dos esporos do microrganismo e do seu crescimento. A ação conjunta da β -1,3 glucanase e quitinase promoveu um efeito sinérgico na inibição do crescimento do fungo, além de lise das hifas e crescimento anormal. As quitinases A e B não apresentaram atividade antifúngica sobre *C. lagenarium*.

Um mutante de *T. harzianum* CECT 2413 produtor de quitinase e β -1,3 e β -1,6 glucanases inibiu o crescimento de *Rhizoctonia solani* e foi capaz de proteger videiras contra o patógeno *Botrytis cinerea*³¹.

Kim e Hwang³² verificaram que uma quitinase e β -1,3 glucanase purificadas de pimenta ocasionaram inibição do crescimento das hifas de *F. oxysporum* var. *cucumerinum* e *P. capsici* quando aplicadas conjuntamente.

Aplicação das enzimas purificadas na formação de compostos antioxidantes

A β -1,3 glucanase purificada foi utilizada para a hidrólise de laminarina, glucana insolúvel e parede celular de levedura. A protease P3 purificada foi utilizada para a hidrólise de mananaproteína, levedura seca e levedura autoclavada; enquanto que a quitinase purificada foi utilizada para a hidrólise da quitina coloidal, quitina neutralizada e *swollen* quitina. Os sobrenadantes das misturas de reação contendo os produtos formados foram testados quanto à atividade antioxidante.

Em experimento prévio a 50°C com 30 min de duração, foi verificado que os sobrenadantes das misturas de reação contendo os produtos formados devido à atuação da β -1,3 glucanase purificada sobre a laminarina e da protease purificada sobre a levedura seca, apresentaram atividade antioxidante.

O sobrenadante da mistura de reação contendo o produto formado pela atuação da β -1,3 glucanase sobre a parede celular de levedura apresentou diminuição na coloração, entretanto apresentou-se bastante turvo, o que impediu a leitura da amostra a 517 nm.

Os sobrenadantes das misturas de reação contendo quitinase purificada e seus substratos não apresentaram atividade antioxidante a 50°C após 30 min de incubação.

Os experimentos de atividade antioxidante prosseguiram com os sobrenadantes das misturas de reação contendo os produtos formados pela reação da β -1,3 glucanase purificada sobre a laminarina e da protease P3 purificada sobre a levedura seca, com monitoramento contínuo do declínio da absorbância a 517 nm até 120 min para verificar a capacidade antioxidante dos produtos formados sobre o seqüestro do radical DPPH.

A Tabela v 2 e Figura v 7 ilustram a atividade antioxidante das misturas de reação preparadas pela incubação de laminarina e β -1,3 glucanase purificada durante 30 e 60 min. Na mistura de laminarina e β -1,3 glucanase purificada incubada durante 30 min foram produzidos compostos antioxidantes, sendo obtido 35,29% de atividade antioxidante no teste com DPPH após 120 min de reação. Utilizando-se a laminarina e β -1,3 glucanase purificada incubada durante 60 min, foi obtido 53,87% de atividade antioxidante no teste com DPPH após 120 min de reação.

Tabela v 2. Atividade antioxidante do produto da reação da β -1,3 glucanase sobre laminarina

Amostra	% Atividade Antioxidante								
	0 min	5 min	10 min	15 min	30 min	45 min	60 min	90 min	120 min
Laminarina + β -1,3 glucanase purificada incubada durante 30 min	0	2,54	6,9	9,92	16,64	22,0	26,31	31,5	35,29
Laminarina + β -1,3 glucanase purificada incubada durante 60 min	0	5,77	15,64	16,77	23,29	29,47	37,26	46,14	53,87

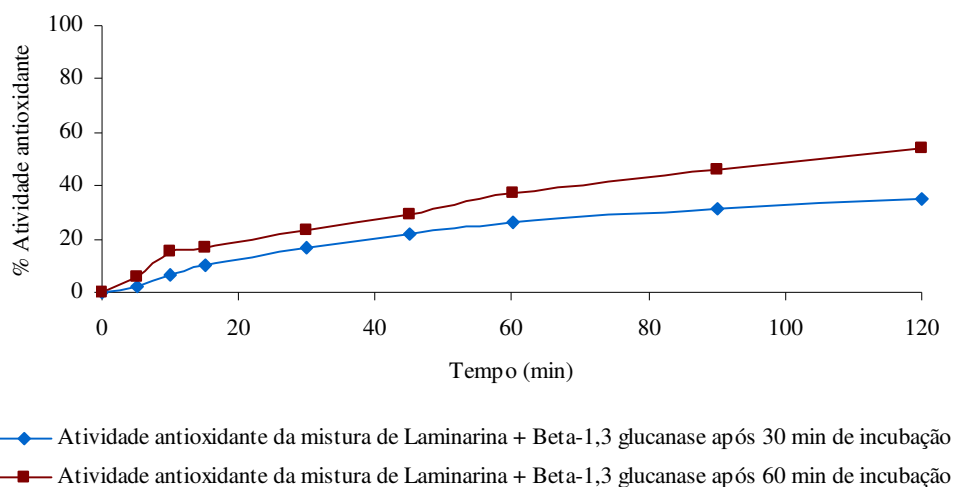


Figura v 7. Atividade antioxidante dos produtos da reação da β -1,3 glucanase sobre laminarina

A Tabela v 3 e Figura v 8 ilustram a atividade antioxidante das misturas de reação preparadas pela incubação de levedura seca e protease P3 purificada durante 30 e 60 min. Na mistura de levedura seca e protease P3 purificada incubada durante 30 min foram produzidos compostos antioxidantes, sendo obtido 54,8% de atividade antioxidante no teste com DPPH após 15 min de reação. Utilizando-se a mistura de levedura seca e protease P3 purificada incubada durante 60 min, foi obtido 64,35% e 69,77% de atividade antioxidante no teste com DPPH após 15 e 30 min de reação, respectivamente.

