

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS  
Departamento de Ciência de Alimentos

PRODUÇÃO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO  
DA ENZIMA  $\beta$ -1,3-GLUCANASE DE *Cellulomonas cellulans* YLM-B191-1  
E AÇÃO DA ENZIMA NA PAREDE CELULAR DE LEVEDURAS

Autora: Lílian Aparecida Ferro

Professora Dra. Hélia Harumi Sato  
**Orientadora**

PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por **Lilian Aparecida Ferro**, aprovada pela Comissão Julgadora em 29 de maio de 2002.

Campinas, 29 de maio de 2002.



Prof. Dra. Hélia Harumi Sato  
Presidente da Banca

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas para a obtenção do Título de Doutor em Ciência de Alimentos.

Campinas  
São Paulo - Brasil  
2002

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL  
SEÇÃO CIRCULANTE

UNIDADE Be  
Nº CHAMADA UNICAMP  
F417p  
V \_\_\_\_\_ EX \_\_\_\_\_  
TOMBO BCI 49895  
PROC 16.837/02  
C \_\_\_\_\_ DX \_\_\_\_\_  
PREÇO R\$ 11,00  
DATA \_\_\_\_\_  
Nº CPD \_\_\_\_\_

CM00170308-9

313 10 248399

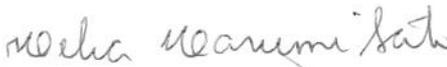
FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA F.E.A. - UNICAMP

F417p      Ferro, Lilian Aparecida  
Produção, purificação e caracterização da enzima  $\beta$ -1, 3-  
glucanase de *Cellulomonas cellulans* YLM-B191-1 e ação da  
enzima na parede celular de leveduras / Lilian Aparecida Ferro.  
– Campinas, SP: [s.n.], 2002.

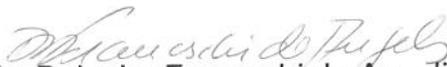
Orientador: Hélia Harumi Sato  
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas.  
Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1.\*Glucanase. 2.\*Enzima lítica. 3.\*Lise. 4.*Cellulomonas  
cellulans*. 5.Leveduras. I.Sato, Hélia Harumi. II.Universidade  
Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos.  
III.Título.

BANCA EXAMINADORA

  
Prof. Dra. Hélia Harumi Sato  
(Orientadora)

  
Prof. Dr. Yong Kun Park  
(membro)

  
Prof. Dejanira Franceshi de Angelis  
(membro)

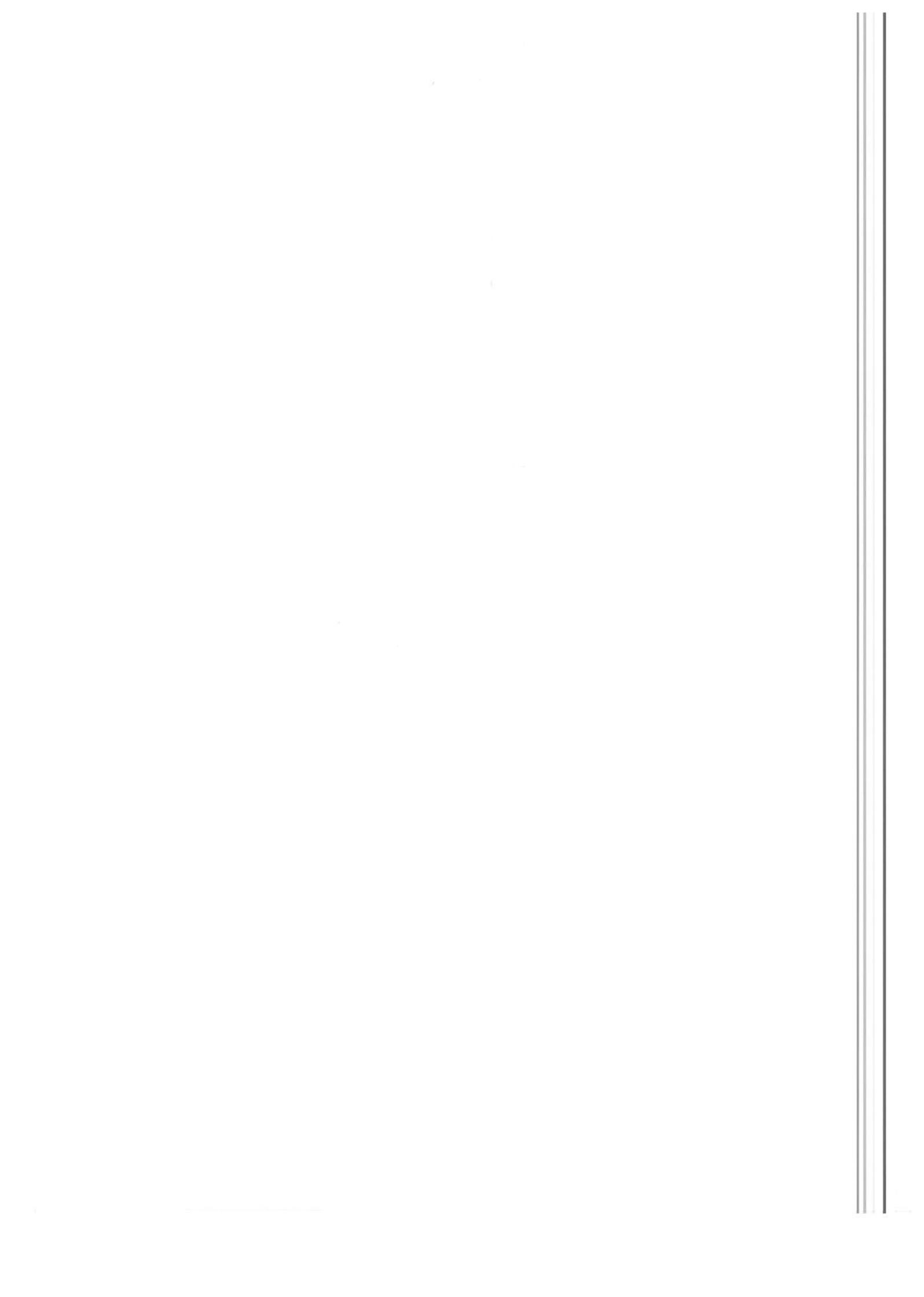
  
Prof. Dr. Jorge Horii  
(membro)

Prof. Dr. Heinz Johann Holshuh  
(membro)

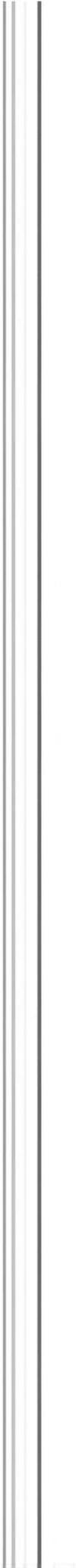
  
Prof. Dra. Gláucia Maria Pastore  
(membro)

Prof. Dra. Lúcia Regina Durrant  
(membro)

Campinas, abril de 2002



Ao meu esposo, pela compreensão;  
À minha família pelo apoio constante;  
Dedico com carinho



## Agradecimentos

*À Profa. Hélia Harumi Sato, pela orientação e desenvolvimento deste trabalho.*

*Aos Professores Dr. Yong K. Park e Gláucia Maria Pastore, pela colaboração durante as diferentes fases do trabalho;*

*Aos técnicos Marcelo, Maria das Dores de Oliveira, Beatriz, pela cooperação e auxílio técnico.*

*Aos técnicos Homero e Rosa (Lab. de Microbiologia); Liana (DEPAN) e Adriana (Lab. de Microscopia Eletrônica- IB), que me auxiliaram em algumas análises.*

*Ao prof. Ranulfo Monte Alegre (Depto Engenharia de Alimentos) e ao prof. Carlos Grosso (DEPAN) que me auxiliaram nas fotografias.*

*À equipe do Prof. Dr. Young Ha Park (Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, KIST, P.O., Korea), e ao Dr. Gilson Paulo Manfio e técnicos da Fundação Tropical que auxiliaram na identificação dos microrganismos.*

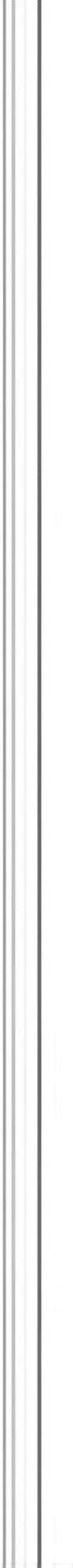
*À prof. Adilma e a técnica Karla (Lab. de Química dos Alimentos FEA), pelas inúmeras vezes que contribuíram para a realização deste trabalho.*

*Ao prof. Gil Eduardo Serra (Depto de Tecnologia de Alimentos – FEA) pelo fornecimento de matéria prima, para a realização de alguns testes.*

*Ao prof. Heinz, e ao casal prof. Carlos e profa Eliza, pelo companheirismo e colaboração, durante todo o período de trabalho.*

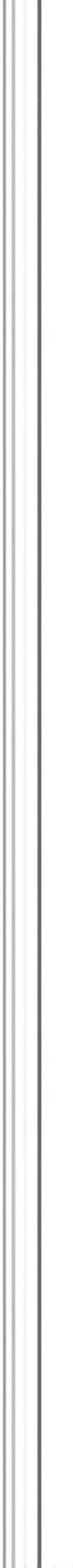
*Aos amigos e estagiários dos Laboratórios de Química, Bioquímica e Bioaromas e Microbiologia da FEA; e de Microbiologia do IB que de alguma forma contribuíram para a realização do trabalho.*

*Enfim, agradeço aos professores e funcionários dos Departamentos de Ciência de Alimentos, de Tecnologia de Alimentos, de Planejamento Alimentar e Nutrição, de Engenharia de Alimentos (FEA) e ao Depto de Microbiologia e Microscopia Eletrônica (IB), que auxiliaram para o desenvolvimento e conclusão deste trabalho.*



## ÍNDICE

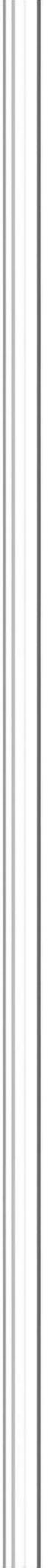
ÍNDICE DE TABELAS	xiv
ÍNDICE DE FIGURAS	xvi
RESUMO	xix
SUMMARY	xx
1- INTRODUÇÃO	1
2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1- Parede celular de leveduras	3
2.2- Microrganismos produtores de enzimas líticas	8
2.3- Características bioquímicas e fisiológicas de microrganismos que lisam leveduras	12
2.4- Produção, purificação e caracterização das enzimas líticas	18
2.5- Modo de ação das enzimas líticas	37
2.6- Aplicação das enzimas líticas	44
3- MATERIAL E MÉTODOS	51
3.1- Isolamento e seleção das bactérias que lisam a parede celular de leveduras	51
3.1.1- Cultivo da levedura utilizada para o estudo da lise da parede celular	51
3.1.2- Isolamento de microrganismos que lisam a parede celular de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 701	52
3.1.3- Seleção preliminar de bactérias que lisam células viáveis de leveduras	53
3.1.4- Seleção de bactérias produtoras de $\beta$ -1,3-glucanase em meios de cultura n <sup>o</sup> 1 e 2	53
3.1.4.1- Determinação da atividade	54



3.1.4.1.1- Determinação da atividade de $\beta$ -1,3-glucanase	54
3.1.4.1.2- Determinação da atividade de protease	55
3.1.4.1.3- Determinação da atividade de aglutinação	55
3.2- Produção de enzimas líticas pela linhagem YLM-B191	56
3.2.1- Produção de proteases pela linhagem YLM-B191 em meio de cultura n <sup>o</sup> 1, 3 e 4	56
3.2.2- Produção de $\beta$ -1,3-glucanase pela linhagem YLM-B191 em frascos agitados, frascos aerados e em fermentador.	56
3.2.3- Relação entre tempo de fermentação, alteração do pH do meio de cultura, crescimento do microrganismo e produção da $\beta$ -1,3-glucanase pela linhagem YLM-B191	57
3.2.3.1- Preparação do inóculo	57
3.2.3.2- Fermentação	57
3.2.3.3- Determinação do crescimento do microrganismo	58
3.2.4- Reisolamento da linhagem YLM-B191	58
3.2.5- Produção de $\beta$ -1,3-glucanase pela linhagem YLM-B191-1 em diferentes meios de cultura	59
3.3- Identificação das linhagens produtoras de enzimas líticas	60
3.3.1- Características morfológicas e fisiológicas das linhagens que lisam células viáveis de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 701	60
3.3.2- Características fisiológicas e quimiotaxonômicas das linhagens YLM-4 e YLM-B191-1, que lisam células viáveis de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 701	61
3.4- Produção e purificação da $\beta$ -1,3-glucanase de <i>Cellulomonas cellulans</i> YLM-B191-1	61
3.4.1- Preparação do pré- inóculo	61
3.4.2- Produção da $\beta$ -1,3-glucanase de <i>Cellulomonas cellulans</i> YLM-B191-1	62
3.4.3- Purificação da $\beta$ -1,3-glucanase de <i>Cellulomonas cellulans</i> YLM-B191-1	62
3.4.3.1- Fracionamento da enzima bruta usando ultrafiltração	62



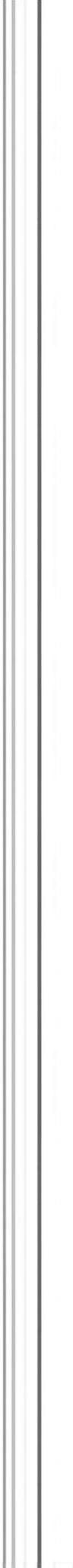
3.4.3.2- Cromatografia da $\beta$ -1,3-glucanase lítica de <i>Cellulomonas cellulans</i> YLM-B191-1 em coluna de CM-Sepharose CL-6B	63
3.5- Determinação das características da $\beta$ -1,3-glucanase lítica de <i>Cellulomonas cellulans</i> YLM-B191-1	64
3.5.1- Efeito do pH na atividade enzimática da $\beta$ -1,3-glucanase de <i>Cellulomonas cellulans</i> YLM-B191-1	64
3.5.2- Efeito do pH na estabilidade enzimática da $\beta$ -1,3-glucanase de <i>Cellulomonas cellulans</i> YLM-B191-1	64
3.5.3- Efeito da temperatura na atividade enzimática da $\beta$ -1,3-glucanase de <i>Cellulomonas cellulans</i> YLM-B191-1	65
3.5.4- Estabilidade térmica da $\beta$ -1,3-glucanase de <i>Cellulomonas cellulans</i> YLM-B191-1	65
3.5.5- Monitoramento das etapas de purificação da $\beta$ -1,3-glucanase por eletroforese em gel poliacrilamida	66
3.5.5.1- Preparo da amostra para a eletroforese	66
3.5.5.2- Eletroforese da $\beta$ -1,3-glucanase em gel gradiente SDS-poliacrilamida (5 a 15 %).	68
3.5.5.3- Eletroforese da $\beta$ -1,3-glucanase em gel SDS-poliacrilamida (12%).	68
3.5.5.4- Eletroforese da $\beta$ -1,3-glucanase em gel poliacrilamida (12 %)	69
3.5.6- Determinação do peso molecular da $\beta$ -1,3-glucanase de <i>Cellulomonas cellulans</i> YLM-B191-1	69
3.5.7- Determinação dos parâmetros cinéticos: $K_M$ e $V_{max}$ , da $\beta$ -1,3-glucanase de <i>Cellulomonas cellulans</i> YLM-B191-1	70
3.5.7.1- Cinética enzimática	70
3.5.8- Efeito dos sais minerais, compostos inorgânicos e inibidores sobre a atividade da $\beta$ -1,3-glucanase de <i>Cellulomonas cellulans</i> YLM-B191-1	70
3.5.8.1- Efeito dos sais sobre a atividade da $\beta$ -1,3-glucanase de <i>Cellulomonas cellulans</i> YLM-B191-1	70
3.5.8.2- Efeito de compostos inorgânicos e inibidores sobre a atividade da $\beta$ -1,3-glucanase de <i>Cellulomonas cellulans</i> YLM-B191-1	71