Tabela v 3. Atividade antioxidante do produto da reação da protease sobre levedura seca

Amostra	% Atividade Antioxidante								
	0 min	5 min	10 min	15 min	30 min	45 min	60 min	90 min	120 min
Levedura Seca + Protease purificada incubada durante 30 min	0	47,25	52,04	54,84	54,82	54,72	54,8	54,8	54,81
Levedura Seca + Protease purificada incubada durante 60 min	0	43,23	59,48	64,35	69,77	69,65	70,23	71,76	73,47

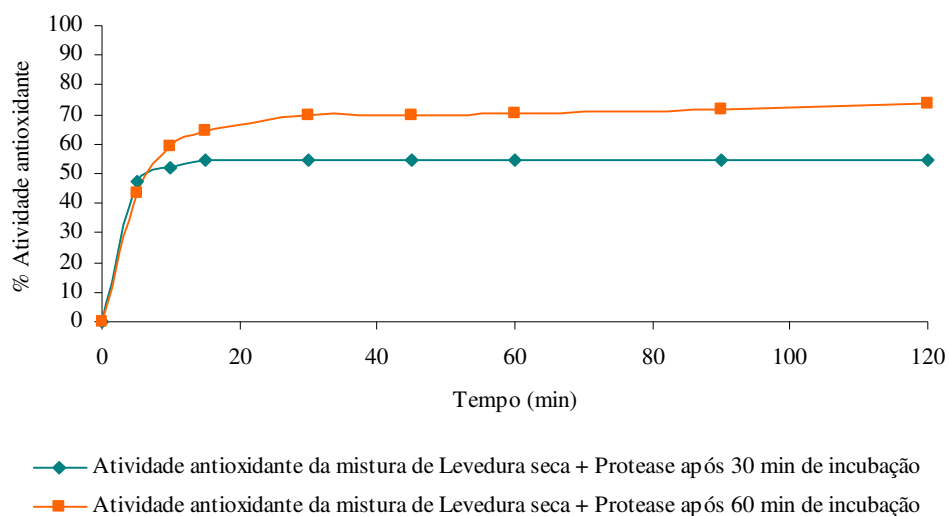


Figura v 8. Atividade antioxidante dos produtos da reação da protease sobre levedura seca

Atividades antioxidantes e antimutagênicas foram atribuídas às mananas de diferentes fontes, como a glucomanana de *Candida utilis*, manana de *Saccharomyces cerevisiae* e manana de *Candida albicans*. Esses componentes reduziram as alterações induzidas por ofloxacina e acridina laranja em DNA de cloroplastos de *Euglena gracilis*. O efeito antimutagênico dos tipos de manana está baseado na habilidade de reaproveitar radicais de oxigênio reativos. As características importantes de mananas isoladas de parede celular de leveduras, como a boa solubilidade em água, massa molecular relativamente pequena (15 ~30 kDa), e efeito antimutagênico, parecem ser boas promessas para o seu uso como protetor natural¹⁴.

Santos verificou que a protease alcalina de *C. cellulans* 191 foi capaz de aumentar a atividade antioxidante da manana-proteína purificada da parede celular de *S. cerevisiae*. No presente estudo a protease P3 purificada da linhagem *C. cellulans* 191 formou compostos com poder antioxidante atuando sobre levedura seca³⁹.

CONCLUSÕES

A β -1,3 glucanase purificada da linhagem *C. cellulans* 191 apresentou atividade de lise das leveduras *Saccharomyces cerevisiae* KL-88, *Saccharomyces capensis*, *Debaromyces vanriji*, *Pachysolen tannophilus*, *Kluyveromyces drosophilum*, *Candida glabrata*, *Hansenula mrakii* e *Pichia membranaefaciens*. As linhagens *D. vanriji*, *P. tannophilus* e *H. mrakii* mostraram-se mais sensíveis à ação da β -1,3 glucanase purificada, enquanto que as linhagens *S. cerevisiae* KL-88, *S. capensis* e *C. glabrata* mostraram-se mais resistentes à ação da enzima.

O tratamento preliminar das leveduras com protease P3 purificada da linhagem *C. cellulans* 191 não aumentou a lise das leveduras com a β -1,3 glucanase, ao contrário, diminuiu, em geral, a porcentagem de atividade lítica.

A β -1,3 glucanase purificada da linhagem *C. cellulans* 191 foi capaz de formar protoplastos da levedura *Saccharomyces cerevisiae* KL-88.

A quitinase purificada da linhagem *C. cellulans* 191 foi capaz de lisar as hifas dos fungos *Rhizopus oligosporus*, *Mucor miehei*, *Penicillium* sp., *Streptomyces phaeochromogenes* e *Trichoderma viride*, entretanto, não provocou nenhuma alteração na estrutura celular dos fungos *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger* e *Paecilomyces* sp.

A preparação bruta de quitinase da linhagem *C. cellulans* 191 foi capaz de inibir o crescimento dos fungos *Rhizopus oligosporus*, *Mucor miehei*, *Penicillium* sp., *Streptomyces phaeochromogenes* e *Trichoderma viride* em placas de ágar batata dextrose, entretanto, não inibiu o crescimento de *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger* e *Paecilomyces* sp. A quitinase purificada da linhagem *C. cellulans* 191 não foi capaz de inibir o crescimento de nenhum dos fungos estudados.

Os produtos formados pela reação da β -1,3 glucanase purificada sobre a laminarina e da protease P3 purificada sobre a levedura seca apresentaram atividade antioxidante. O maior poder antioxidante foi verificado com os compostos formados pela reação da protease purificada sobre a levedura seca.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Guilloux-Benatier, M.; Pageault, O.; Man, A.; Feuilat, M. Lysis of yeast cells by *Oenococcus oeni* enzymes. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* v. 25, p.193, 2000.
2. Kaneko, T.; Kitamura, K.; Yamamoto, Y. Susceptibilities of yeasts to yeast cell wall lytic enzyme of *Arthrobacter luteus*. *Agr. Biol. Chem.* v. 37, n.10, p.2295, 1973.
3. Saeki, K.; Iwata, J.; Yamazaki, S.; Watanabe, Y.; Tamai, Y. Purification and characterization of a yeast lytic β -1,3 glucanase from *Oerskovia xanthineolytica* TK-1. *J. Ferment. Bioeng.* v. 78, n. 6, p. 407, 1994.
4. Okagbue, R. N.; Lewis, M. J. Mixed culture of *Bacillus circulans* WL-12 and *Phaffia rhodozyma* on different carbon sources: yeast wall lytic enzyme production and extractability of astaxanthin. *Biotech. Lett.* v. 5, n. 11, p.731, 1983.
5. Asenjo, J. A.; Andrews, B. A.; Hunter, J. B.; Lecorre, S. Microbial cell lytic enzyme systems: production and reaction kinetics. *Process Biochem.* p.159, 1985.
6. Fleuri, L. F.; Sato, H. H. Produção, purificação, clonagem e aplicação de enzimas líticas. *Quim. Nova.* v. 28, n 5, p 871, 2005.
7. Yamamoto, Y.; Fujino, S.; Kitamura, K.; Kaneko, T. Preparation of yeast extract by cell wall lytic enzyme. *J. Ferment. Technol.* v. 52, n. 11, p. 828, 1974.
8. Kobayashi, R.; Miwa, T.; Yamamoto, S.; Nagasaki, S. Preparation and evaluation of an enzyme which degrades yeast cell wall. *Euro. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* v. 15, p.14, 1982.
9. Planas, A. Bacterial 1,3-1,4- β -glucanases: structure, function and protein engineering. *Biochim. Biophys. Acta.* v. 1543, p. 361, 2000.
10. Andrews, B. A.; Asenjo, J. A. Continuous-culture studies of synthesis and regulation of extracellular β -1,3 glucanase and protease enzymes from *Oerskovia xanthineolytica*. *Biotechnol. Bioeng.* v. 30, p. 628, 1987.
11. Andrews, B. A.; Asenjo, J. A. Enzymatic lysis and disruption of microbial cells. *Tibtech.* v. 5, p. 273, 1987.
12. Nakajima, T.; Konno, R.; Nishihara, H.; Matsuda, K. Cell wall mutants of *Saccharomyces cerevisiae* with increased digestibility by cell wall lytic enzymes and protein extractability. *J. Ferment. Technol.* v. 66, n 2, p. 245, 1988.

13. Richter, G.; Stolken, B.; Hafner, B. Enzymes in broiler feeding. *Okol. Aspekty Ext. Landb.* p. 419, 1992.
14. Krizková, L.; Duracková, Z.; Sandula, J.; Sasinková, V.; Krajcovic, J. Antioxidative and antimutagenic activity of yeast cell wall mannans in vitro. *Mut. Research.* v. 497, p. 213, 2001.
15. Elvig, S. G.; Pedersen, P. B. Safety evaluation of a glucanase preparation intended for use in food including a subchronic study in rats and mutagenicity studies. *Regul. Toxicol. Pharm.* v. 37, p. 11, 2003.
16. Borris, R.; Krah, M.; Brumer, H.; Kerzhner, M. A.; Ivanen, D. I.; Eneyskaya, E. V.; Elyakova, L. A.; Shishlyannikov, S. M.; Shabalin, K. A.; Neustroev, K. N. Enzymatic synthesis of 4-methylumbelliferyl 1,3- β -D-glucooligosaccharides – new substrates for 1,3;1,4- β - glucanase. *Carbohydr. Res.* v. 338, p. 1455, 2003.
17. Kapteyn, J. C.; Van Egmond, P.; Sievi, E.; Van Den Ende, H.; Makarow, M.; Klis, F. M. The contribution of the o-glycosylated Pir2p/ Hsp150 to the construction of the yeast cell wall in wild-type cells and β -1,6 glucan-deficient mutants. *Mol. Microbiol.* v. 31, n. 6, p. 1835, 1999.
18. Popolo, L.; Vai, M. The gas 1 glycoprotein, a putative wall polymer cross-linker. *B. B. Acta-General Subj.* v. 1426, n. 2, p.385, 1999.
19. Kapteyn, J. C.; Van Den Ende, H.; Klis, F. M. The contribution of cell wall proteins to the organization of the yeast cell wall. *B. B. Acta-General Subj.* v. 1426, n. 2, p.373, 1999.
20. Mrsa, V.; Ecker, M.; Cappellaro, C.; Teparic, R.; Tanner, W. *Saccharomyces cerevisiae* cell wall proteins. *Food Technol. Biotechnol.* v. 37, n. 1, p.21, 1999.
21. Osumi, M. The ultrastructure of yeast: Cell wall structure and formation. *Micron.* v. 29, n. 6, p. 207, 1998.
22. Kollar, R.; Petrakova, E.; Ashwell, G.; Robbins, P. W.; Cabib, E. Architecture of the yeast cell wall- the linkage between chitin and β -1,3 glucan. *J. Biol. Chem.* v. 270, n. 3, p.1170, 1995.
23. Kollar, R.; Reinhold, B. B.; Petrakova, E.; Yeh, H. J. C.; Aswell, G.; Drgonova, J.; Kapteyn, J. C.; Klis, F. M., Cabib, E. Architecture of the yeast cell wall β -1, 6 glucan interconnects manoprotein, β -1, 3 glucan, and chitin. *J. Biol. Chem.* v. 272, n. 28, p.