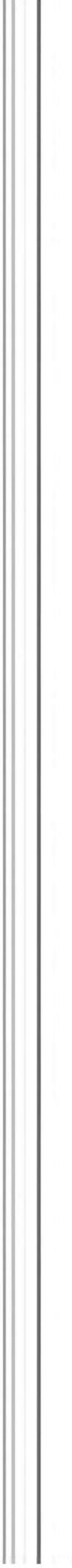
3.5.9- Especificidade da $\beta$ -1,3-glucanase de <i>Cellulomonas cellulans</i> YLM-B191-1 sobre diferentes substratos	72
3.5.10- O modo de ação da $\beta$ -1,3-glucanase de <i>Cellulomonas cellulans</i> YLM-B191-1 sobre a laminarina	72
3.6- Susceptibilidade de algumas culturas microbianas às células de <i>Cellulomonas cellulans</i> YLM-B191-1 e às suas enzimas líticas	73
3.6.1- Susceptibilidade das linhagens de leveduras e bactérias às células de <i>Cellulomonas cellulans</i> YLM-B191-1 em placas de Agar macio	73
3.6.1.1- Manutenção das culturas microbianas	73
3.6.1.1.1- Linhagens de leveduras	73
3.6.1.1.2- Linhagens de bactérias	74
3.6.1.2- Cultivo dos microrganismos para o teste de susceptibilidade	74
3.6.1.2.1- Suspensão de leveduras	74
3.6.1.2.2- Suspensão de bactérias	75
3.6.1.3- Susceptibilidade das linhagens de leveduras às células de <i>Cellulomonas cellulans</i> YLM-B191-1 em placas de Agar macio	75
3.6.1.4- Susceptibilidade das linhagens de bactérias às células de <i>Cellulomonas cellulans</i> YLM-B191-1 em placas de Agar macio	75
3.6.2- Digestão da parede celular de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 26602 pelas enzimas líticas de <i>Cellulomonas cellulans</i> YLM-B191-1 e observação em microscópio eletrônico de varredura	76
3.6.2.1- Cultivo dos microrganismos	76
3.6.2.1.1- Cultivo de <i>S. cerevisiae</i> ATCC 26602	76
3.6.2.1.2- Cultivo de <i>C. celullans</i> YLM-B191-1	77
3.6.2.2- Observação em microscópio eletrônico da célula intacta de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 26602	77
3.6.2.3- Observação em microscópio eletrônico da superfície da parede celular de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 26602, após a ação da preparação bruta das enzimas líticas de <i>Cellulomonas cellulans</i> YLM-B191-1	77



3.6.2.4- Observação em microscópio eletrônico da parede celular de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 26602, após a ação da $\beta$ -1,3-glucanase purificada de <i>Cellulomonas cellulans</i> YLM-B191-1	78
3.6.2.5- Ação do microrganismo lítico <i>Cellulomonas cellulans</i> YLM-B191-1 sobre a parede celular de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 26602 e observação em microscópio eletrônico	78
3.6.2.6- Preparação das amostras de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 26602 para a observação em microscópio eletrônico de varredura (MEV)	79
<b>4- RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>81</b>
4.1- Isolamento e seleção das bactérias que lisam a parede celular de leveduras	81
4.1.1- Isolamento de microrganismos que lisam a parede celular de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 701	82
4.1.2- Seleção preliminar de bactérias que lisam células de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 701	85
4.1.3- Seleção dos microrganismos produtores de $\beta$ -1,3-glucanase	85
4.2- Produção de enzimas líticas pela linhagem YLM-B191	86
4.2.1- Produção de proteases pela linhagem YLM-B191 em meio de cultura n <sup>o</sup> 1, 3 e 4	86
4.2.2- Produção de $\beta$ -1,3-glucanases pela linhagem YLM-B191 em frascos agitados, frascos aerados e em fermentador	87
4.2.3- Relação entre tempo de fermentação, alteração do pH do meio de cultura, crescimento do microrganismo e produção de $\beta$ -1,3-glucanase	87
4.2.4- Reisolamento da linhagem YLM-B191 e produção de $\beta$ -1,3-glucanase	88
4.2.5- Produção de $\beta$ -1,3-glucanase pela linhagem YLM-B191-1 em diferentes meios de cultura	88



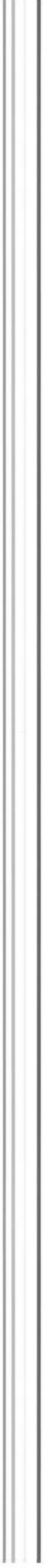
4.3- Identificação das linhagens produtoras de enzimas líticas	91
4.3.1- Características morfológicas e fisiológicas das linhagens que lisam células viáveis de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 701	91
4.3.2- Características fisiológicas e quimiotaxonômicas das linhagens YLM-4 e YLM-B191-1	96
4.3.2.1- Teste de assimilação de diferentes compostos orgânicos pelas linhagens YLM-4 e YLM-B191-1	96
4.3.2.2- Conteúdo de citosina-guanina (C + G) das linhagens YLM-4 e YLM-B191-1	98
4.3.2.3- Composição dos ácidos graxos da parede celular das linhagens YLM-4 e YLM-B191-1	101
4.3.2.4- Coeficiente de similaridade entre as linhagens de referência e as linhagens YLM-4 e YLM-B191-1	102
4.4- Produção e purificação da $\beta$ -1,3-glucanase de <i>Cellulomonas cellulans</i> YLM-B191-1	105
4.4.1- Produção da $\beta$ -1,3-glucanase de <i>Cellulomonas cellulans</i> YLM-B191-1	105
4.4.2- Purificação da $\beta$ -1,3-glucanase de <i>Cellulomonas cellulans</i> YLM-B191-1	106
4.5- Determinação das características da $\beta$ -1,3-glucanase lítica de <i>Cellulomonas cellulans</i> YLM-B191-1	112
4.5.1- Efeito do pH na atividade enzimática da $\beta$ -1,3-glucanase de <i>Cellulomonas cellulans</i> YLM-B191-1	113
4.5.2- Efeito do pH na estabilidade enzimática da $\beta$ -1,3-glucanase de <i>Cellulomonas cellulans</i> YLM- B191-1	115
4.5.3- Efeito da temperatura na atividade enzimática da $\beta$ -1,3-glucanase de <i>Cellulomonas cellulans</i> YLM-B191-1	117
4.5.4- Estabilidade térmica da $\beta$ -1,3-glucanase de <i>Cellulomonas cellulans</i> YLM-B191-1	118
4.5.5- Monitoramento das etapas de purificação da $\beta$ -1,3-glucanase por eletroforese em gel poliacrilamida	121



4.5.5.1- Eletroforese da $\beta$ -1,3-glucanase bruta em gel gradiente SDS-poliacrilamida (5 a 15 %)	121
4.5.5.2- Eletroforese da $\beta$ -1,3-glucanase em gel SDS-poliacrilamida (12 %)	122
4.5.5.3- Eletroforese da $\beta$ -1,3-glucanase em gel poliacrilamida (12 %)	122
4.5.6- Determinação do peso molecular da $\beta$ -1,3-glucanase de <i>Cellulomonas cellulans</i> YLM-B191-1	122
4.5.7- Determinação dos parâmetros cinéticos: $K_M$ e $V_{max}$ , da $\beta$ -1,3-glucanase de <i>Cellulomonas cellulans</i> YLM-B191-1	126
4.5.7.1- Cinética enzimática	126
4.5.8- Efeito de sais, compostos inorgânicos e inibidores sobre a atividade da $\beta$ -1,3-glucanase de <i>Cellulomonas cellulans</i> YLM-B191-1	129
4.5.8.1- Efeito de sais na atividade da $\beta$ -1,3-glucanase bruta de <i>Cellulomonas cellulans</i> YLM-B191-1	129
4.5.8.2- Efeito de compostos inorgânicos e inibidores na atividade da $\beta$ -1,3-glucanase bruta de <i>Cellulomonas cellulans</i> YLM-B191-1	131
4.5.8.3- Efeito de sais, compostos orgânicos e inibidores na atividade da $\beta$ -1,3-glucanase purificada de <i>Cellulomonas cellulans</i> YLM-B191-1	132
4.5.9- Especificidade da $\beta$ -1,3-glucanase de <i>Cellulomonas cellulans</i> YLM-B191-1 sobre diferentes substratos	133
4.5.10- O modo de ação da $\beta$ -1,3-glucanase de <i>Cellulomonas cellulans</i> YLM-B191-1 sobre a laminarina	134
4.6- Susceptibilidade de algumas culturas microbianas às células de <i>Cellulomonas cellulans</i> YLM-B191-1 e às suas enzimas líticas	139
4.6.1- Susceptibilidade das linhagens de leveduras e bactérias às células de <i>Cellulomonas cellulans</i> YLM-B191-1 em placas de Agar macio	139
4.6.1.1- Susceptibilidade das linhagens de leveduras às células de <i>Cellulomonas cellulans</i> YLM-B191-1 em placas de Agar macio	139
4.6.1.2- Susceptibilidade das linhagens de bactérias às células de <i>Cellulomonas cellulans</i> YLM-B191-1 em placas de Agar macio	140



4.6.2- Digestão da parede celular de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 26602 pelas enzimas líticas de <i>Cellulomonas cellulans</i> YLM-B191-1 e observação em microscópio eletrônico	140
4.6.2.1- Observação em microscópio eletrônico da célula intacta de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 26602	140
4.6.2.2- Observação em microscópio eletrônico da parede celular de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 26602 após a ação da preparação bruta de enzimas líticas de <i>Cellulomonas cellulans</i> YLM-B191-1	142
4.6.2.3- Observação em microscópio eletrônico da parede celular de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 26602, após a ação da $\beta$ -1,3-glucanase purificada de <i>Cellulomonas cellulans</i> YLM-B191-1	146
4.6.2.4- Ação do microrganismo lítico <i>Cellulomonas cellulans</i> YLM-B191-1 sobre a parede celular de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 26602 e observação em microscópio eletrônico	150
5- CONCLUSÕES	154
6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	157



## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Produção de $\beta$ -1,3-glucanase pelas linhagens YLM-4, YLM-B191, YLM-B1, YLM-B22, YLM-B26, YLM-Fxx.	86
Tabela 2. Produção de $\beta$ -1,3-glucanase em meio TYMC pela linhagem YLM-B191, em diferentes condições de ensaio.	88
Tabela 3. Produção de $\beta$ -1,3-glucanase, pela linhagem YLM-B191, em diferentes meios de cultura.	92
Tabela 4. Características morfológicas e fisiológicas das linhagens de bactérias YLM-4, YLM-B1, YLM-B22, YLM-B26, YLM-B191 e YLM-Fxx, que lisam leveduras.	97
Tabela 5. Assimilação de diferentes fontes de carbono pelas linhagens YLM-4 e YLM-B191.	99
Tabela 6. Conteúdo de guanina e citosina do DNA (mol %) das linhagens YLM-4 e YLM-B191.	101
Tabela 7. Composição dos ácidos graxos celulares das linhagens YLM-4 e YLM-B191.	103
Tabela 8. Coeficientes de similaridade das cepas YLM-4 e YLM-B191-1 com as linhagens de referência dos gêneros <i>Oerskovia</i> , <i>Cellulomonas</i> e <i>Brevibacterium</i> .	103
Tabela 9. Purificação da $\beta$ -1,3-glucanase de <i>C. cellulans</i> YLM-B191-1.	111

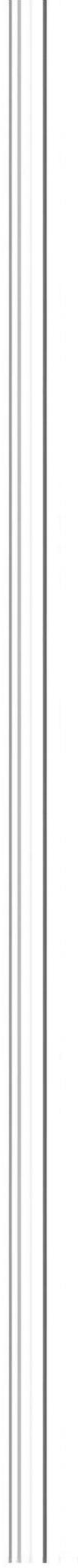
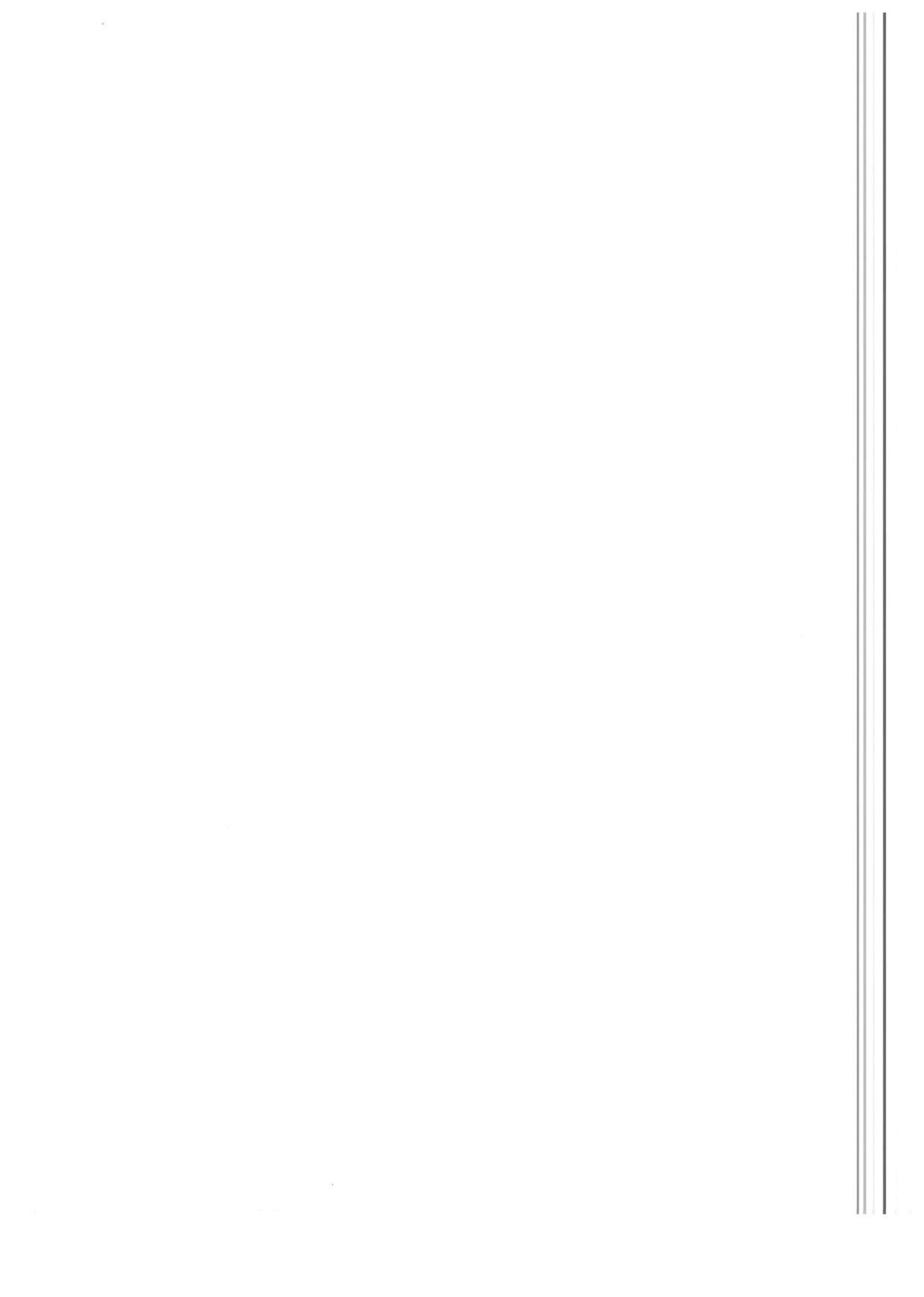


Tabela 10. O efeito de sais sobre a atividade da preparação bruta da $\beta$ -1,3-glucanase.	129
Tabela 11. Efeito de compostos inorgânicos e inibidores sobre a atividade da $\beta$ -1,3-glucanase da preparação bruta de <i>C. cellulans</i> YLM-B191-1.	131
Tabela 12. Efeito de sais e inibidores sobre a atividade da enzima $\beta$ -1,3-glucanase purificada de <i>C. cellulans</i> YLM-B191-1.	133
Tabela 13. Especificidade da enzima $\beta$ -1,3-glucanase purificada de <i>C. cellulans</i> YLM-B191-1.	134



## ÍNDICE DE FIGURAS

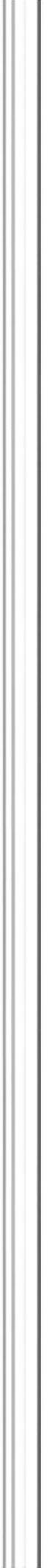
Figura 1. Detecção de bactérias que lisam leveduras.	83
Figura 2. Placas de YLM-Agar macio contendo colônias isoladas de bactérias que lisam leveduras, pertencentes ao grupo dos actinomicetos e identificadas como <i>Celullomonas cellulans</i> YLM-B191.	83
Figura 3. Relação entre o tempo de fermentação, crescimento do microrganismo, alteração do pH do meio e produção de $\beta$ -1,3-glucanase.	89
Figura 4. Características morfológicas da bactéria YLM-B191, que lisa leveduras, observada através de micrografia eletrônica, após 18 horas de crescimento em TYMC-Agar macio a 30° C.	93
Figura 5. Reisolamento de bactérias que lisam leveduras	93
Figura 6. Fracionamento da preparação bruta de $\beta$ -1,3-glucanase em coluna de CM-Sepharose CL-6B.	107
Figura 7. Eletroforese das preparações brutas de $\beta$ -1,3-glucanase.	109
Figura 8. Eletroforese da $\beta$ -1,3-glucanase purificada em gel SDS-poliacrilamida (12 %).	109
Figura 9. Efeito do pH na atividade da $\beta$ -1,3-glucanase purificada.	113
Figura 10. Efeito do pH na estabilidade da $\beta$ -1,3-glucanase purificada.	115