- 17762, 1997.
24. Southard, S. B.; Specht, C. A.; Mishra, C.; Chen-Weiner, J.; Robbins, P. W. Molecular analysis of the *Candida albicans* homolog of *Saccharomyces cerevisiae* MNN9, required for glycosylation of cell wall mannoproteins. *J. Bacteriol.* v. 181, n. 24, p. 7439, 1999.
 25. Aguilar-Uscanga, B.; François, J. M. A study of the yeast cell wall composition and structure in response to growth conditions and mode cultivation. *L. Appl. Microbiol.* v. 37, n. 3, p. 268, 2003.
 26. Patil, R. S.; Ghormade, V.; Deshpande, M. V. Review: Chitinolytic enzymes: an exploration. *Enzyme and Microbial Technol.* v. 26, p. 473, 2000.
 27. Wiwat, C.; Siwayaprahm, P.; Bhumiratana, A. Purification and characterization of chitinase from *Bacillus circulans* n° 41. *Current Microbiol.* v. 39, p. 134, 1999.
 28. Zhang, Z.; Yuen, G. Y. Effects of 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.
 29. Sela-Buurlage, M. B.; Ponstein, A. S.; Bres-Vloemans, S. A.; Melchers, L. S.; Van Den Elzen, P.; Cornelissen, B. Only specific Tobacco (*Nicotiana tabacum*) chitinases and β -1,3 glucanases exhibit antifungal activity. *Plant Physiol.* v. 101, p. 857, 1993.
 30. Ji, C., Kùc, J. Antifungal activity of cucumber β -1,3 glucanase and chitinase. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* v. 49, p. 257, 1996.
 31. Beffa, R. S.; Hofer, R. M.; Thomas, M.; Meins Jr., F. Decreased susceptibility to viral of β -1,3 glucanase-deficient plants generated by antisense transformation. *The Plant Cell.* v. 8, p. 1001, 1996.
 32. Kim, Y. J.; Hwang, B. K. Isolation of a basic 34 KD β -1,3 glucanase with inhibitory activity against *Phytophthora capsici* from pepper stems. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* v. 50, p. 103, 1997.
 33. Kang, Z.; Buchenauer, H. Immunocytochemical localization of β -1,3 glucanase and chitinase in *Fusarium culmorum*-infected wheat spikes. *Physiol. Mol. Plant P.* v. 60, p. 141, 2002.
 34. Burtsevá, Y. V.; Sova, V. V.; Pivkin, M. V.; Zvyagintseva, T. N. Enzymes of

- carbohydrate metabolism of mycelial from marine environments. β -1,3 glucanase of the marine fungus *Chaetomium indicum*. *Biochem.* v. 65, n. 10, p. 1175, 2000.
35. Ventom, A. M.; Asenjo, J. A. Characterization of yeast lytic enzymes from *Oerskovia xanthineolytica* LL-G109. *Enzymes Microbial Technol.* v. 13, p. 71, 1991.
36. Obata, T.; Fujioka, K.; Hara, S.; Namba, Y. The synergistic effects among β -1,3 glucanase from *Oerskovia* sp CK. on lysis of viable yeast cell. *Agr. Biol. Chem.* v. 41, p. 671, 1977.
37. Roberts, W. K., Selitrennikoff, C. P. Plant and bacterial chitinases differ in antifungal activity. *J. Gen. Microbiol.* v.134, p.169, 1988.
38. Fleuri, L. F. Produção de β -1,3 glucanases, proteases líticas e quitinases por microrganismos e aplicação na lise de leveduras. *Dissertação de Mestrado* - FEA - Universidade Estadual de Campinas, Brasil, 2003, 141 p.
39. Santos, L. F. Produção, purificação, caracterização e estudo da aplicação de uma protease alcalina produzida por *Cellulosimicrobium cellulans* 191. *Tese de Doutorado* - FEA - Universidade Estadual de Campinas, Brasil, 2004, 97 p.
40. Hackman, R. H. Studies on chitin V: The action of mineral acids on chitin. *Aust. J. Biol. Sci.* v. 15, p. 526, 1962.
41. Zhu, Q. Y.; Hackman, R. M.; Ensunsa, J. L.; Holt R. R.; Keen, C. L. Antioxidative activities of oolong tea. *J. Agric. Food Chem.* v. 50, p. 6929, 2002.
42. Chen, C. N.; Wu, C. L.; Shy, H. S.; Lin, J. K. Cytotoxic prenylflavanones from Taiwanese propolis. *J. Nat. Products.* v.66, p. 503, 2003.
43. Shimoi, H.; Muranaka, Y.; Sato, S.; Saito, K.; Tadenuma, M. Purification of the enzymes responsible for the lysis of yeast cell by *Rarobacter faecitabidus*. *Agr. Biol. Chem.* v. 55, p. 371, 1991.
44. Brites, A. S. M. Seleção de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* potencializadas pelo fator *killer*, H_2S^- e o caráter floculante. *Tese de Mestrado* – Universidade de São Paulo (Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”), Brasil, 2003, 72 p.