Figura 11. Efeito da temperatura na atividade da $\beta$ -1,3-glucanase purificada.	117
Figura 12. Termoestabilidade da $\beta$ -1,3-glucanase purificada.	119
Figura 13. Relação entre o Rf e o peso molecular das proteínas em gel SDS-poliacrilamida (12%).	123
Figura 14. Peso molecular da $\beta$ -1,3-glucanase purificada estimado pela eletroforese em gel SDS-poliacrilamida.	123
Figura 15. Efeito da concentração do substrato laminarina na atividade de $\beta$ -1,3-glucanase.	127
Figura 16. Produtos da hidrólise da laminarina pela $\beta$ -1,3-glucanase bruta de <i>C. cellulans</i> YLM-B191-1.	137
Figura 17. Superfície celular de <i>S. cerevisiae</i> ATCC 26602 (Amostra A).	143
Figura 18. Superfície celular de <i>S. cerevisiae</i> ATCC 26602, após a ação da preparação bruta de enzimas líticas produzidas pela <i>C. cellulans</i> YLM-B191-1, por 2 horas a 55 °C (Amostra B).	143
Figura 19. Superfície celular de <i>S. cerevisiae</i> ATCC 26602, após a ação da enzima $\beta$ -1,3-glucanase purificada de <i>C. cellulans</i> YLM-B191-1, por 2 horas a 55 °C (Amostra C).	147
Figura 20. Superfície celular da <i>S. cerevisiae</i> ATCC 26602, na presença das células de <i>C. cellulans</i> YLM-B191-1 produtoras das enzimas líticas, por 20 horas à temperatura ambiente (Amostra D).	151



Figura 21. Superfície celular da *S. cerevisiae* ATCC 26602, na presença das células de *C. cellulans* YLM-B191-1 produtoras das enzimas líticas, por 20 horas à temperatura ambiente (Amostra E). 151



## RESUMO

Este trabalho objetivou o isolamento de microrganismos capazes de produzir enzimas que lisam a parede celular de leveduras, a produção, purificação e caracterização de  $\beta$ -1,3-glucanase lítica. As bactérias líticas foram isoladas de lodo da usina de açúcar e álcool Santa Helena, Piracicaba, SP. As bactérias líticas isoladas aderiram-se às células viáveis de *Saccharomyces cerevisiae* 701 e lisaram-nas. A linhagem YLM-B191-1, selecionada para o estudo, foi identificada através das características bioquímicas e fisiológicas como *Cellulomonas cellulans*. Para a produção da  $\beta$ -1,3-glucanase lítica, a linhagem de *C. cellulans* YLM-B191-1 foi cultivada em meio composto de 15 g de levedura seca; 2,0 g de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; 13,6 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 4,2 g de KOH; 0,2 g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0,001 g de  $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ; 1 mg de biotina e 1 mg de tiamina por litro. A  $\beta$ -1,3-glucanase foi purificada do sobrenadante do meio de cultura através de ultrafiltração e cromatografia em coluna de CM-Sepharose CL-6B. A enzima purificada apresentou atividade ótima a  $55^\circ\text{C}$  e na faixa de pH entre 4,5 a 6,5. A  $\beta$ -1,3-glucanase purificada apresentou estabilidade na faixa de pH 5,5 a 6,5 e foi inativada em temperaturas superiores a  $55^\circ\text{C}$ . A massa molecular da  $\beta$ -1,3-glucanase purificada foi estimada em 17,1 kDa através de SDS-PAGE. A  $\beta$ -1,3-glucanase purificada hidrolisou as ligações  $\beta$ -1,3-glicosídicas da laminarina atuando como uma endoenzima. Através de microscopia eletrônica de varredura, observou-se que as enzimas líticas da linhagem de *C. cellulans* YLM-B191-1 foram capazes de alterar a superfície celular de leveduras.



## SUMMARY

The objective of this research was to isolate microorganisms which produced yeast cell wall lytic enzymes and to study the production, purification and characterization of a lytic  $\beta$ -1,3-glucanase. The yeast-lytic bacterium was isolated from the sludge of the Santa Helena sugar and alcohol factory in Piracicaba, SP. The isolated yeast-lytic bacterium adhered to viable cells of *Saccharomyces cerevisiae* 701 and lysed them. The yeast-lytic bacterium YLM-B191-1, selected for this study, was identified as *Cellulomonas cellulans*, from its biochemical and physiological characteristics. The strain *C. cellulans* YLM B191-1 was cultivated in a medium containing (per liter) 2.0 g of  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; 13.6 g of  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 4.2 g of KOH; 0.2 g of  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0.001 g of  $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  and 1 mg each of biotin and thiamin being supplemented with 15 g of dried yeast as the carbon source for the production of  $\beta$ -1,3-glucanase. The  $\beta$ -1,3-glucanase was purified from the culture fluid of *C. cellulans* YLM-B191-1 by ultrafiltration and CM-Sepharose CL-6B column chromatography. The purified enzyme showed greatest activity at  $55^\circ\text{C}$  and between pH 4.5 – 6.5. The purified  $\beta$ -1,3-glucanase was stable in the range from pH 5.5 to 6.5 and was inactivated by heating at temperatures above  $55^\circ\text{C}$ . The molecular weight of purified  $\beta$ -1,3-glucanase was estimated at about 17.1 kDa by SDS-PAGE. The  $\beta$ -1,3-glucanase hydrolyses the  $\beta$ -1,3-glucosidic linkages of the laminarin acting as an endoenzyme. Scanning electron microscopy showed that lytic enzymes from *C. cellulans* YLM-B191-1 were able to modify the cellular surface of yeast.



## 1- INTRODUÇÃO

A parede celular de leveduras tem muitas funções, como: proteção física, estabilidade osmótica, suporte para enzimas, ligantes de compostos, adesão célula-célula, permeabilidade como barreira seletiva (Stratford, 1994) e também é responsável pela força mecânica da célula (Klis, 1994). A estrutura manana-proteína é responsável pela proteção da célula contra danos externos e pela porosidade da parede celular (Bacon et al., 1970), enquanto, a camada de glucana é responsável pela integridade estrutural da parede celular perante choques mecânicos e desequilíbrio osmótico (Zlotnik et al., 1984).

A parede celular de leveduras tem sido descrita como uma das paredes mais resistentes e rígidas de todos os microrganismos; composta de uma estrutura complexa, formada por vários biopolímeros, incluindo manana, proteínas, glucana e pequena quantidade de quitina (Hunter & Asenjo, 1988). Enzimas capazes de lisar células de leveduras têm sido encontradas em diversos organismos, como nas bactérias *Cytophaga johnsonii* (Bacon et al., 1970), *Arthrobacter luteus* (Doi et al., 1973), *Flavobacterium dormitator var. glucanolyticae* (Nagasaki et al., 1976), *Oerskovia* sp CK (Obata et al., 1976; Obata et al., 1977a e b), *Rarobacter faecitabidus* (Yamamoto et al., 1988), *R. incanus* (Goto-Yamamoto et al., 1993b) e *Bacillus alcalophilus* (Yeo et al., 1998). Estas bactérias têm sido isoladas a partir do lodo ativado de sistemas de tratamento de água de indústrias de alimentos e de bebidas alcoólicas (Hasuo et al., 1984). As enzimas  $\beta$ -1,3-glucanases e proteases são os principais componentes dos sistemas líticos capazes de lisar e romper células de leveduras. Esse sistema é formado por outras enzimas, como:  $\beta$ -1,3-glucanases e proteases não líticas,  $\beta$ -1,6-glucanase, mananase e quitinase que permitem ao microrganismo hidrolisar todos os componentes da célula de levedura (Hunter & Asenjo, 1988). Estas enzimas têm um grande potencial no rompimento controlado e seletivo da parede celular de leveduras (Andrews & Asenjo, 1987b). Elas têm sido estudadas não apenas como ferramenta para estudos da composição da parede celular de

leveduras, mas também como reagentes no preparo de protoplastos de leveduras (Hunter & Asenjo, 1988), como instrumentos essenciais utilizados na fusão de células (Kitamura, 1982a) ou em aplicações biotecnológicas, como na transformação e engenharia genética de leveduras (Kitamura, 1982c). Essas enzimas podem ser utilizadas na produção de ração animal, de proteína de célula única ("single-cell" protein - SCP) de grau alimentício, de carboidratos funcionais da parede celular, para extração de enzimas como invertase ou como pré-tratamento para ruptura mecânica da célula para aumentar a eficiência e diminuir o requerimento de energia (Hunter & Asenjo, 1987). As enzimas líticas podem também, ser usadas na produção de extratos de leveduras (Ryan & Ward, 1988) ou no controle de microrganismos de importância médica, como a *Candida albicans* (Molina et al., 1989). Alguns estudos têm sugerido a produção de plantas transgênicas com alta resistência a fungos patogênicos pela expressão de enzimas líticas (Leah et al., 1991). Cervejarias têm demonstrado grande interesse na degradação enzimática de  $\beta$ -1,3-glucana de cevada que acumula durante o processo de fermentação da cevada para facilitar a filtração da mesma (Copa-Palatiño et al. 1989; Ducroo & Delecourt, 1972).

O trabalho objetivou o isolamento e seleção de microrganismos que lisam a parede celular de leveduras. Estudou-se a produção, purificação e caracterização da enzima lítica  $\beta$ -1,3-glucanase de *Cellulomonas cellulans* YLM-B191-1 e sua ação lítica na parede celular de levedura.

## 2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1- Parede celular de leveduras

Os estudos da composição da parede celular de leveduras de panificação (*Saccharomyces cerevisiae*) têm mostrado que é uma estrutura complexa de polissacarídeos, como glucana, manana e pequenas quantidades de quitina, fosfato, lipídios, proteínas e enzimas (Bacon et al., 1966 e Manners et al., 1973).

A estrutura dos polissacarídeos, componentes da parede celular de leveduras, tem sido objeto de inúmeros estudos. Fleming et al. (1966), estudaram a camada de glucana da parede celular de leveduras de panificação e, verificaram que o comprimento das cadeias não ramificadas de resíduos de glicose tem um efeito marcante na solubilidade das  $\beta$ -1,3-glucanas. A laminarina solúvel, um polissacarídeo com ligações  $\beta$ -1,3, apresentou baixo grau de ramificação com ligações  $\beta$ -1,6, e cadeia de comprimento médio variando de 7 a 10 resíduos de glicose (citado por Manners et al., 1973).

Lampen (1968) verificou que o polímero de manana da parede celular é formado por unidades de manose unidas por ligações  $\alpha$ -1,2,  $\alpha$ -1,3 e  $\alpha$ -1,6 e é ligado covalentemente a peptídeos formando glicopeptídeos (citado por Yamamoto & Nagasaki, 1975a).

Bacon et al. (1969) citaram que o conceito de uma parede celular de leveduras com duas camadas, uma de manana- proteína e a outra de glucana, tem sido baseado em estudos minuciosos da estrutura das cicatrizes de brotamento. A superfície celular mostrou-se irregular e foram observados algumas crateras. Seções ultrafinas mostraram que essas crateras não são partes expostas de uma camada interna, mas sim uma cicatriz desenvolvida, como uma marca autêntica, entre a célula mãe e a célula filha. Os autores relataram que a camada

de manana- proteína sobrepõe a camada de glucana, e isto poderia explicar a resistência das células vivas de leveduras ao ataque das misturas enzimáticas, como  $\beta$ -1,3-glucanases, elaboradas por alguns microrganismos.

Manners et al. (1973) relataram que as moléculas de laminarina insolúvel são essencialmente lineares, e contém cerca de 15 a 20 resíduos de glicose. Por analogia, o grau de ramificação é muito baixo nas moléculas, relativamente grandes, de  $\beta$ -1,3-glucanas de leveduras de panificação (*S. cerevisiae*) de modo que devem estar presentes, segmentos lineares de resíduos de glicose com ligações  $\beta$ -1,3 e, no mínimo alguns destes poderiam estar alinhados juntos, inter e intra molecularmente, para formarem um agregado insolúvel ou um gel, dependendo do solvente potencial e da temperatura. Esses autores relataram que o principal componente estrutural da parede celular de levedura é  $\beta$ -1,3- glucana insolúvel em álcali com 3 a 6 % de ramificações  $\beta$ -1,6. As observações microscópicas mostraram a agregação destas microfibras na parte interna da parede celular. A glucana solúvel em álcali tem estrutura química semelhante à insolúvel, mas apresenta maior número de ramificações  $\beta$ -1,6. A glucana álcali-solúvel representa aproximadamente 20 % da parede celular e a análise estrutural revelou a presença de 80 – 85 % de ligações  $\beta$ -D- 1,3; 8 a 12 % de ligações  $\beta$ - D- 1,6 e 3 – 4 % de resíduos de ramificações ligados por C-1, C-3 e C-6.

Kaneko et al. (1973) testaram 26 linhagens dos gêneros *Saccharomyces* e *Candida*, e certificaram que as células de leveduras foram mais facilmente lisadas enzimaticamente após tratamento com calor, exceto para a linhagem *S. carsbergensis* KI 4055. A susceptibilidade das leveduras a ação enzimática variou com gênero e espécie. A maioria das linhagens de levedura *Candida* foram menos susceptíveis a ação enzimática do que as linhagens de *Saccharomyces*, mas após tratamento com 2-mercaptoetanol as linhagens de *Candida* tornaram-se tão susceptíveis quanto as linhagens de *Saccharomyces*. As linhagens de *Rhodotorula* e *Sporobolomyces* não mostraram-se susceptíveis a ação enzimática, isso porque as suas células não contém glucana na parede celular, mas sim quitina e manana.

Kopecká et al. (1974) estudaram a ultraestrutura da parede celular de isolados de *S. cerevisiae* durante a fase exponencial e a fase estacionária. Os autores verificaram que as regiões de brotamento de leveduras são estruturas resistentes ao efeito das  $\beta$ -1,3-glucanases. Esta enzima pode ser usada nos estudos da rede microfibrilar de leveduras e também para a recuperação de protoplastos. O desaparecimento por completo das microfibrilas, após o tratamento com as  $\beta$ -1,3-glucanases de *S. versatilis*, confirmou que estes componentes fibrilares são constituídos de glucanas com ligações  $\beta$ -1,3. Os autores relataram que as moléculas ramificadas de glucana apresentam papel importante, permitindo a associação das cadeias mais afastadas de polissacarídeos com outras moléculas de ramificações superficiais, dando origem a um componente fibrilar contínuo. A representação qualitativa da molécula de glucana ramificada poderia refletir na densidade da rede que forma a camada de glucana.

Kreger & Kopecká (1976) confirmaram a posição interna da fração de glucana na parede celular de leveduras, através de observações em microscópio eletrônico.

Katohda et al. (1976) salientaram que, a maioria dos estudos da composição da parede celular foi realizada em células de leveduras na fase estacionária de crescimento. Estudos realizados com células filhas jovens de leveduras mostraram que, o conteúdo de glucana insolúvel da parede celular foi muito menor, ao passo que o conteúdo de glucana álcali solúvel foi, correspondentemente, maior do que nas células velhas.

Fleet & Manners (1976) confirmaram que a parede celular de *S. carlsbergensis* continha, aproximadamente, 20 % de glucana alcalina insolúvel, sendo que a sua maioria continha ligações  $\beta$ -1,3-D.

De acordo com o modelo da parede celular de leveduras, proposto por Obata et al. (1977b), as moléculas de proteínas estão localizadas na camada de

manana e distribuídas esporadicamente na rede de glucana da parede de levedura, como um material ligante.

Hinton & Pressey (1980) relataram que as glucanas são encontradas em microrganismos e plantas superiores como principais componentes da parede celular, como material citoplasmático ou material de reserva vacuolar, e como substâncias extracelulares. As glucanas são polímeros não cíclicos de anidroglicose unidos por ligações  $\beta$ -1,3 glucosídicas contendo ramificações de ligações  $\beta$ -1,6, as quais pertencem a uma das classes mais abundante de polissacarídeos.

Valentin et al. (1987) relataram que a parede celular de levedura pode compor 30 % do peso seco de sua célula, e portanto, a sua síntese representa um investimento consideravelmente importante para a levedura.

Hunter & Asenjo (1988) relataram que a parede celular de *Saccharomyces* sp., é composta principalmente por uma complexa estrutura dos biopolímeros manana, proteína e glucana e pequena quantidade de quitina. Os autores consideraram que a parede celular de leveduras não é quimicamente uniforme e a sua estrutura física é anisotrópica, formada por duas barreiras, sendo uma camada externa de manana e proteínas que estão sempre juntas na forma do complexo manana- proteína e, uma camada interna formada de uma mistura de  $\beta$ -1,3 e  $\beta$ -1,6 glucanas. Cerca de 50 – 60 % da parede corresponde a glucana composta de moléculas de glicose unidas por ligações  $\beta$ -1,3 e  $\beta$ -1,6 e o restante corresponde ao complexo manana- proteína e algumas glicoproteínas ligadas à parede e ao periplasma.