CONCLUSÕES FINAIS

No planejamento fatorial para a análise das variáveis independentes (pH, temperatura e agitação) na produção de β -1,3 glucanase pela linhagem *C. cellulans* 191, em meio de cultivo A contendo 1 % de parede celular de levedura, em frascos agitados, foi observado que valores de pH acima de 6,5 e agitação dos frascos superior a 100 rpm são as melhores condições para a produção da enzima, dentre os valores estabelecidos. A temperatura na faixa estudada não influenciou a produção da enzima. Para a produção de β -1,3 glucanase pela linhagem *C. cellulans* 191 pode ser utilizado meio de cultivo A composto por 2,0 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,2 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 10 g/L de parede celular de levedura em tampão fosfato 0,2 M, pH 7,5; temperatura de 30°C e 200 rpm para a agitação dos frascos.

Utilizando-se frascos Erlenmeyers aletados para a produção de β -1,3 glucanase pela linhagem 191 em tampão fosfato 0,2 M, pH 7,5, 30°C e 200 rpm de agitação foi obtido 1,14 U/mL de β -1,3 glucanase e não foi detectada atividade de protease e quitinase após 24 h de fermentação.

No planejamento fatorial para a análise das variáveis independentes (pH, temperatura e agitação) na produção de protease pela linhagem B26, em meio de cultivo B contendo 8 % de levedura seca, em frascos agitados, foi verificado que valores de pH abaixo de 9,5, temperaturas abaixo de 40°C e agitação dos frascos superior a 100 rpm são as melhores condições para a produção da enzima, dentre os valores estabelecidos. Para a produção de protease pela linhagem B26 pode ser utilizado meio de cultivo B composto por 2,0 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,2 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 80 g/L de levedura seca utilizada como indutor em tampão fosfato 0,15 M, pH 6,5; temperatura de 25°C e agitação de 150 rpm.

No planejamento fatorial para a análise das variáveis independentes (pH, temperatura e agitação) na produção de protease pela linhagem *C. cellulans* 191, em meio de cultivo B contendo 8 % de levedura seca, em frascos agitados, foi verificado que somente o pH influenciou positivamente a produção da enzima. Valores de pH abaixo de 9,5 são as melhores condições para a produção de protease pela linhagem *C. cellulans* 191. Para a produção de protease pela linhagem *C. cellulans* 191 pode ser utilizado meio de cultivo B composto por 2,0 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,2 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 80 g/L de

levedura seca utilizada como indutor em tampão fosfato 0,15 M, pH 6,5; temperatura de 30°C e agitação de 150 rpm.

No planejamento fatorial para a análise das variáveis independentes (pH, temperatura e agitação) na produção de quitinase pela linhagem *C. cellulans* 191, em meio de cultivo C contendo 1,5 % de quitina neutralizada, em frascos agitados, foi verificado que valores de pH abaixo de 7,5, temperaturas abaixo de 35°C e agitação dos frascos superior a 100 rpm são as melhores condições para a produção da enzima. Para a produção de quitinase pela linhagem *C. cellulans* 191 pode ser utilizado meio de cultivo C composto por 4,0 g/L de extrato de levedura; 2,0 g/L de triptona; 4,0 g/L de MgSO₄.7H₂O; 1,2 g/L de KH₂PO₄; 2,8 g/L de K₂HPO₄ e 15 g/L de quitina neutralizada utilizada como indutor, pH 6,5; temperatura de 25°C e 200 rpm de agitação.

Em fermentador de 5 L a maior produção de β-1,3 glucanase (0,72 U/mL) foi obtida após 24 h de fermentação pela *C. cellulans* 191, em meio de cultivo A composto por 2,0 g/L de (NH₄)₂SO₄; 0,2 g/L de MgSO₄.7H₂O e 10 g/L de parede celular de levedura em tampão fosfato 0,2 M, 7,5; a 30°C, 200 rpm e aeração de 3 vvm.

Em fermentador de 5 L a maior produção de protease foi obtida através da fermentação da linhagem *C. cellulans* 191, em meio de cultivo B composto por 2,0 g/L de (NH₄)₂SO₄; 0,2 g/L de MgSO₄.7H₂O e 80 g/L de levedura seca utilizada como indutor em tampão fosfato 0,15 M, 6,5; a 30°C, 150 rpm e aeração de 3 vvm. Foram obtidos na fase exponencial 4,89 U/mL de protease I e na fase estacionária 6,14 U/mL de protease II.

Em fermentador de 5 L a maior produção de quitinase (4,38 U/mL) foi obtida após 144 h de fermentação da linhagem *C. cellulans* 191, em meio de cultivo C composto por 4,0 g/L de extrato de levedura; 2,0 g/L de triptona; 4,0 g/L de MgSO₄.7H₂O; 1,2 g/L de KH₂PO₄; 2,8 g/L de K₂HPO₄ e 15 g/L de quitina neutralizada utilizada como indutor a 25°C, 200 rpm e aeração de 3 vvm.

Na fermentação da linhagem *C. cellulans* 191, em frascos agitados aletados, em meio de cultivo A composto por 2,0 g/L de (NH₄)₂SO₄; 0,2 g/L de MgSO₄.7H₂O e 10 g/L de parede celular de levedura em tampão fosfato 0,2 M, pH 7,5, a 30°C e 200 rpm, foi obtido 1,12 U/mL de β-1,3 glucanase após 24 h de fermentação. A β-1,3 glucanase foi purificada em coluna de DEAE-Sephadex A50 equilibrada em tampão fosfato 0,01M, pH 6,5. A enzima foi eluída no mesmo tampão contendo 0,6 M de NaCl e foi purificada 11,83

vezes com rendimento de 25%. A β -1,3 glucanase apresentou massa molecular de 45 KDa em eletroforese SDS-PAGE.

Na fermentação da linhagem *C. cellulans* 191, em frascos agitados, em meio de cultivo B composto por 2,0 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,2 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 80 g/L de levedura seca utilizada como indutor em tampão fosfato 0,15 M, pH 6,5, a 30°C e 150 rpm, foi obtido 4,2 U/mL de protease após 30 h de fermentação. As proteases foram purificadas em coluna de DEAE-Sephadex A50 equilibrada em tampão fosfato 0,01M, pH 7,0. As proteases foram eluídas no mesmo tampão contendo 0,8 M de NaCl. Foram obtidas três frações de proteases denominadas P1, P2 e P3 que apresentaram os seguintes fatores de purificação e rendimentos, respectivamente: 10,24 e 1,78%; 18,20 e 2,45% e 12,92 e 8,52%. A fração P3 apresentou duas bandas de massas moleculares de 14 e 16 KDa em eletroforese SDS-PAGE.

Na fermentação da linhagem *C. cellulans* 191, em frascos agitados, em meio de cultivo C composto por 4,0 g/L de extrato de levedura; 2,0 g/L de triptona; 4,0 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 1,2 g/L de KH_2PO_4 ; 2,8 g/L de K_2HPO_4 e 15 g/L de quitina neutralizada utilizada como indutor de pH 6,5, a 25°C e 200 rpm, foi obtido 6,9 U/mL de quitinase após 72 h de fermentação. A quitinase foi purificada 6,65 vezes em coluna de filtração em gel Sepharose CL4B200 equilibrada em tampão fosfato 0,01 M, pH 7,0, com rendimento de 46,61%. A quitinase purificada apresentou massa molecular de 61 KDa em eletroforese SDS-PAGE.

A β -1,3 glucanase purificada da linhagem *C. cellulans* 191 apresentou atividade de lise das leveduras *Saccharomyces cerevisiae* KL-88, *Saccharomyces capensis*, *Debaromyces vanriji*, *Pachysolen tannophilus*, *Kluyveromyces drosophilum*, *Candida glabrata*, *Hansenula mrakii* e *Pichia membranaefaciens*. As linhagens *D. vanriji*, *P. tannophilus* e *H. mrakii* mostraram-se mais sensíveis à ação da β -1,3 glucanase purificada, enquanto que as linhagens *S. cerevisiae* KL-88, *S. capensis* e *C. glabrata* mostraram-se mais resistentes à ação da enzima.

O tratamento preliminar das leveduras com protease P3 purificada da linhagem *C. cellulans* 191 não aumentou a lise das leveduras com a β -1,3 glucanase, ao contrário, diminuiu, em geral, a porcentagem de atividade lítica.

A β -1,3 glucanase purificada da linhagem *C. cellulans* 191 foi capaz de formar

protoplastos da levedura *Saccharomyces cerevisiae* KL-88.

A quitinase purificada da linhagem *C. cellulans* 191 foi capaz de lisar as hifas dos fungos *Rhizopus oligosporus*, *Mucor miehei*, *Penicillium* sp., *S. phaeochromogenes* e *Trichoderma viride*, entretanto, não provocou nenhuma alteração na estrutura celular dos fungos *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger* e *Paecylomyces* sp.

A preparação bruta de quitinase da linhagem *C. cellulans* 191 foi capaz de inibir o crescimento dos fungos *Rhizopus oligosporus*, *Mucor miehei*, *Penicillium* sp., *S. phaeochromogenes* e *Trichoderma viride* em placas de ágar batata dextrose, entretanto, não inibiu o crescimento de *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger* e *Paecylomyces* sp. A quitinase purificada da linhagem *C. cellulans* 191 não foi capaz de inibir o crescimento de nenhum dos fungos estudados.

Os produtos formados pela reação da β -1,3 glucanase purificada sobre a laminarina e da protease P3 purificada sobre a levedura seca apresentaram atividade antioxidante. O maior poder antioxidante foi verificado com o produto formado pela reação da protease P3 purificada sobre a levedura seca.

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Clonagem dos genes que codificam a produção da β -1,3 glucanase, protease e quitinase da linhagem *Cellulosimicrobium cellulans* 191.

Estudo da produção das enzimas β -1,3 glucanase, protease e quitinase clonadas em fermentadores.

Aplicação das enzimas β -1,3 glucanase, protease e quitinase.