Klis (1994) relatou que a maioria dos estudos de composição da parede celular de levedura mostravam uma estrutura estática de composição constante, mas que a mesma tem uma estrutura altamente dinâmica. O conteúdo de glucana álcali insolúvel é muito maior em células velhas do que nas células filhas- jovens, pois a glucana álcali-solúvel, depositada na parede celular, se liga, posteriormente, a quitina, tornando-se álcali-insolúvel.

Van Der Vaart et al. (1995) consideraram que a glucana constituia a camada interna da parede celular, e as mananas-proteínas estavam embebidas na camada de glucana e encobriam a mesma. As mananas-proteínas protegiam a estrutura de glucana contra a ação das glucanases.

Osumi (1998) estudou e observou a ultraestrutura e a formação da parede celular da levedura *Candida albicans* com um microscópio eletrônico de varredura (SEM) e com um microscópio eletrônico de transmissão (TEM). A autora verificou que os protoplastos de *C. albicans* que foram regenerados pela síntese das microfibrilas da sua superfície, apresentaram uma imensa rede ou malha de longas fibrilas. Esta estrutura microfibrillar era formada de cadeias de  $\beta$ -1,3-glucana que foram quebradas após tratamento com  $\beta$ -1,3-glucanase.

Mrsa & Tanner (1999) e Mrsa et al. (1999) relataram que a parede celular de *S. cerevisiae* contém cerca de 20 manana-proteínas. Estas apresentam diferentes funções na síntese, manutenção e modificação da parede, em diferentes estágios de desenvolvimento das células ou outras condições. Além disso, são importantes para a interação das células com o meio ambiente.

Kapteyn Et Al. (1999), Popolo & Vai (1999) E Kapteyn et al. (2000) citaram que a parede celular de leveduras consiste de quatro classes de macromoléculas, denominadas: proteínas de parede celular,  $\beta$ -1,6-glucanas,  $\beta$ -1,3-glucanas e quitinas, que estão interconectadas por ligações covalentes. Os autores relataram que a composição molecular da parede celular não é fixa. A parede é uma estrutura dinâmica, pois a célula pode ter ajustes consideráveis na composição e estrutura durante o ciclo celular ou em resposta às condições de desenvolvimento, como oxigênio, nutrientes, temperatura e pH.

Gacto et al. (2000) sugeriram que a camada de glucana que compõe a parede de células de leveduras, não está diretamente acessível à endo  $\beta$ -1,3-glucanase purificada e que componentes proteicos externos previnem a quebra destes polímeros na célula inteira. Eles propuseram que as proteases agem, sinergicamente, com a  $\beta$ -1,3-glucanase e que a ação primária das proteases,

sobre os componentes da superfície, permitem a solubilização subsequente da camada interna de glucana conduzindo à lise.

## 2.2- Microrganismos produtores de enzimas líticas

Em 1965, Webley et al., isolaram da superfície de raízes de gramíneas, a bactéria *Cytophaga johnsonii*, produtora de enzimas capazes de lisar leveduras. Esta bactéria cresceu em meio contendo sais minerais, 0,1 % de peptona e 1 mg / mL de parede celular como indutor. Os autores observaram que, existia uma barreira que dificultava a ação das  $\beta$ -glucanases produzidas pela bactéria na lise da parede celular da levedura. Por este motivo, foi sugerido a necessidade da degradação dessa barreira usando-se autoclavagem das células, tratamento com tiol, tratamento com álcali ou mesmo, um tratamento enzimático (citado por Bacon et al., 1970).

A ação lítica da lisozima, extraída da clara de ovo, sobre microrganismos já era há muito tempo conhecida, porém muitas bactérias apresentavam resistência a estas enzimas. Na década de 60, com a necessidade de se desenvolver novas técnicas para o estudo da estrutura química da parede celular desses microrganismos, teve início o interesse pelas enzimas líticas microbianas. Ward & Perkins (1968) sugeriram que para a investigação da parede celular e dos componentes intracelulares dessas bactérias resistentes a lisozima havia a necessidade do isolamento de enzimas mais apropriadas.

Kitamura & Yamamoto (1972) isolaram de resíduos de cervejarias, linhagens de *Arthrobacter luteus* capazes de lisar parede celular de leveduras. Os autores observaram a indução da produção de enzimas com atividade de lise de células de leveduras quando os microrganismos foram cultivados em meio contendo células de leveduras ou  $\beta$ -1,3- glucana como fonte de nutrientes.

Yoshimoto & Tsuru (1972) isolaram *Streptomyces griseus* com capacidade de lisar as células de *Staphylococcus aureus*. A preparação enzimática bruta produzida por *S. griseus* mostrou, aparentemente, uma alta atividade lítica sobre células intactas de *S. aureus*. Dois tipos de enzimas, F1 e F2 que lisam *S. aureus*, foram altamente purificadas do caldo de cultura da cepa *S. griseus* S-35. Estas enzimas atuam como uma lisozima e uma peptidase chave. No entanto, a atividade das enzimas isoladamente foi baixa, e verificaram que, a ação enzimática foi dependente da ação sinérgica de todas elas. Se estas duas enzimas fossem combinadas e incubadas com células de *S. aureus*, a lise seria notavelmente maior.

Yamamoto & Nagasaki (1975a) isolaram *Flavobacterium dormitator var. glucanolyticae* de amostras de solo, uma bactéria produtora de enzimas glucanolíticas. Esta bactéria foi testada para a produção de mananase e produziu uma exo-  $\alpha$ -1,2-mananase que reage em camada de manana da parede celular de diferentes espécies de *Saccharomyces*. Como resíduos da ação desta enzima sobre a manana, foram obtidos manose ([M<sub>1</sub>]), manotriose ([M<sub>3</sub>]) e manotetraose ([M<sub>4</sub>]). Esta ação enzimática à camada de manana da levedura removeu unidades sucessivas de monossacarídeos com ligações  $\alpha$ -1,2, a partir do final não- redutor. Entretanto, estas enzimas requeriam ligações  $\alpha$ -1,2 manosídicas para sua ação, diferentes das enzimas  $\alpha$ -1,2-manosidasas de *Arthrobacter* que rompiam ligações  $\alpha$ -1,2 e  $\alpha$ -1,3 de manose.

Yoshimoto et al. (1975) isolaram cepas de *Streptomyces* sp P-51 de solo, que produzem, extracelularmente, enzimas líticas ativas, capazes de agir contra células de *Pseudomonas* IFO 3448. A maioria das enzimas líticas mostraram atividade sobre bactérias Gram positivas, como por exemplo, *Micrococcus lysodeikticus* e *Bacillus subtilis*, e foram inertes sobre bactérias Gram negativas, exceto para a *Streptomyces* sp P- 51.

Hayashi et al. (1981a e b) isolaram de amostras de solo, linhagens de *Streptomyces rugersensis*, que apresentaram atividade lítica contra células liofilizadas de *Streptococcus faecalis* sp.

Hasuo et al. (1984) e Yamamoto et al. (1984) isolaram microrganismos que lisaram leveduras (YLM) a partir de lodo ativado de tanques de sistemas de tratamento de água de indústrias de alimentos e de bebidas alcoólicas no Japão. Estas bactérias se aderem à célula e lisam a parede celular de espécies de *Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenula* e *Candida*.

O gênero *Oerskovia*, do grupo das bactérias corineformes, produzem enzimas que lisam a parede celular de leveduras. De acordo com Lechevalier & Lechevalier (1984) essas bactérias podem ser encontradas no solo, em plantas em decomposição, na água de esgoto de cervejarias, em géis de hidróxido de alumínio e algumas espécies podem ser encontradas inclusive em amostras de sangue.

Doi & Doi (1986) construíram uma bactéria recombinante com capacidade de produzir  $\beta$ -1,3-glucanase. Esses autores inseriram e clonaram o gene de uma  $\beta$ -1,3-glucanase da linhagem de *Arthrobacter* YCWD3 em células de *Escherichia coli* HB101. Os plasmídeos recombinantes inseridos corretamente no DNA foram clonados pelas células transformadas de *E. coli*. Em meio agar contendo células de leveduras de panificação ou glucanas de levedura, uma zona clara ao redor das colônias transformantes de *E. coli* foi verificada e mostraram ser capazes de lisar parede celular.

Yamamoto et al. (1987) isolaram bactérias do lodo ativado do sistema de tratamento de água de fábricas de alimentos e cervejarias. Todos os 36 isolados semelhantes, mostraram capacidade de aderir-se à superfície de todas as células viáveis das espécies *Saccharomyces cerevisiae* e *Hansenula*, e de algumas espécies de *Candida*, aglutinando-as e lisando-as. Quando inocularam bactérias YLM-1 e leveduras em Agar nutriente observaram que as linhagens YLM-1 lisaram as colônias de leveduras e cresceram ao seu redor formando colônias satélites de

YLM-1, mas não cresceram ao redor das colônias intactas. Os autores relataram a necessidade de um fator de crescimento, e concluíram que tais bactérias necessitavam de compostos hemes ou hemeproteínas, catalases ou peroxidases de raiz forte, como fator de crescimento. As bactérias YLM-1 foram capazes de crescer em meio contendo células de leveduras, como única fonte de carbono e nitrogênio. A atividade lítica foi detectada em caldo de cultura concentrado, e as enzimas líticas foram produzidas na superfície da célula da bactéria YLM-1.

DOI & DOI (1986), construíram uma bactéria recombinante com capacidade de produzir  $\beta$ -1,3- glucanase. Esses autores, inseriram e clonaram o gene de uma  $\beta$ -1,3- glucanase da linhagem de *Arthrobacter* YCWD3, em células de *Escherichia coli* HB101. Os plasmídeos recombinantes inseridos corretamente no DNA foram clonados pelas células transformadas de *E. coli*. Em meio agar contendo células de leveduras de panificação ou glucanas de levedura, verificaram uma zona clara ao redor das colônias transformantes de *E. coli*, que mostraram ser capazes de lisar parede celular.

YAMAMOTO et al. (1987), isolaram bactérias do lodo ativado do sistema de tratamento de água de fábricas de alimentos e cervejarias. Todos os 36 isolados semelhantes, mostraram capacidade de se aderir à superfície de todas as células viáveis das espécies *Saccharomyces cerevisiae* e *Hansenula*, e de algumas espécies de *Candida*, aglutinando- as e lisando- as. Quando inocularam bactérias YLM- 1 e leveduras em Agar nutriente, observaram que as linhagens YLM- 1 lisaram as colônias de leveduras e cresceram ao seu redor formando colônias satélites de YLM- 1, mas não cresceram ao redor das colônias intactas. Os autores relataram a necessidade de um fator de crescimento, e concluíram que tais bactérias necessitavam de compostos hemes ou hemeproteínas, catalases ou peroxidases de raiz forte, como fator de crescimento. As bactérias YLM- 1 foram capazes de crescer em meio contendo células de leveduras, como única fonte de carbono e nitrogênio. A atividade lítica foi detectada em caldo de cultura concentrado, e as enzimas líticas foram produzidas na superfície da célula da bactéria YLM-1.

Yeo et al (1998) isolaram uma linhagem de *Bacillus alcalophilus* subsp YB380, que produzia uma hidrolase extracelular que lisava a parede celular de levedura em pH alcalino. A enzima apresentou atividade ótima em pH 9,0 a 60°C e o peso molecular foi estimado em 27.000 Da.

Gacto et al. (2000) estudaram o crescimento de *Micromonospora chalcea*, um actinomiceto, 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 leveduras.

### **2.3- Características bioquímicas e fisiológicas de microrganismos que lisam leveduras**

Em 1947, Conn & Dimmick classificaram e descreveram pela primeira vez o gênero *Arthrobacter* (considerações relatadas por Keddie et al, 1986). Estas bactérias tiveram como principal hábitat o solo, mas também podiam ser freqüentemente encontradas em lodo ativado, em peixes e no fundo do lixo. As bactérias do gênero *Arthrobacter* caracterizaram-se por apresentarem o ciclo de crescimento bastonete- cocos em meio complexo. Na fase exponencial a cultura foi composta inteiramente por bastonetes irregulares e então, na fase estacionária foram se transformando em cocos de 0,6 - 1,0 µm de diâmetro. Ambas as formas foram Gram- positivas que se descoloriram rapidamente. Algumas células arranjam-se em forma de V, mas outras em formas mais complexas. Não formaram esporos. Os bastonetes, normalmente, não apresentaram motilidade, mas poderiam ter motilidade, ocasionalmente. Os microrganismos eram obrigatoriamente aeróbios. A temperatura ótima de crescimento foi 25 – 30°C; a maioria cresceu entre as temperaturas 10 – 35°C, muitas cresceram a 5°C e poucas a 37°C. Cresceram razoavelmente bem em meio com extrato de levedura e peptona em pH próximo ao neutro. Pouco ou nenhum ácido foi produzido a partir da glicose e de outros açúcares em meio com peptona. As bactérias são catalase-

positiva e hidrolisam freqüentemente a gelatina. Em Agar com levedura e peptona, as colônias apresentaram 3 - 5 mm de diâmetro e mostraram freqüentemente a cor creme, mas algumas vezes amarela; poucas espécies produziram pigmento azul, mas somente em meio específico.

Yamada & Komagata (1970a e b) discutiram o critério de identificação microbiana, baseado no conteúdo C + G do DNA, usado para identificar linhagens de bactérias corineformes, isoladas de solo. Eles verificaram que os gêneros, *Corinebacterium*, *Arthrobacter*, *Microbacterium* e *Brevibacterium*, não exibiram uma taxa específica para o conteúdo de C + G e, portanto, cada gênero não pode ser definido com base, somente, desta análise. Concluiu-se que, exceto para *Cellulomonas*, os demais gêneros da categoria das bactérias corineformes, são taxonomicamente heterogêneos.

Rogosa et al. (1974) relataram algumas características morfológicas do grupo de bactérias corineformes. Estes microrganismos mostram formação de bastonetes irregulares e em formas de V, não formam esporos, e são Gram-positivas.

Komura et al. (1975) isolaram do ar microrganismos que produziram enzimas líticas de leveduras. Os isolados tinham formas de bastonetes Gram positivos e eram aeróbios, não formavam endo- esporos, mas eram catalase positivo. Estes microrganismos formavam micélios ramificados no substrato que normalmente se quebravam em células filhas móveis. As cepas produziram um pigmento amarelo, reduziram nitrato, hidrolisaram amido e liquefizeram gelatina. Estes microrganismos continham lisina na parede celular e o conteúdo C + G do DNA foi 71,2 %. Esta cepa foi identificada como pertencente ao gênero *Oerskovia*.

Scott & Schekman (1980) usaram a linhagem *Oerskovia xanthineolytica* LL-G109 em meio M63 descrito por Siström (1958), para a produção de uma preparação bruta de lyticase contendo endoglucases e proteases ativas, que agem sinergicamente na lise das células de leveduras. Este organismo foi isolado e identificado, originalmente, como *Arthrobacter luteus* 73-14 por Yashishi

Yamamoto (Kirin Brewery, Takasaki, Gunma, Japan). Esta linhagem foi, posteriormente, reclassificada por Mary Lechevalier (Rutgers University, New Jersey) como *Oerskovia xanthineolytica* LL-G109.

A classificação e a identificação microbiana, é realizada através de testes bioquímicos, taxonômicos e quimiotaxonômicos. Miller (1982) considerou que os ácidos graxos metil ésteres (FAME), são importantes constituintes do envelope celular e relatou que a análise da composição dos mesmos tem sido reconhecida como ferramenta quimiotaxonômica valiosa para a classificação e identificação de bactérias. Novas técnicas de identificação, as quais baseiam-se nos perfis dos FAMES da parede celular e nas análises de oxidações de fontes de carbono pelo microrganismo, estão sendo desenvolvidas por alguns autores.

De acordo com Collins & Cummins (1984) as bactérias do gênero *Corynebacterium* caracterizam-se por apresentarem bastonetes retos ou levemente curvados. São Gram positivas, não formam esporos, nem apresentam motilidade. São aeróbios facultativos, mas alguns são aeróbios. Os microrganismos são catalase-positiva. A maioria dessas bactérias cresce em temperaturas de 30 a 37°C e produzem ácido a partir da glicose e outros açúcares em meio com peptona. Para o crescimento celular elas necessitam de uma ou mais vitaminas, aminoácidos, purinas e pirimidinas.