ANEXO DO CAPÍTULO II

Estudo do efeito do pH, temperatura e agitação na produção de β -1,3 glucanases pelas linhagens B1 e *C. cellulans* 191 em meio de cultivo A contendo 1% de parede celular como indutor, em frascos agitados, utilizando planejamento experimental

A produção de β -1,3 glucanases pelas linhagens B1 e *C. cellulans* 191 foram testadas, em frascos agitados, em meio de cultivo A contendo 1% de parede celular de levedura. Foram analisadas as variáveis independentes (pH, temperatura e agitação) na produção de β -1,3 glucanases pelas linhagens bacterianas.

As variáveis independentes e seus respectivos níveis e valores reais do primeiro estudo de planejamento fatorial estão ilustrados na Tabela AII 1.

Tabela AII 1. Variáveis independentes, níveis e valores reais utilizadas nos planejamentos fatoriais para o estudo da produção de β -1,3 glucanases pelas linhagens B1 e *C. cellulans* 191

Variáveis Independentes	Níveis		
	-1	0	1
pH	6,5	8,0	9,5
Temperatura (°C)	20	30	40
Agitação (rpm)	100	150	200

Para os valores de pH 6,5 e 8,0 foi utilizado tampão fosfato 0,2 M; enquanto que para o valor de pH 9,5 foi utilizado tampão carbonato-bicarbonato 0,2 M.

A produção de β -1,3 glucanases pelas linhagens B1 e *C. cellulans* 191 do primeiro estudo de planejamento fatorial realizado se restringiu à apenas os pontos centrais, como mostram as Tabela AII 2 e AII 3.

A Tabela AII 2 mostra o planejamento fatorial para a produção de β -1,3 glucanase pela linhagem B1, com seus valores reais e codificados para cada ensaio, assim como a variável dependente: atividade de β -1,3 glucanase (U/mL).

Tabela AII 2. Estudo do efeito do pH, temperatura e agitação na produção de β -1,3 glucanase pela linhagem B1, em diferentes tempos de fermentação, em frascos agitados

Ensaio	pH	Temperatura (°C)	Agitação (rpm)	Tempo de Fermentação		
				24h	30h	36h
				Atividade de β -1,3 glucanase (U/mL)		
1	-1 (6,5)	-1 (20)	-1 (100)	-	-	-
2	1 (9,5)	-1 (20)	-1 (100)	-	-	-
3	-1 (6,5)	1 (40)	-1 (100)	-	-	-
4	1 (9,5)	1 (40)	-1 (100)	-	-	-
5	-1 (6,5)	-1 (20)	1 (200)	-	-	-
6	1 (9,5)	-1 (20)	1 (200)	-	-	-
7	-1 (6,5)	1 (40)	1 (200)	-	-	-
8	1 (9,5)	1 (40)	1 (200)	-	-	-
9	0 (8,0)	0 (30)	0 (150)	0,26	0,25	0,23
10	0 (8,0)	0 (30)	0 (150)	0,27	0,25	0,24
11	0 (8,0)	0 (30)	0 (150)	0,24	0,22	0,22

A Tabela AII 3 mostra o planejamento fatorial para a produção de β -1,3 glucanase pela linhagem *C. cellulans* 191, com seus valores reais e codificados para cada ensaio, assim como a variável dependente: atividade de β -1,3 glucanase (U/mL).

Tabela AII 3. Estudo do efeito do pH, temperatura e agitação na produção de β -1,3 glucanases pela linhagem *C. cellulans* 191, em diferentes tempos de fermentação, em frascos agitados

Ensaio	pH	Temperatura (°C)	Agitação (rpm)	Tempo de Fermentação		
				24h	30h	36h
Atividade de β -1,3 glucanase (U/mL)						
1	-1 (6,5)	-1 (20)	-1 (100)	-	-	-
2	1 (9,5)	-1 (20)	-1 (100)	-	-	-
3	-1 (6,5)	1 (40)	-1 (100)	-	-	-
4	1 (9,5)	1 (40)	-1 (100)	-	-	-
5	-1 (6,5)	-1 (20)	1 (200)	-	-	-
6	1 (9,5)	-1 (20)	1 (200)	-	-	-
7	-1 (6,5)	1 (40)	1 (200)	-	-	-
8	1 (9,5)	1 (40)	1 (200)	-	-	-
9	0 (8,0)	0 (30)	0 (150)	0,38	0,35	0,35
10	0 (8,0)	0 (30)	0 (150)	0,34	0,34	0,33
11	0 (8,0)	0 (30)	0 (150)	0,33	0,32	0,32

Como mostram as Tabela AII 2 e AII 3 somente foram obtidas atividades enzimáticas nos pontos centrais dos planejamentos fatoriais para a produção de β -1,3 glucanases pelas linhagens B1 e *C. cellulans* 191 (ensaio 9, 10, 11), não sendo possível a análise estatística dos resultados. Provavelmente as temperaturas utilizadas nos planejamentos referentes aos níveis +1 e -1, respectivamente, 40 e 20°C, foram extremas para a produção da enzima. A linhagem B1 apresentou 0,27 U/mL de β -1,3 glucanase após 24 h de fermentação (ensaio 10); enquanto que a linhagem *C. cellulans* 191 apresentou 0,38 U/mL de β -1,3 glucanase após 24 h de fermentação (ensaio 9). Não foi detectada nenhuma atividade de protease e quitinase no sobrenadante do meio de cultivo do extrato enzimático da linhagem B1 do ensaio 10 após 24 h de fermentação e do extrato enzimático da linhagem 191 do ensaio 9 após 24 h de fermentação.