Yamamoto et al. (1988) descreveram as características das bactérias *Rarobacter* gen. nov. capazes de lisar a parede celular de leveduras. Os microrganismos apresentaram forma de bastonetes irregulares de 0,2 a 0,3 por 0,8 a 1,0 µm, coloração Gram positiva, mas descoradas. Apresentaram motilidade por múltiplos flagelos e não formaram esporos. Essas bactérias foram quimiorganotróficas, e apresentaram crescimento ótimo à 30°C e na faixa de pH 6 a 8. Essas bactérias não reduziram nitrato para nitrito, utilizaram sal de amônio como fonte de nitrogênio, mas não o nitrato. Produziram ácidos, aeróbia e anaerobiamente, a partir de D-glicose e D-manose, mas não a partir de L-arabinose ou L-ramnose. As bactérias *Rarobacter* sp hidrolisaram amido, caseína e gelatina, mas não a celulose e nem produziram acetoína e indol. Apresentaram

testes positivos para oxidase. As bactérias *Rarobacter faecitabidus* sp nov (YLM-1) são aeróbias facultativas e necessitam de compostos heme ou hemeproteínas junto com biotina e tiamina para o crescimento aeróbio e apenas de dióxido de carbono para o crescimento anaeróbio. No agar nutriente contendo catalase as colônias foram amarelo-claras, opacas, circulares, convexas, inteiras e lisas. As bactérias produziram ácido, aeróbia e anaerobiamente, a partir de glicose, D-frutose, D-manose, maltose, celobiose, dextrina, arbutina, mas não a partir de L-arabinose, L-ramnose, D-galactose, L-sorbose, lactose, trealose, rafinose, inulina, glicerol, eritritol, manitol, D-sorbitol, inositol, esculina ou  $\alpha$ -metil-D-glicose. Não produziram H<sub>2</sub>S. Foram microrganismos DNase e urease negativos e catalase positivo. A composição de bases de DNA foi 65,7- 66,1 mol % de G+C determinada por CLAE. A composição de aminoácidos do peptídeoglicano da parede celular foi D-Ala, L-Ala, D-Glu, L-Orn e D-Ser (1:1:2:1:1). Esta bactéria adere-se à parede de leveduras do gênero *Saccharomyces* e *Hansenula*, aglutina-se a elas e provoca sua lise. Os autores relataram que o ácido 12-metiltetradecanóico (anteiso-C<sub>15</sub>) compõe quase 50 % dos ácidos graxos da parede celular do novo gênero *Rarobacter* gen. nov. Com base na comparação desses ácidos graxos e na composição dos peptídeoglicanos encontrados nas paredes celulares desses isolados, comparando-os com aqueles encontrados em outros gêneros, descritos na literatura, foi sugerido um novo gênero para estas linhagens.

Keddie et al., citado por Williams et al. (1989), verificaram que duas linhagens de *Cellulomonas* assimilaram, respectivamente, 16 e 28 dos 180 compostos orgânicos testados. Estas espécies utilizaram como única ou como principal fonte de carbono e energia os seguintes compostos: celulose, amido, D-xilose, L-arabinose, D-glicose, D-manose, D-galactose, celobiose, maltose, trealose e sacarose. Membros deste gênero produzem enzimas que degradam celulose (citação de Stackebrandt & Keddie, 1989)

De acordo com Lechevalier & Lechevalier (1989), citado por Williams et al. (1989), as bactérias do gênero *Oerskovia* foram isoladas de solos, de matéria vegetal em decomposição, esgoto de cervejarias e em amostras de sangue. As

ativa e ornitina, enquanto a *Oerskovia* apresentou a formação de micélio. Porém, atualmente, a *C. cellulans* está relacionada aos membros de *Oerskovia*, com base na análise comparativa de RNAr-16S e pela homologia do DNA, auxiliado pelas características quimiotaxonômicas.

Stackebrandt & Keddie (1989) citado por Williams et al. (1989), e Stackebrandt & Prauser (1991) relataram que a *Oerskovia xanthineolytica*, um actinomiceto que lisou célula de leveduras, anteriormente conhecida como *Arthrobacter luteus*, agora com base em análises quimiotaxonômicas, pode ser considerada como um sinônimo subjetivo de *Cellulomonas cellulans*.

Goto-Yamamoto et al. (1993a) isolaram bactérias corineformes que lisam leveduras de amostras de solo, de flores, de alimentos fermentados. Estas bactérias foram identificadas como linhagens de *Rarobacter incanus* que diferiram da bactéria *R. faecitabidus* na composição de aminoácidos dos peptidoglicanos da parede celular, na quantidade porcentual de G+C no DNA e na atividade de catalase. *R. faecitabidus* tem resíduo de serina no peptidoglicano da parede celular. O grupo de bactérias YLM-32, no qual se encontra *R. incanus*, apresentou 64,6 a 65,5 mol % de G+C enquanto que *R. faecitabidus* sp nov. apresentou 65,7 a 66,1 mol %.

Goto-Yamamoto et al. (1993b) isolaram no Brasil, 50 linhagens de bactérias que produziram enzimas capazes de lisar células de leveduras. Estas bactérias foram isoladas a partir da água de sistemas de tratamento de resíduos de indústrias de alimentos e de bebidas alcoólicas, amostras de madeira, como também de flores e frutos, ricos em açúcares fermentecíveis. No entanto, estas bactérias foram isoladas com uma frequência bem maior, de alimentos fermentados, de água e de madeira do que de flores e frutos. Das 271 amostras foram isoladas 50 linhagens, sendo que 46 linhagens de bactérias, que lisam *Saccharomyces cerevisiae* e requerem heme proteína para crescimento aeróbico foram identificadas como *Rarobacter* e subdivididas em 3 grupos: *R. faecitabidus* YLM-1, *R. incanus* YLM-32 e um grupo não identificado foi denominado YLM-115. As outras quatro linhagens Gram positivas não exigiram grupo heme para o

*Arthrobacter luteus*, agora com base em análises quimitaxonômicas, pode ser considerada como um sinônimo subjetivo de *Cellulomonas cellulans*.

Goto-Yamamoto et al. (1993a) isolaram bactérias corineformes que lisam leveduras de amostras de solo, de flores, de alimentos fermentados. Estas bactérias foram identificadas como linhagens de *Rarobacter incanus* que diferiram da bactéria *R. faecitabidus* na composição de aminoácidos dos peptideoglicanos da parede celular, na quantidade porcentual de G+C no DNA e na atividade de catalase. *R. faecitabidus* tem resíduo de serina no peptideoglicano da parede celular. O grupo de bactérias YLM-32, no qual se encontra *R. incanus*, apresentou 64,6 a 65,5 mol % de G+C enquanto que *R. faecitabidus* sp nov. apresentou 65,7 a 66,1 mol %.

Goto-Yamamoto et al. (1993b) isolaram no Brasil, 50 linhagens de bactérias que produziram enzimas capazes de lisar células de leveduras. Estas bactérias foram isoladas a partir da água de sistemas de tratamento de resíduos de indústrias de alimentos e de bebidas alcoólicas, amostras de madeira, como também de flores e frutos, ricos em açúcares fermentecíveis. No entanto, estas bactérias foram isoladas com uma freqüência bem maior, de alimentos fermentados, de água e de madeira do que de flores e frutos. Das 271 amostras foram isoladas 50 linhagens, sendo que 46 linhagens de bactérias, que lisam *Saccharomyces cerevisiae* e requerem heme proteína para crescimento aeróbico foram identificadas como *Rarobacter* e subdivididas em 3 grupos: *R. faecitabidus* YLM-1, *R. incanus* YLM-32 e um grupo não identificado foi denominado YLM-115. As outras quatro linhagens Gram positivas não exigiram grupo heme para o crescimento aeróbico; duas delas foram identificadas como *Oerskovia*, uma como *Arthrobacter* e a quarta não foi identificada.

Yang et al. (1993) introduziram um sistema automático de cromatografia gás-líquida conectado a um computador, para a identificação rápida de isolados de bactérias com base no perfil de ácidos graxos metil ésteres (FAMES) da parede celular dessas linhagens selecionadas, comparando- as com as linhagens de referência.

Lee et al. (1996) construíram uma base de dados para análise de ácidos graxos metil-ésteres (FAMES), para a identificação de isolados bacterianos pelo Sistema de Identificação Microbiana (MIDI; Microbial ID, Inc., Newark, Delaware, U.S.A.). Estes autores relataram que a técnica de cromatografia gasosa-líquida para a identificação de 79 cepas de *Leuconostoc* isoladas de Kimchi foi realizada com sucesso e sugeriram que este método pode ser aplicado para uma identificação rápida de bactérias lácticas.

Lee et al. (1997) descreveram um sistema de classificação e identificação microbiana automática baseada na capacidade das linhagens de oxidar 95 tipos diferentes fontes de carbonos, dos quais incluem aminoácidos, ácidos carboxílicos e carboidratos. O resultado revela a impressão digital metabólica das linhagens testes, o qual é comparado com a impressão digital das linhagens registradas em uma base de dados.

#### **2.4- Produção, purificação e caracterização das enzimas líticas**

As enzimas  $\beta$ -1,3-glucanases são produzidas por fungos, bactérias, plantas superiores, algas e moluscos (Yamamoto & Nagasaki, 1975b).

Bacon et al. (1970) usaram parede celular de levedura de panificação *Saccharomyces cerevisiae* como indutor para a produção das enzimas líticas de

*Cytophaga johnsonii*. O sobrenadante deste meio de cultura apresentou 0,16 U / mL, utilizando-se laminarina como substrato, após uma hora de incubação a 30°C. A preparação de  $\beta$ -1,3-glucanase produzida por *Cytophaga johnsonii* foi purificada através de coluna cromatográfica de Sephadex G-100, onde foram obtidas três regiões com atividade lítica. As frações que apresentaram atividade enzimática foram combinadas e separadas em coluna de DEAE- celulose. Neste caso, foi possível verificar uma perda significativa na atividade enzimática, pois detectou-se pouca  $\beta$ -1,3-glucanase ativa e pouquíssima  $\beta$ -1,6-glucanase. Após o processo de purificação estas enzimas não produziram lise quando ensaiadas com células viáveis de leveduras.

Kitamura & Yamamoto (1972) obtiveram um complexo de enzimas líticas do caldo enzimático produzido por *Arthrobacter luteus*. Este complexo enzimático requeria polímeros lineares de glicose com ligações  $\beta$ -1,3 como substrato específico. A purificação do caldo foi feita em coluna de Biogel CM-100 e a enzima purificada foi denominada zymolyase. Esta enzima apresentou atividade ótima em pH 7,5 e 35°C e perdeu 71 % da sua atividade quando incubada a 50°C por 5 minutos. O polissacarídeo paquimana termo-tratado e a glucana de leveduras foram hidrolisados pela zymolyase a unidades de laminaripentaose. A enzima comercial zymolyase que catalisa endohidrólises mostrou um valor de  $K_M$  de 10,9 mg / mL para a laminarina insolúvel.

O sobrenadante obtido do cultivo de *Arthrobacter citreus*, foi purificado em coluna de DEAE- Sephadex. A enzima  $\beta$ -1,3-glucanase lítica purificada, produzida pela bactéria mostrou-se estável por 100 min a 30°C em pH de 3,0 a 8,0, mas a sua atividade caiu rapidamente quando incubada a 60°C. A enzima apresentou atividade ótima em pH na faixa de 5,5 ~ 6,5 (Doi et al., 1973). Os autores verificaram que concentrações menores que 0,01 mM de HgCl<sub>2</sub> e 1 mM de CuSO<sub>4</sub>, inibiram a reação enzimática da  $\beta$ -1,3-glucanase de *Arthrobacter*, em 74 % e 42 %, respectivamente. As preparações enzimáticas purificadas apresentaram atividade específica de 5,5 U mg<sup>-1</sup>.

Kitamura et al. (1974) utilizaram uma coluna de CM-cellulose equilibrada com tampão 0,01 M fosfato pH 6,0, para a purificação da glucanase lítica de *Arthrobacter luteus*. Neste caso, foram obtidos três picos de proteínas, um primeiro pico observado na fração não adsorvida pela coluna, mas com  $\beta$ -1,3-glucanase ativa, um segundo pico intermediário que provavelmente foi uma combinação da  $\beta$ -1,3-glucanase adsorvida e um pouco de enzima lítica, e um terceiro pico maior que apresentou somente atividade lítica e foi eluído com tampão contendo 0,1 M NaCl. Esta enzima apresentou atividade máxima de lise de células de levedura numa temperatura de 35°C e entre pH 7,0 ~ 7,5, mostrou-se estável numa faixa de pH de 5,0 a 11,0 e perdeu completamente a estabilidade quando incubada a 60°C por 5 minutos. O peso molecular da zymolyase foi estimado em 21 kDa.

Yamamoto & Nagasaki (1975b) produziram endo- $\beta$ -1,3-glucanase de *Rhizopus chinensis* R-69. Estes organismos produziram quantidades consideráveis de várias glucanases chaves, em meio contendo células de leveduras de panificação ou farelo, como fonte de carbono. A purificação da endo- $\beta$ -1,3-glucanase foi realizada em coluna de CM-Sephadex C-50, previamente equilibrada com tampão 0,01 M acetato pH 5,0, empregando-se a eluição em gradiente de cloreto de sódio (0,03 M a 0,1 M). Duas proteínas foram eluídas e representaram dois picos, dos quais o primeiro pico foi caracterizado como uma  $\beta$ -1,3-glucanase do tipo mais aleatório que liberou oligossacarídeos de maior peso molecular, enquanto, o segundo pico foi caracterizado como uma exoenzima  $\beta$ -1,3-glucanase, a qual produziu pequenos oligossacarídeos, resultando numa grande quantidade de açúcares redutores. As frações que continham a enzima deste segundo pico foram reunidas para a purificação e caracterização. A enzima mostrou maior atividade à 55°C e a sua inativação teve início em 50°C. A hidrólise da laminarina pela  $\beta$ -1,3-glucanase mostrou-se mais susceptível quando o ensaio foi realizado em pH 5,0, enquanto que a enzima revelou-se estável numa faixa de pH entre 4,0 a 8,0.

Yoshimoto et al. (1975) caracterizaram a enzima lítica de *Streptomyces* sp P-51 que lisa leveduras, e verificaram que ela mostrou-se estável na faixa de pH 4,0 a 8,0 por 20 minutos a 70 °C, e a atividade ótima da enzima foi no pH ao redor de 5,0 a 55 °C.

Nagasaki et al. (1976) purificaram uma endo- $\beta$ -1,3-glucanase de *Flavobacterium dormitator* var. *glucanolyticae*. O caldo enzimático foi aplicado em uma coluna de SE- Sephadex C- 50, previamente equilibrada com tampão 0,01 M fosfato de potássio pH 5,0. Três picos foram obtidos, sendo que a enzima lítica do terceiro pico apresentou alta atividade específica, apesar da maior parte da atividade lítica ter ficado adsorvida na coluna. Por apresentar maior atividade lítica, somente as frações ativas do terceiro pico foram reunidas para a purificação e caracterização da enzima. A atividade máxima mostrada pela enzima foi numa temperatura de 50°C, e o pH ótimo foi 6,0. Para a hidrólise da laminarina e rompimento de células de leveduras, a  $\beta$ -1,3-glucanase apresentou-se estável numa faixa de pH entre 6,0 a 9,0 quando aquecida a 50°C por 10 min. A inativação da enzima ocorreu em 10 minutos a 45°C e a temperaturas maiores que 60°C perdeu imediatamente a sua atividade. O valor de  $K_M$  da  $\beta$ -1,3-glucanase foi estimado em 0,26 mg / mL para o substrato laminarina. Os autores verificaram que a  $\beta$ -1,3-glucanase de *Flavobacterium dormitator* var. *glucanolyticae* foi fortemente inibida pelos compostos metálicos:  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  em 83,2 %, e  $Pb(NO_3)_2$  em 58,6 %, enquanto foi 9,7 % e 14,6 % mais ativa na presença de  $CoCl_2 \cdot 6H_2O$  e  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , na concentração final de 1 mM, respectivamente. Os autores verificaram que a  $\beta$ -1,3-glucanase de *Flavobacterium dormitator* var. *glucanolyticae* foi fortemente inibida por  $KMnO_4$  e EDTA, e ativada na presença de oxalato de sódio, de laurilsulfato de sódio ou de dietilditiocarbamato de sódio, na concentração final de 1 mM.

Obata et al. (1976) estudaram a produção e caracterização das enzimas líticas da linhagem *Oerskovia* sp CK. Os autores obtiveram alta atividade de enzimas que lisam leveduras, tanto na fase logarítmica como na fase estacionária, após o cultivo do microrganismo em um meio contendo células de leveduras liofilizadas. As três  $\beta$ -1,3-glucanases purificadas, foram designadas

como: F-0, F-2 e F-L. A enzima F-0 mostrou alta atividade de  $\beta$ -1,3-glucanase e baixa atividade lítica sobre as células de leveduras, apresentou um peso molecular de 29 kDa, e atividade ótima em pH 6,5 e 50 - 55°C. A enzima F-2 mostrou também alta atividade de  $\beta$ -1,3-glucanase, e atividade lítica muito baixa. A  $\beta$ -1,3-glucanase F-2 apresentou peso molecular de 12 kDa, atividade ótima em pH 7,5 e 35°C. A enzima F-L mostrou baixa atividade de  $\beta$ -1,3-glucanase sobre glucana de leveduras, peso molecular de 29 kDa, e atividade ótima em pH 6,5 e 50 - 55°C.

Obata et al. (1977a) relataram que a enzima F-L é uma protease que atua sinergicamente com a enzima  $\beta$ -1,3-glucanase na lise de levedura. O tratamento térmico a 60°C por 15 minutos causou a autólise da enzima F-L. Portanto, percebeu-se uma diminuição da atividade lítica, mas permaneceu inalterada a atividade proteolítica da enzima. Esta enzima foi essencial para a lise de células de leveduras.

Continuando os estudos Obata et al. (1977b) verificaram que a enzima F-L mostrou alta atividade lítica em células viáveis de leveduras. As enzimas F-0 e F-2 mostraram atividade lítica baixa ou nenhuma, mas alta atividade de  $\beta$ -1,3-glucanase. Os resultados evidenciaram que as enzimas F-0 e F-2 não foram eficientes na lise de leveduras devido à inacessibilidade espacial a camada de glucana. No entanto o tratamento com a enzima F-L, ou com a solução alcalina ou com reagentes redutores modificaram a célula, permitiu o acesso de F-0 e F-2 à camada de glucana e, conseqüentemente, provocou a lise da célula. Foi observado um efeito sinérgico entre as enzimas F-L e F-0 ou F-L e F-2.

A  $\beta$ -1,3-D-glucanase e a manana hidrolase foram sintetizadas por *Arthrobacter* somente em condições limitadas de glicose. Portanto, estes resultados mostraram a regulação da  $\beta$ -1,3-D-glucanase e indicaram a rígida repressão catabólica a taxas de diluição maiores que 0,02 h<sup>-1</sup> de glicose. No entanto, a atividade de lise das leveduras foi ausente nessas culturas; um resultado que sugeriu que a produção de  $\beta$ -1,3-glucanases e outras enzimas responsáveis pela lise foi induzida na presença da levedura (Rowley & Bull, 1977).

Uma endo- $\beta$ -1,3-D-glucanase de centeio germinado relacionada a ação antimicrobiana, purificada por cromatografia de troca iônica em colunas de DEAE e CM-celulose, e por filtração em Bio Gel P-60, mostrou um  $K_M$  de 0,25 mg / mL com laminarina como substrato e peso molecular de 24.300 Da. A enzima apresentou atividade ótima em pH 5,0 e mostrou-se estável a 45°C (Ballance et al., 1978).

A protease produzida pela bactéria *Oerskovia* sp CK apresentou atividade ótima à 65°C e pH 10,5 para o substrato caseína. Devido a inibição da enzima por vários inibidores de serina protease, concluiu-se que esta enzima tem resíduo de serina em seu sítio ativo. A protease e a  $\beta$ -1,3-glucanase apresentaram efeito sinérgico na lise de leveduras. No entanto a lise ocorreu quando primeiramente agiu a protease. Isso foi demonstrado com a inativação da protease resultando em perda de atividade de lise da parede celular (Funatsu et al., 1978).

Morita et al. (1978) purificaram a enzima SE Lysozyme de cultura filtrada de *Streptomyces erythraeus* por coluna cromatográfica de CM-Celulose e CM-Sephadex. Esta enzima foi purificada 321 vezes e foram recuperados 31 % da atividade enzimática total. A resina de troca catiônica foi eficiente para a purificação por causa do alto ponto isoelétrico da enzima. A enzima SE lysozyme digere a parede celular de *Micrococcus lysodeikticus* e *Staphylococcus aureus*.

Scott & Schekman (1980) descreveram a produção de enzimas líticas de linhagem de *Oerskovia xanthineolytica* (originalmente identificada como *Arthrobacter luteus*). O microrganismo cresceu em meio contendo glucana insolúvel de levedura, levedura autoclavada ou glicose como fontes de carbono. Os autores obtiveram 3 U de protease / mL no meio de fermentação contendo 1,5 % de levedura autoclavada após 24 horas de incubação a 30°C. A "liticase" - sistema enzimático, que atua na lise de leveduras, produzida por este microrganismo, consistia de uma  $\beta$ -1,3-glucanase e uma protease alcalina, que atuavam sinergicamente. Enquanto, a  $\beta$ -1,3-glucanase mostrou alta afinidade por glucana, permitindo sua atividade lítica; a protease teve afinidade específica pela manana e atacou a porção protéica da camada de manana-proteína. A manana

liberada atuou como inibidora da ação da protease. A camada de manana-proteína que cobre a camada de glucana, é responsável pela integridade e rigidez estrutural da célula. Essa cobertura deve, primeiramente, ser degradada por uma protease, para que depois a  $\beta$ -1,3-glucanase possa agir. O 2-mercaptoetanol pode substituir a protease reduzindo as pontes dissulfeto das manoproteínas. Os autores verificaram que a remoção de 2-mercaptoetanol no ensaio de atividade lítica, provocou queda na ação lítica da  $\beta$ -1,3-glucanase de *O. xanthineolytica*. A glucanase atacou  $\beta$ -1,3-glucanas de forma endo-lítica aleatória, liberando oligossacarídeos de modo pH-dependente. Em pH 7,5, no pH ótimo para a lise das células, predominaram oligômeros de 5 ou mais unidades, enquanto que em pH 6,0 (o pH ótimo para a atividade da laminarinase), predominaram oligômeros pequenos e glicose. Este efeito, observado tanto para glucana de leveduras como para laminarina, provavelmente se atribuiu ao efeito do pH sobre a enzima. A enzima lítica foi retida em coluna de CM-celulose e eluída em tampão 0,01 M succinato pH 5,0, contendo 0,25 M NaCl. A eluição das proteínas da coluna cromatográfica utilizando-se gradiente de sal, não melhorou a purificação realizada. Tentativas anteriores, utilizando-se filtração em gel Sephadex resultaram, aparentemente, em perda total da atividade lítica e, o uso de grandes volumes de solução tampão, contribuiu para a perda da atividade enzimática, sugerindo que as enzimas líticas ficaram, seletivamente retidas, na coluna pela matriz de dextrana. O retardamento da atividade lítica não foi afetado por qualquer concentração de sal ou pH, mas foi anulada quando glicose (1 M) foi adicionada ao tampão de eluição. Na reação, utilizando-se azocol como substrato insolúvel, a protease apresentou, progressivamente, um aumento na sua atividade, com o aumento do pH (5,0 a 10,5). A protease ativa apareceu como uma banda simples em Bio-Gel P-30, e também em gel SDS-poliacrilamida, apesar de produtos da ação proteolítica serem detectados após estocagem por longos períodos a 0°C ou após incubação a altas temperaturas. A fração contendo atividade lítica e glucanase ativa, em coluna de Bio-Gel P-150, mostrou uma banda simples e algumas bandas claras de pesos moleculares menores, possivelmente, resultantes da ação proteolítica de quantidades traços da protease.

A produção de enzimas bacteriolíticas por cepas de *Streptomyces rutgersensis* H-46, foi acompanhada em meios contendo concentrações diferentes de glicose e extrato de soja. A alta atividade lítica foi encontrada quando a cepa H-46 foi cultivada a 30°C por 84 horas em meio composto de 2 % de extrato de soja, 1 % de glicose, 0,2 % de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> e 0,01 % de MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O, pH 7,0. Esta enzima reagiu contra células de *Streptococcus faecalis* e os autores sugeriram a possibilidade de uso destas enzimas na preservação de alguns alimentos, que podem se deteriorar pela contaminação microbiana (Hayashi et al., 1981a, b).

Sementes de *Zea mays* L., mostraram a presença de uma exo- e uma endo- glucanase envolvidas na autohidrólise da parede celular. A exo-enzima apresentou peso molecular estimado em aproximadamente 60 kDa e foi fortemente inibida por mercúrio inorgânico a uma concentração que impediu a liberação de monossacarídeos da parede celular ativa. A endo-β-D-glucanase, com peso molecular ao redor de 26 kDa, mostrou uma preferência marcante por substratos de ligações mistas e exibiu características indicando que inicia a solubilização autolítica da glucana da parede. Os produtos gerados pela endo-glucanase foram similares em distribuição de tamanho molecular por aqueles liberados pela parede ativa, enquanto, a exo- glucanase ativa foi necessária para a hidrólise exaustiva da β-D-glucana 'in vitro' (Huber & Nevins, 1981).

A enzima bacteriolítica comercial – Lysozyme–PR1 produzida por *Pseudomonas aeruginosa* P14 infectada com o fago PS17, foi testada em várias bactérias Gram negativas e Gram positivas pré- tratadas com clorofórmio. A Lysozyme–PR1, foi purificada e caracterizada por cromatografia em coluna SP-Sephadex C-50. A coluna foi equilibrada com o tampão 0,05 M fosfato de sódio pH 6,0. As frações adsorvidas com atividade lítica foram coletadas e usadas como enzima purificada. O pH ótimo da enzima ativa foi de 6,4 no entanto a metade da atividade ou mais foi perdida após ter sido incubada por 160 minutos a 4°C em vários valores de pH (Sawada et al., 1981).

Kitamura (1982a) observou o aumento do rendimento da enzima lítica do *Arthrobacter luteus* em cultura com condições otimizadas. Em meio otimizado as

bactérias apresentaram produtividade 14 vezes maior do que no meio original. O mutante M13-203 apresentou 2,6 vezes mais atividade no meio otimizado do que o parental B111-1 e produziu a mesma atividade em meio sem um indutor do que o parental na presença do indutor; esta produtividade foi aumentada pela adição de frutose ou sorbose juntamente com CM-paquimana. A produtividade da enzima lítica foi fortemente aumentada com a presença da cetohexose e da CM-paquimana, isso porque o mecanismo de indução da enzima lítica foi afetado pelos dois, independentemente.

A caracterização das zymolyases A e B, produzidas por *Arthrobacter luteus*, mostraram ser uma glucanase e uma protease, respectivamente. As enzimas foram purificadas por cromatografia em colunas de filtração em gel Biogel P-150. O efeito sinérgico foi constatado quando se verificou que as frações A e B sozinhas não mostraram atividade, mas a mistura de ambas as frações, resultaram em alta atividade lítica. A  $\beta$ -1,3-glucanase (zymolyase A) de *A. luteus* mostrou peso molecular de 58 kDa, estimado por gel SDS-poliacrilamida (Kitamura, 1982b).

Durante a determinação das propriedades de uma exo- $\beta$ -1,3-glucanase de leveduras, Sanchez et al. (1982) verificaram que nas frações eluídas da coluna de filtração em Biogel, não foi encontrada atividade enzimática. Isto sugere que a enzima ficou presa na matriz do Biogel, e suas propriedades são dependentes da força iônica.

Asenjo et al. (1985) estudaram o uso da glucana e parede celular de levedura como indutores do sistema enzimático lítico da *Oerskovia* sp e, verificaram que, potencialmente, a glucana pura foi o melhor indutor. A enzima  $\beta$ -1,3-glucanase apareceu 5 horas após a adição de glucana pura, e somente 10 horas após a adição da parede celular de levedura; além disso, a atividade da enzima na presença de glucana pura como indutor foi três vezes maior.

Totsuka & Usui (1986) purificaram a endo- $\beta$ -1,3-D-glucanase de uma preparação comercial denominada "kitalase" obtida do filtrado da cultura de

*Rhizoctonia solani*. Esta preparação continha uma mistura de enzimas que hidrolisou ligações  $\beta$ -1,3 e  $\beta$ -1,4 da glucana. O peso molecular das duas glucanases de *R. solani* foi estimado em 70 e 29 kDa por gel SDS-poliacrilamida. Os autores verificaram que íons metálicos na concentração de 0,4 mM não afetaram muito a atividade da  $\beta$ -1,3-glucanase de *R. solani*, e que somente com o  $Hg^{2+}$  observaram queda de 87 % da atividade da enzima.

Andrews & Asenjo (1987a) relataram que para a medida da atividade lítica de levedura as diferentes enzimas que atuavam na lise da levedura não podiam ser separadas, pois atuavam sinergicamente. Estes autores isolaram e purificaram todas as glucanases e proteases presentes no sobrenadante da fermentação e, então, testaram-nas combinadas. As enzimas  $\beta$ -1,3-glucanase e protease do sistema lítico da bactéria *Oerskovia xanthineolytica* foram capazes de lisar e romper totalmente as células de leveduras. Esta bactéria apresentou uma taxa de glucanase- protease maior que a de outras cepas. Quando cultivada em sistema contínuo a bactéria *O. xanthineolytica* apresentou produtividade e concentração de enzimas maiores do que quando cultivadas em batelada. O sistema de enzimas líticas estava sujeito a repressão catabólica pela glicose e mostrou-se induzido pela glucana da levedura. Em cultura contínua de *Oerskovia* sp a glicose pode ser utilizada como meio de crescimento com concentração relativamente baixa do indutor. Nos estudos de produção de enzimas por fermentação contínua os autores usaram glicose (2 ou 8 g / L) e glucana de levedura (2 ou 0,5 g / L) para a indução de enzimas líticas de *O. xanthineolytica*. Neste caso as culturas com altas concentrações de indutor e baixas concentrações de glicose apresentaram altas taxas de glucanase e protease, concluindo-se que o sistema de enzimas líticas, está sujeito a repressão catabólica pela glicose. Os autores relataram que a glucana de levedura foi um potente indutor, sendo que a glucanase foi produzida com apenas 5 horas de incubação e a atividade lítica foi 10 vezes maior do que no meio com parede de leveduras.

Os altos custos para a purificação da enzima não permitiram o uso destas enzimas líticas purificadas em reatores líticos de grande escala. Entretanto, para recuperar eficientemente e economicamente as proteínas intracelulares ou para

extrair a proteína de célula única ("single-cell protein") para o uso em alimentos, seria necessário determinar as estratégias ótimas do processo quando forem usadas enzimas líticas brutas, ou seja, sem que se faça a separação das proteases e glucanases (Liu et al., 1988).

Saito et al. (1988) verificaram que a *Rarobacter faecitabidus* YLM-1 aderiu a células viáveis de *Hansenula anomala* J45-1 lisando-as. A suspensão de células de YLM-1 e de leveduras foram misturadas e incubadas. Os autores verificaram que ocorreu lise das células de levedura pela YLM-1, após a incubação da mistura de reação por 2 horas a 30°C e que as mesmas desapareceram microscopicamente após 20 horas a 7°C.

Bielecki et al. (1989) purificaram a  $\beta$ -1,3-glucanase de *Streptomyces* sp e verificaram que o pH ótimo de atividade foi em torno de 5,5 a 6,0 e a temperatura ótima em torno de 50 a 55°C. A atividade enzimática foi medida através da liberação de açúcares reduzidos a partir da laminarina. Esta enzima não requeria íons metálicos para sua atividade. Os autores caracterizaram diversas  $\beta$ -1,3-glucanases de *Streptomyces* sp 1228, usando a laminarina como substrato e estimaram os valores de  $K_M$  em  $6,65 \times 10^{-5}$  mol / L para GI;  $2,35 \times 10^{-4}$  mol / L para GII;  $8,1 \times 10^{-5}$  mol / L para GIV e  $8,1 \times 10^{-4}$  mol / L para GVIII. Os autores verificaram que 1 mM / L de  $HgCl_2$  inibiu completamente as  $\beta$ -1,3-glucanases II e IV (GII e GIV) e também inibiu as  $\beta$ -1,3-glucanases I e VIII (GI e GVIII) em aproximadamente 50 %. Foi observado que 1 mM / L de EDTA, de 2-mercaptoetanol ou D-glucono- $\delta$ -lactone ativaram a ação das GI, GII e GIV.

Tangarone et al. (1989) verificaram que a endo- $\beta$ -1,3-D-glucanase de *Trichoderma longibrachiatum* mostrou pH e temperatura ótima de 4,8 e 55°C, respectivamente. A estabilidade da enzima na ausência de um substrato foi observada a temperaturas menores que 50°C e na faixa de pH de 4,9 a 9,3. O peso molecular foi de 70 kDa por SDS-PAGE 12,5 %, e o pI foi 7,2. A enzima ativa foi fortemente inibida por  $HgCl_2$ ,  $MnCl_2$ ,  $KMnO_4$  e N-bromosuccinimida. O valor de

$K_M$  da enzima sobre a laminarina foi 0,0016 % e  $V_{max}$  foi 3170  $\mu\text{mol}$  de glicose equivalente / mg da enzima pura / min.

A clonagem do gene da  $\beta$ -1,3-glucanase (1,3 : 1,4- $\beta$ -D-glucana 4-glucano-hidrolase) de uma nova cepa de *Bacillus subtilis* (Y-25) e a construção de uma cepa de *B. subtilis* (HL-25) superprodutora de  $\beta$ -1,3-glucanase, resultou na produção de 2 g de  $\beta$ -1,3-glucanase por litro de sobrenadante do meio de cultura (Yuuki et al., 1989).