A linhagem 191 apresentou, neste experimento, atividade de β -1,3 glucanase superior à da linhagem B1, sendo selecionada para a continuidade do estudo de produção da enzima.

ANEXO DO CAPÍTULO III

Estudo da produção de proteases pela linhagem B26 em Fermentador New Brunswick de 5 L, em diferentes condições de aeração

A produção de protease pela linhagem B26 em meio de cultivo contendo 8% de parede celular de levedura em tampão fosfato 0,15 M, pH 6,5 em fermentador de 5 L, foi estudada em diferentes tempos de fermentação; a 25°C, 150 rpm e 3,0 vvm de aeração.

Tabela AIII 1. Estudo da produção de protease pela linhagem B26, em fermentador de 5 L, em meio de cultivo B contendo 8% de levedura seca em tampão fosfato 0,15 M, pH 6,5 a 25°C, 150 rpm e 3,0 vvm

Tempo de Fermentação (h)	U/mL de β -1,3 glucanase	U/mL de protease	U/mL de quitinase	pH	Massa celular [Absorbância (660 nm)]
0	0	0,05	0	6,45	0,68
3	0	0,09	0	6,45	0,99
6	0	0,09	0	6,46	1,035
9	0	0,11	0	6,46	1,185
24	0	1,97	0	6,22	1,76
27	0	2,12	0	6,20	1,84
30	0	1,78	0	6,19	2,2
33	0	1,85	0	6,18	2,485
48	0	0,14	0	6,11	1,562
72	0	0,07	0	6,08	1,42

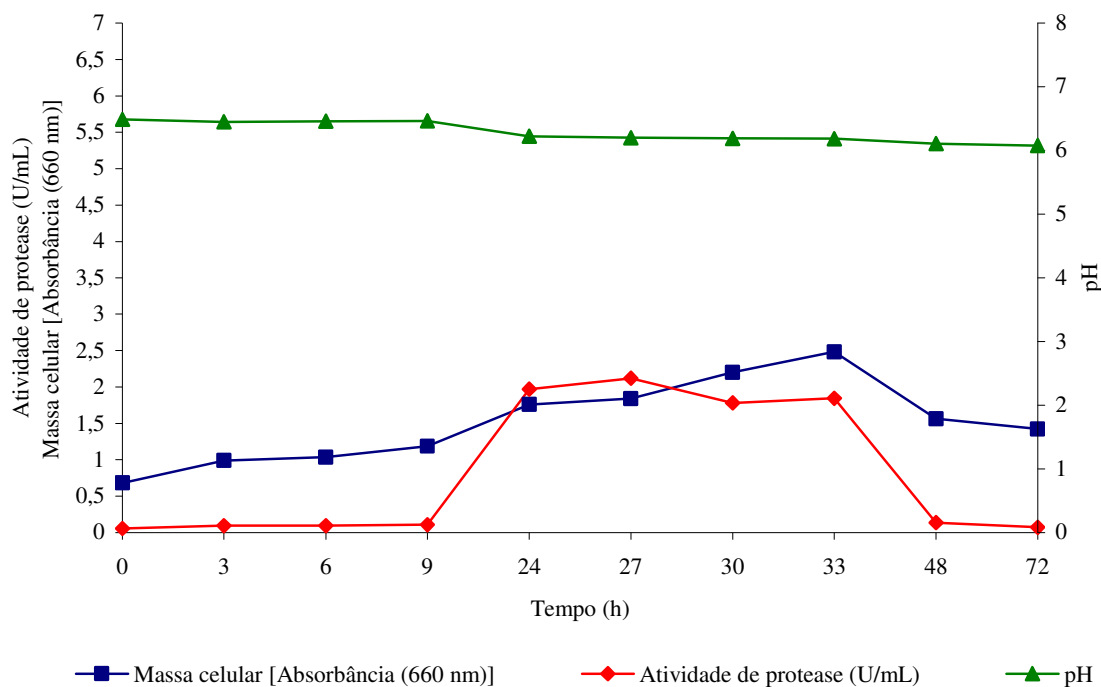


Figura AIII 1. Estudo da produção de protease pela linhagem B26, em fermentador de 5 L, em meio de cultivo B contendo 8% de levedura seca em tampão fosfato 0,15 M, pH 6,5 a 25°C, 150 rpm e 3,0 vvm

A Tabela AIII 1 e a Figura AIII 1 ilustram que na fermentação da linhagem B26 em fermentador de 5 L contendo meio de cultivo B contendo 8% de levedura seca em tampão fosfato 0,15M, pH 6,5 a 25°C, 150 rpm e 3 vvm de aeração, a protease foi produzida na fase exponencial de crescimento atingindo atividade máxima de 2,12 U/mL de protease após 27 h de fermentação. Não foi detectada atividade de β -1,3 glucanase e quitinase nos sobrenadantes do meio de cultivo para a produção de protease em fermentador de 5 L. O pH do meio de cultivo apresentou pouca variação no decorrer da fermentação (Tabela AIII 1).

A linhagem *C. cellulans* 191 apresentou maior atividade de protease em fermentador de 5 L a 3 vvm em comparação com a linhagem B26. A fermentação das linhagens bacterianas foram realizadas inicialmente com aeração de 3 vvm. Dessa forma, a linhagem 191, boa produtora de β -1,3 glucanase e quitinase, respectivamente em meios de cultivo A e C, também foi selecionada para a produção de protease em meio de cultivo B.