Bagga et al. (1990) purificaram e caracterizaram três exo-glucanases, duas endo-glucanases e duas  $\beta$ -glicosidases produzidas por *Aspergillus nidulans*. As condições ótimas para todas as formas de celulasas foram pH 5,0 a 6,0 e para as exo e endo-glucanases foram 50 e 65°C, mas para as  $\beta$ -glicosidases foram 35°C e 65°C e, todas foram estáveis por 10 minutos a 40 a 50°C. Os valores de  $K_M$  das Exo-I, Exo-II e Exo-III foram 38,46; 37,71 e 50 mg / mL, respectivamente, para as Endo-I e II foram 5 e 4 mg / mL de substrato, enquanto as glicosidases exibiram  $K_M$  de 0,24 e 0,12 nmol. O peso molecular da Endo-I foi 25 kDa, enquanto a Endo-II foi 32,5 kDa e requerem íons metálicos como cofator para a sua atividade catalítica, mas foram inibidas na presença de  $\text{Hg}^{2+}$ .

Ventom & Asenjo (1990a e b) purificaram uma glucanase e duas proteases da cultura de *Oerskovia xanthineolytica* LL-G109, que agiam sinergicamente com a glucanase na lise de leveduras. A glucanase mostrou ser uma proteína simples de peso molecular estimado em 31 kDa por gel de eletroforese. Enquanto que as duas outras proteases, mostraram peso molecular de 19,3 e 12,7 kDa, em gel de eletroforese.

Kéry et al. (1991) notaram que a maioria das glucanases de bactérias, que causavam a degradação da parede celular da levedura, citadas anteriormente, mostraram-se, relativamente, instáveis a altas temperaturas. Os autores em seus experimentos, utilizaram as glucanases termoestáveis obtidas da preparação enzimática de *Aspergillus niger*. As proteínas foram separadas por cromatografia,

utilizando-se uma coluna de Sephadex G-50. A  $\beta$ -1,3-glucanase ativa foi distribuída em dois picos sendo que a maior parte (95 %) da  $\beta$ -1,3-glucanase encontrou-se nas frações que compuseram o primeiro pico.

Shimoi et al. (1991) purificaram duas proteases e uma glucanase ativas produzidas pela bactéria *Rarobacter faecitabidus*, que lisam células de leveduras. As duas proteases foram capazes de diminuir a turbidez da suspensão. Embora elas não alterassem o número total de células, causaram a morte das leveduras. Isto mostrou que a protease alterou a integridade da célula de levedura pela destruição da camada de proteína da parede celular. As proteases foram inibidas por diisopropil fluorofosfato ou fenilmetilsulfonil fluoreto que são dois inibidores de serina protease. A  $\beta$ -1,3-glucanase sozinha teve baixa atividade lítica e não afetou o número de células viáveis, mas quando combinada com uma das proteases foi capaz de lisar as células de leveduras completamente. Portanto esta cooperação demonstrou que elas agiram sinergicamente. Os autores obtiveram 8,5 U de protease / mg de proteína no sobrenadante da fermentação pela linhagem *R. faecitabidus* em meio de cultura TYMC, após 30 horas de incubação a 30°C. O caldo de enzima lítica foi aplicado em uma coluna de filtração em gel de troca catiônica TSKgel SP-5PW e recromatografado em uma coluna de troca aniônica TSKgel G3000SW pré-equilibrada com tampão 0,1 M fosfato de sódio pH 7,0, contendo 10 % de glicerol. A protease I mostrou um pH ótimo ao redor de 9,0, enquanto para hidrolisar laminarina a glucanase apresentou atividade máxima no pH ao redor de 5,0. A estabilidade térmica foi semelhante para as três enzimas- a glucanase e as duas proteases. Todas foram sensíveis a altas temperaturas, pois as proteases perderam completamente a atividade quando incubadas por 15 minutos a 70°C, e a glucanase foi inativada pelo tratamento a 60°C por 15 minutos. A  $\beta$ -1,3-glucanase de *R. faecitabidus* foi purificada 75 vezes através de cromatografia em coluna aniônica sendo obtido 10 % de recuperação da enzima. O peso molecular da  $\beta$ -1,3-glucanase de *R. faecitabidus* foi estimado em 82 kDa por eletroforese em gel SDS-poliacrilamida.

Shimoi & Tadenuma (1991) verificaram que a protease purificada de *Rarobacter faecitabidus* aderiu-se a porção de manana da camada de manana-

proteína da parede celular de levedura e hidrolisou a proteína. Essa enzima era uma serina protease e apresentava afinidade para manose, características essenciais que permitiram a lise da célula de levedura pela bactéria. A enzima foi inibida por metil-fenilsulfonilfluoreto, um inibidor exclusivo de proteases.

A bactéria *Oerskovia xanthineolytica* LL-G109 foi utilizada para produzir altos níveis de enzimas líticas como a  $\beta$ -1,3-glucanase extracelular, protease e também atividade lítica sobre células viáveis de leveduras (YLA). Os autores obtiveram 40 U de protease / mL em meio de fermentação contínua contendo 2 g L<sup>-1</sup> de glicose, pela linhagem de *O. xanthineolytica*. A  $\beta$ -1,3-glucanase purificada de *O. xanthineolytica*, apresentou atividade específica de 11,1 U de enzima mg<sup>-1</sup>. A glucanase quando foi ensaiada com laminarina, mostrou uma atividade ótima em pH 6,0, enquanto foi mais ativa em pH 8,0 com glucana de levedura como substrato. A enzima apresentou peso molecular de 12.000 Da, através de filtração em gel, o valor de K<sub>M</sub> da  $\beta$ -1,3-glucanase para o substrato laminarina e glucana de levedura, foram respectivamente, 0,95 mg / mL e 2,5 mg / mL. As proteases IIb e III (ou IIa) mostraram atividade máxima em pH 9,5 ~ 10 para a azocaseína como substrato. Estas proteases (IIb e III), exibiram comportamentos significativamente diferentes para a termoestabilidade. A protease III perdeu metade da atividade quando foi incubada a 60°C por 15 min, enquanto a protease IIb foi completamente estável nestas condições, sendo totalmente destruída a 70°C por 15 minutos (Ventom & Asenjo, 1991).

Werner et al. (1993) obtiveram algumas enzimas líticas de leveduras, por ultrafiltração do sobrenadante do meio de cultura de *Arthrobacter*, contendo diferentes fontes de carbono, e para a preservação da enzima, usou-se técnicas de imobilização pelo método de "spraydrying", testando vários suportes. A enzima imobilizada foi estável por um ano, enquanto a solução original mostrou que a atividade diminuiu (reteve menos que 75 % da atividade) após 8 semanas de estocagem a 4°C, por causa da natureza higroscópica da enzima, que poderia causar problemas na sua atividade enzimática.

SAEKI et al. (1994) produziram enzimas líticas de *Oerskovia xanthineolytica* TK-1. A solução da enzima lítica  $\beta$ -1,3-glucanase foi aplicada em coluna de cromatografia de troca iônica DEAE-Sephacel. As frações adsorvidas nesta coluna, que continham a enzima ativa, foram reunidas e recromatografadas em coluna DEAE-Toyopearl 650 M. As frações contendo glucanase foram novamente coletadas, liofilizadas e utilizadas como enzima purificada. Esta enzima apresentou atividade ótima à 60°C e perdeu 95% da atividade quando incubada a 60°C na ausência de substrato. O pH ótimo para a atividade enzimática foi dependente do substrato. A atividade máxima da enzima, sobre a glucana de levedura, a curdlana e a laminarina foi obtida ao redor do pH 5,5, pH 5,0 ~ 6,5, e pH 7,5, respectivamente. A enzima mostrou-se estável na faixa de pH 5,0 a 8,0, quando ensaiada com laminarina ou glucana de levedura. As  $\beta$ -1,3-glucanases de várias linhagens de *Oerskovia* sp apresentaram massas moleculares numa faixa entre 12 e 58 kDa. Na presença de manana de levedura no meio de cultura a *O. xanthineolytica* produziu uma protease alcalina que foi classificada como uma serina protease. No entanto, verificou-se que a glucanase sozinha exibiu uma significativa atividade lítica sobre as células de leveduras viáveis sem a necessidade da ação sinérgica da serina-protease.

Pitson et al. (1995) purificaram e caracterizaram três  $\beta$ -D-1,3-glucano-hidrolases extracelulares do fungo filamentoso *Acremonium persicinum*, designadas como, GN-I, GN-II e GN-III, que apresentaram peso molecular estimado por SDS-PAGE, em 81, 85 e 89 kDa, respectivamente. Essas três enzimas hidrolisam a laminarina de *Eisenia* sp com uma ação endo-hidrolítica. As três GN mostraram-se completamente estáveis (mais de 90 %) na faixa de pH entre 4,5 e 10,5 após 24 horas a 4°C, sendo que a enzima GN-I mostrou mais de 80 % da atividade máxima em pH 5,0 a 7,5, e as GN-II e GN-III, estáveis entre 4,5 a 7,0. Após a incubação por 15 minutos, as três enzimas GN-I, GN-II e GN-III, mostraram atividade ótima nas temperaturas de 65, 55 e 60°C, respectivamente. Os valores de  $K_M$ , para as três  $\beta$ -1,3-D-glucohidrolases (GN-I, GN-II e GN-III), quando ensaiadas com laminarina de *Laminarina digitata*, foram estimados em 0,1; 0,23 e 0,22 mg / mL, respectivamente. Os autores verificaram que as  $\beta$ -1,3-glucanases GN-I, GN-II e GN-III de *A. persicinum* foram fortemente inibidas na

presença de 1 mM de  $\text{MnCl}_2$  e na presença de 1 mM de  $\text{KMnO}_4$  e de N-Bromosuccinimida.

Uma glucanase purificada de grãos de arroz (*Oryza sativa* L) da variedade cv. Kibara 397 mostrou ser um monômero de 33 kDa com um ponto isoelétrico de 10,4. Esta enzima atuou como uma endo- $\beta$ -1,3 pela análise dos produtos finais quando foi usado laminarina de *Laminaria digitata* como substrato (Akiyama et al., 1996).

Ferrer et al. (1996) clonaram o gene da  $\beta$ -1,3-glucanase ( $\beta\text{gIII}_A$ ), inicialmente isolado de *O. xanthineolytica* LL G109, em *E. coli* e então expressado em *Bacillus subtilis*. Foi verificado em transformantes contendo o plasmídeo pPFF1 um aumento na produção de  $\beta\text{gIII}_A$  em *B. subtilis* DN1885, que foi detectado em placas de LB-agar contendo 0,04 % (p / v) de laminarina após 24 h de incubação a 37°C e subseqüentemente, a atividade foi observada pela coloração de vermelho-congo. A atividade da  $\beta\text{gIII}_A$  foi testada no sobrenadante da cultura de *B. subtilis* DN1885 (pPFF1), usando-se AZCL-curdiana em diferentes valores de pH. A atividade relativa da  $\beta\text{gIII}_A$  sobre curdlana em pH 4,0 foi, aproximadamente, 22 vezes maior do que os experimentos com *B. subtilis*. Os testes com valores de pH mais elevados mostraram menor atividade, demonstrando que a enzima é mais ativa em pH ácido.

A endo  $\beta$ -1,3-glucanase de *Trichoderma harzianum* foi purificada 134 vezes e somente 3,6 % da atividade enzimática foi recuperada pelo processo de purificação. O valor de  $K_M$  e  $V_{\text{max}}$  para a endo- $\beta$ -1,3-glucanase, usando laminarina como substrato, foi 1,18 mg / mL e 1,26 U / mL, respectivamente. O pH ótimo foi 4,4 e a atividade máxima foi obtida a 45 a 50°C. A enzima foi fortemente inibida na presença de  $\text{HgCl}_2$  e estimulada pelos cátions  $\text{Zn}^{2+}$  e  $\text{Ca}^{2+}$ . A endo- $\beta$ -1,3-glucanase mostrou um peso molecular estimado em 29 kDa. A enzima foi ativa sobre glucanas contendo ligações  $\beta$ -1,3 e a laminarina foi hidrolisada a oligossacarídeos (Noronha & Ulhoa, 1996 e 2000).

PARRADO et al. (1996) relataram que a  $\beta$ -1,3-glucanase de *Oerskovia xanthineolytica* LL-G109 apresentava peso molecular de  $27195,6 \pm 1,3$  Da através de eletroforese em gel SDS-poliacrilamida, e atividade ótima a  $65^{\circ}\text{C}$ . Os autores verificaram que esta enzima mostrava-se estável até, aproximadamente,  $55^{\circ}\text{C}$  por 30 minutos, enquanto que a atividade da enzima diminuiu rapidamente nas temperaturas superiores a  $75^{\circ}\text{C}$ .

Kotake et al. (1997) purificaram e caracterizaram uma *exo*- $\beta$ -1,3-glucanase ligada a parede de grãos de cevada. O peso molecular da enzima purificada foi 66 kDa, determinado por SDS-PAGE. Esta enzima hidrolisava oligossacarídeos contendo ligações  $\beta$ -D-1,3- ou  $\beta$ -D-1,4, como liquemana,  $\beta$ -D-glucana de cevada, laminarina e pustulana, mas não hidrolisava carboximetil-curdiana, carboximetil-celulose, xiloglucana e maltose, e exibia características de uma *exo*- $\beta$ -1,3-glucanase. Esta enzima mostrou pH ótimo de 5,0 e atividade hidrolítica máxima em laminaritetraose, fatos que sugeriram se tratar de uma *exo*- $\beta$ -1,3-D- glucanase.

Mc Collum et al. (1997) caracterizaram quitinases e  $\beta$ -1,3-glucanases envolvidas no 'flavour' de grapefruit durante o seu desenvolvimento. Um pico simples de  $\beta$ -1,3-glucanase foi eluído em coluna Q-Sepharose. Porém, três bandas de proteínas foram determinadas em gel de eletroforese SDS-PAGE, e mostraram 32, 32,5 e 34 kDa, respectivamente. As formas ácidas e básicas de  $\beta$ -1,3-glucanases foram encontradas, porém predominante foi a forma básica da enzima. A atividade da  $\beta$ -1,3-glucanase foi baixa em frutos jovens e aumentou durante o desenvolvimento do fruto. Existem relatos de que a combinação entre quitinases e  $\beta$ -1,3-glucanases é necessária para a inibição do crescimento de fungos em plantas e frutos.

Pitson et al. (1997a e b) estudaram a produção das enzimas capazes de degradar  $\beta$ -1,3-glucana, produzidas por 31 isolados dos gêneros de *Acremonium* e *Cephalosporium*. Quando foi utilizada a glicose como fonte de carbono foram obtidas, geralmente, baixas concentrações de  $\beta$ -1,3-glucanase. Porém, quando os isolados cresceram sobre laminarina ou pustulana, foram encontradas maiores

concentrações desta enzima, sugerindo regulação da síntese enzimática por indução e / ou por repressão catabólica.

Thrane et al. (1997) estudaram a indução e a atividade lítica da endo- $\beta$ -1,3-glucanase e da celulase de *Trichoderma harzianum* sobre o fitopatógeno *Pythium* spp. Estas enzimas líticas foram purificadas em coluna de Sephacryl S-300 HR (Pharmacia LKB Biotechnology, Uppsala, Sweden) e parcialmente caracterizadas. A endo- $\beta$ -1,3-glucanase purificada mostrou-se mais ativa em pH 5,0 – 5,5 e a 40°C, enquanto sua estabilidade diminuiu drasticamente quando incubada a temperatura superiores a 35°C. A atividade desta enzima foi totalmente inibida na presença de íons mercúrio e anulada pelo SDS, enquanto reduziu em 25 % a ação da mesma pelo  $\beta$ -mercaptoetanol. A fração pura da endo- $\beta$ -1,3-glucanase mostrou ser uma proteína de baixo peso molecular com 17 kDa, estimado em gel poliacrilamida de eletroforese.

Galan et al. (1999) purificaram uma endo- $\beta$ -1,3-glucanase de *Agaricus bisporus* H 25. A enzima foi mais ativa contra ligações  $\beta$ -1,3 e bem menos contra ligações  $\beta$ -1,6. Esta enzima mostrou um pH ótimo de 4,5 e uma temperatura ótima de 45°C para a laminarina como substrato e o seu peso molecular foi estimado em 32 kDa (SDS-PAGE).

Burtseva et al. (2000) estudaram a produção de enzimas extracelulares por 17 espécies de fungos de desenvolvimento marinho e verificaram que o fungo *Chaetomium indicum* produziu uma  $\beta$ -1,3-glucanase. A biossíntese desta enzima foi estudada em condições ótimas para o fungo. A enzima foi purificada por cromatografia de troca iônica, ultrafiltração e cromatografia em gel. O peso molecular desta enzima foi estimado em 54 kDa por filtração em gel. A enzima apresentou temperatura ótima de atividade a 60°C, mostrou-se estável em temperaturas inferiores a 50°C e na faixa de pH 4,5 a 7,5. A  $\beta$ -1,3-glucanase mostrou dois picos de atividade máxima a 4,4 e 5,6; isto sugeriu a existência de duas formas da enzima. Os produtos da hidrólise enzimática da laminarina e da habilidade de transglicosilação indicaram que ambas as formas são exo- $\beta$ -glucanases.

Noronha et al. (2000) investigaram o efeito de diferentes fontes de carbonos sobre os níveis de  $\beta$ -1,3-glucanase nos sobrenadantes da cultura de *Trichoderma harzianum*. A atividade enzimática foi encontrada para todas as fontes de carbonos, porém altos níveis foram verificados quando foi utilizado laminarina e parede celular purificada. Durante o crescimento do fungos sobre parede celular purificada, foram detectadas três isoformas da  $\beta$ -1,3-glucanase. Duas isoformas foram produzidas quando o fungo cresceu sobre quitina, quitosana, N-acetilglucosamina, e laminarina, enquanto somente uma foi detectada quando o fungo cresceu sobre celulose e glicose. Através da análise por "Western Blot" verificou-se que apenas uma  $\beta$ -1,3-glucanase (GLU36) de 36 kDa foi secretada pelo crescimento de *T. harzianum* (Tc) em todas as fontes de carbono testadas. Estes autores verificaram ainda, que houve um aumento significativo nos níveis de GLU36 nos sobrenadantes dos meios após exaustão da glicose, sugerindo que está enzima é controlada pela repressão catabólica do carbono.

Salazar et al. (2001) clonaram em *Escherichia coli* o gene da  $\beta$ -1,3-glucanase do tipo BgIII de *Oerskovia xanthineolytica* que lisa células de leveduras. A proteína recombinante purificada apresentou 43 kDa por IMAC e suas características bioquímicas mostraram que não houve nenhuma diferença funcional daquelas descritas para a BgIII purificada de *O. xanthineolytica*.

El-Katatny et al. (2001) estudaram uma quitinase e uma endo- $\beta$ -1,3-glucanase de *Trichoderma harzianum* Rifai T24 envolvida no controle do *Sclerotium rolfsii*, um fitopatógeno. A endo- $\beta$ -1,3-glucanase de 74 kDa mostrou um Km de 1,1 g / L e foi estável a 30°C, porém, foi rapidamente inativada a 60°C.

## 2.5- Modo de ação das enzimas líticas

Em 1970, Bacon et al. verificaram que a ação enzimática da  $\beta$ -1,3-glucanase de *Cytophaga johnsonii* sobre a glucana solúvel da parede celular de levedura resultava na produção de oligossacarídeos de maior peso molecular e posteriormente de pequena quantidade de oligossacarídeos de menor peso molecular e glicose. A ação da  $\beta$ -1,3-glucanase não lítica, sobre a parede celular de leveduras produzia laminaribiose e glicose com pouca quantidade de oligossacarídeos de maior peso molecular. A enzima não lítica atuou sobre a laminarina produzindo glicose e uma série de oligossacarídeos dos quais a laminaritriose foi predominante. Incubações prolongadas resultaram principalmente em mono-, di- e trissacarídeos.

Mada et al. (1970) citado por Nagasaki et al. (1976), relataram que as enzimas produzidas por microrganismos clivavam endoliticamente a parede celular de leveduras e liberavam uma variedade de oligômeros; estas enzimas foram geralmente reconhecidas, por serem inativas ou muito fracamente ativas sobre células vivas de leveduras, exceto a  $\beta$ -1,3-glucanase de *Basidiomycetes*.

MacWilliam (1970) em sua revisão descreveu que a capacidade das glucanases de atacar parede celular de leveduras ou células inteiras podia variar completamente com o crescimento celular ou entre diferentes gêneros. O ataque enzimático, por exemplo era rápido em células jovens em uma cepa de *Saccharomyces carlsbergensis*, mas não ocorria em células velhas sem um tratamento prévio com mercaptoetanol. A levedura de cervejaria, *Saccharomyces*, podia ser hidrolisada completamente por  $\beta$ -1,3-glucanases, mas apenas fracamente ou incompletamente por  $\beta$ -1,6-glucanases. As linhagens de *Hansenula* e *Nadsonia* eram completamente lisadas por ambos os tipos de glucanases, enquanto as de *Schizosaccharomyces* eram incompletamente hidrolisadas por uma ou outra, e as leveduras como *Rhodotorula* sp não eram atacadas por estas enzimas.

ela. Mas a endo- $\beta$ -glucanase do tipo produtora de pequenos oligossacarídeos foi inativa ou teve atividade restrita em células viáveis de leveduras.

A bactéria *Arthrobacter* sp produz um complexo enzimático conhecido comercialmente como zymolyase, que lisa célula de levedura. Este complexo possui duas frações: a zymolyase A, que foi caracterizada como uma  $\beta$ -1,3-glucanase, e a zymolyase B, que foi identificada como uma protease alcalina e provavelmente, uma serina protease. A  $\beta$ -1,3-glucanase (zymolyase A) não diminuiu a turbidez nem o número de células de leveduras de uma suspensão. A protease (zymolyase B) diminuiu a turbidez, mas não alterou o número de células da suspensão. No entanto a ação cooperada de zymolyase A e B teve como efeito alta atividade lítica, lisando completamente as células de leveduras. Mas isso só ocorreu quando primeiro agiu zymolyase B e depois zymolyase A. A zymolyase A foi capaz de lisar as células, mas somente quando foram pré-tratadas com 2-mercaptoetanol, isto porque tanto zymolyase B quanto 2-mercaptoetanol tiveram a função de destruir a barreira superficial que impediu a atuação da  $\beta$ -1,3-glucanase, impossibilitando sua penetração até a estrutura da  $\beta$ -glucana da parede. O 2-mercaptoetanol destruiu esta barreira rompendo as pontes dissulfeto das proteínas da parede. A zymolyase B tem ação específica na parede celular devido a sua afinidade com a manana da levedura. Esta enzima pode assumir duas formas, livre ou ligada a manana, mas só ocorreu atividade proteolítica sobre a proteína e liberação de peptídeo-manana após a união da enzima a manana da levedura (Kitamura, 1982b).

Kitamura (1982d) verificou que na preparação enzimática a zymolyase B agia, em cooperação, na lise das células de leveduras pois ela facilitava a penetração da zymolyase A pela remoção de materiais da superfície celular; os quais podiam ser altamente dispersantes e estar impedindo a atuação da enzima. Porém os resultados sugeriram que a enzima chave na lise da célula de levedura era a zymolyase A, pois a lise não ocorria até que a mesma penetrasse na parede celular para agir sobre a estrutura da  $\beta$ -1,3-glucana.

Zlotnik et al. (1984) também observaram o efeito sinérgico entre uma glucanase e uma protease na lise da parede celular de *S. cerevisiae* pois, somente após uma incubação prévia das células de leveduras com a Z-protease ocorria a ação da enzima Z-glucanase, que promovia a lise celular.

A bactéria *Rhizoctonia solani* produziu 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 destas frações foram consideradas  $\beta$ -1,3-glucanases líticas. A fração L-3 mostrou alta atividade de protease. A protease e a  $\beta$ -1,3-glucanase líticas sozinhas foram capazes de lisar células de leveduras intactas e parede celular isolada de *Saccharomyces cerevisiae*, mas não foram capazes de lisá-las completamente (Usui & Oguchi, 1986).

Hunter & Asenjo (1987 e 1988), apresentaram um modelo para a cinética da lise da célula de levedura dos sistemas líticos de *Oerskovia* sp e *Cytophaga* sp mostrando o mecanismo da reação. O modelo considerava a lise da levedura como passos progressivos de ruptura de estruturas celulares, começando pela superfície externa e prosseguindo pelas estruturas celulares dentro do protoplasma. Cada um dos passos da reação era consequência direta da estrutura da parede da levedura.

Molina et al. (1989) relataram que o sistema lítico de diferentes microrganismos pode ser constituído por um grande número de enzimas com modos de ação e propriedades distintas, o que torna difícil a apresentação de um único sistema enzimático envolvido na lise celular. Por esta razão, para o reconhecimento do papel biológico das glucanases, como as autolisinas, em cada organismo em particular, é necessário se fazer uma caracterização detalhada das enzimas mais importantes.

Tangarone et al. (1989) verificaram que a endo- $\beta$ -1,3-D-glucanase de *Trichoderma longibrachiatum* hidrolisava laminarina a oligossacarídeos variando em tamanho, de glicose a pentaose e, de pequenas a grandes quantidades. A enzima clivava laminaripentaose em laminaritetraose, laminaribiose e glicose, mas

não clivava laminaribiose a glicose e era capaz de hidrolisar somente glucanas contendo ligações  $\beta$ -1,3.

As enzimas líticas de vegetais, também conhecidas como hidrolases antifúngicas ou laminarinases, que degradam manana bem como glucana, eram essenciais para a degradação do micélio de alguns fungos filamentosos fitopatogênicos importantes na agricultura (Watanabe & Ogasawara, 1990; Vogelsang & Wolfgang, 1993; Cruz et al., 1995).

Kéry et al. (1991) estudaram os produtos da hidrólise da glucana da parede celular de leveduras pela ação das enzimas extracelulares  $\beta$ -1,3-glucanases de *Aspergillus niger*. Os autores demonstraram a produção de fragmentos de glucana solúveis em água durante a hidrólise e verificaram que um tempo curto de reação estimulava a formação de fragmentos de glucana de alto peso molecular. Após longos períodos de hidrólise (mais que 7 horas), quase toda a glucana hidrolisada era convertida em fragmentos pequenos de glucana com peso molecular menor que 25 kDa. Após 2 horas de hidrólise, aparecia na reação um fragmento de alto peso molecular (quase 80 kDa). Isto sugeria que provavelmente reações de transglicosilação teriam acontecido simultaneamente com a hidrólise.

Yamamura et al. (1991) observaram em microscópio eletrônico, que leveduras cultivadas em temperaturas elevadas não mostraram alterações estruturais na membrana ou na parede celular, mas era possível detectar alterações significativas nas análises bioquímicas, como a baixa susceptibilidade a zymolyase na presença de 2-mercaptoetanol. Essa resistência à ação lítica da enzima, devido a alta temperatura de cultivo, era um indicativo do estresse externo a elevadas temperaturas, bem como a mudança na composição de lipídios.

As enzimas líticas são produzidas somente na presença de um indutor por estarem envolvidas com o sistema de defesa do organismo. As plantas utilizam esse sistema de defesa para se defenderem do ataque de fungos parasitas. Com isso, desde a década de 80, muito esforço tem sido aplicado na tentativa de se estudar a estrutura química destas enzimas e, principalmente, a construção de microrganismos transformados para a superprodução dessas enzimas e que

apresentem ótimas condições de fermentação em larga escala. Muitas leveduras e fungos secretam endo- e exo- $\beta$ -D-glucanas hidrolases ( $\beta$ -glucanases) na superfície da célula. Na maioria das vezes, o papel exato destas enzimas é desconhecido, mas elas, indubitavelmente, participam no metabolismo da  $\beta$ -D-glucanas, o componente estrutural mais importante da parede celular (Chambers et al., 1993).

Keitel et al. (1993) analisaram a estrutura cristalina da  $\beta$ -1,3-glucanase de linhagem híbrida de *Bacillus* H (A16-M) através da técnica de cristalografia com raio X. A molécula da proteína consistia principalmente de dois cordões antiparalelos que formam uma superfície larga e plana pregueadas por ligações do tipo  $\beta$ , arranjada uma sobre a outra para formar um contato do tipo "sandwich". Os autores sugeriram que a hidrólise da  $\beta$ -glucana acontece num canal profundo em parafuso numa face da superfície molecular e que os resíduos de Glu<sup>105</sup>, Asp<sup>107</sup> e Glu<sup>109</sup> estão orientados em direção a fenda do sítio ativo.

Klis (1994) relatou que métodos enzimáticos têm surgido recentemente como complemento para a hidrólise dos polissacarídeos e proteínas da parede celular e podem substituir parcialmente os métodos químicos. Eles verificaram que é possível remover completamente a fração de manana-proteína da parede celular, pela digestão com pronase, uma preparação enzimática, que deixa a fração de glucana intacta.

A enzima exo-glucanase do tipo  $\beta$ -1,3-D-glucana glucohidrolase, isolada de *Bacillus circulans*, hidrolisa  $\beta$ -1,3-D-glucanas por sucessivas remoções de unidades de laminaribiose de seus terminais não redutores (Kanzawa et al., 1994).

Pitson et al. (1995) relataram que as três enzimas líticas (GN I, GN II, GN III) de *Acremonium persicinum*, agem de maneira exo-hidrolítica, removendo resíduos simples de glicose pelos terminais não redutores das  $\beta$ -1,3-D-glucanas lineares e hidrolisam a laminarina de *Eisenia* com uma ação aparentemente endo-hidrolítica. Estas glucanases podem ser produzidas extracelularmente, mas, uma

ou mais delas, podem ocorrer como enzimas intracelulares ou ligadas a parede e estar sendo liberadas no meio de cultura somente durante a autólise celular.

## 2.6- Aplicação das enzimas líticas

Ducroo & Delecourt (1972) relataram que a  $\beta$ -1,3-glucana de cevada pode aumentar a viscosidade da cerveja. Eles verificaram que o uso de enzimas hidrolíticas, como  $\beta$ -glucanases de *Bacillus subtilis* e *Aspergillus niger*, podem ajudar a superar as dificuldades associadas a alta viscosidade da cerveja. Durante a fase não germinativa da cevada foi observada a existência de várias enzimas hidrolíticas como: endo- $\beta$ -1,3-glucanases, endo- $\beta$ -1,4-glucanases, exo- $\beta$ -1,3-glucanases, exo- $\beta$ -1,4-glucanases, celobiasas, laminaribiasas, transglucosidases e durante a fase de germinação da cevada foram encontradas somente endo- $\beta$ -1,3-glucanases, as quais mostraram um aumento significativo (aproximadamente 100 vezes) na sua atividade.

Em 1974, Fujino et al., descreveram a utilização de enzimas líticas de *Arthrobacter luteus* para a obtenção de extratos de leveduras. O extrato foi obtido pelo tratamento de leveduras de pão e saquê, com solução de enzimas líticas a 45°C por 11,5 horas.

Culturas em meio líquido de *Streptomyces globisporus* 1829, produziram a mutanolisina, uma enzima que revelou uma poderosa atividade lítica contra células vivas de bactérias cariogênicas como as *Streptococcus mutans*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus sanguis*, *Lactobacillus acidophilus* e *Actinomyces viscosus* e expectativas têm sido discutidas para o uso da mutanolisina como um agente potencial no controle da cárie dentária (Yokogawa et al., 1975).

A produção de enzimas líticas nos vegetais tem sido relacionadas a defesa contra o ataque por microrganismos fitopatogênicos. Entre os vegetais a  $\beta$ -1,3-glucanase ativa foi detectada em maçãs, aspargos, beterrabas, cenouras, cerejas, pepinos, pêsegos, abóboras e tomates (Hinton & Pressey, 1980).

Okagbue & Lewis (1983) relataram o uso de microrganismos líticos para a extração de pigmentos microbianos, aplicados à indústria de alimentos. Estes autores utilizaram uma cultura mista contendo *Bacillus circulans* como forte produtor de enzimas líticas e *Phaffia rhodozyma* para a produção de astaxantina.

A aplicação das enzimas que lisam a parede celular de leveduras é muito promissora, como por exemplo, na preservação de alimentos. Tem sido sugerido a avaliação da ação destas enzimas líticas sobre leveduras e bactérias para controle de microrganismos patogênicos e prevenção da deterioração dos alimentos (Andrews & Asenjo, 1987b).

Gomi et al. (1987) usaram o preparado enzimático contendo quitinase produzido pela *Oerskovia* spp para lisar o micélio de *Aspergillus oryzae* do arroz Koji e liberar N-acetilglucosamina (NAG).

Hunter & Asenjo (1987) descreveram que devido à rigidez e a espessura da parede celular, as leveduras são dificilmente rompidas mecanicamente, sendo mais eficaz a lise celular por meios enzimáticos nos estágios iniciais do tratamento.

Mauch et al. (1988) encontraram em plantas de ervilhas (leguminosas) algumas enzimas  $\beta$ -1,3-glucanases líticas, que foram relacionadas com o mecanismo de defesa contra o ataque microbiano. Estas enzimas líticas, também foram encontradas em gramíneas, como o arroz (Akiyama et al., 1996) e a cevada (Kotake et al., 1997).

Estudos do efeito da adição de misturas enzimáticas na ração, tem sugerido um aumento na digestibilidade em animais. Algumas misturas enzimáticas

contendo glucanases, celulasas, xilanases, pectinases, glucoamilases e amilases foram incluídas na dieta de porcos, frangos e pintinhos (Taverner et al., 1988; Bohme et al., 1990; Wenk et al., 1990a / b; e Jeroch, 1991). Aplicações destas enzimas líticas na área nutricional e de alimentos estão sendo revistas (Ruttloff et al., 1989).

Liu et al. (1988) relataram que o uso de sistemas líticos aumentaria a eficiência dos métodos de rompimento da parede celular de levedura para a recuperação de componentes intracelulares, de interesse econômico. Contudo, dependendo em particular do sistema lítico empregado e da sua pureza, as enzimas poderiam ser modificadas geneticamente para atacar somente os componentes da parede celular sem danificar os demais produtos.

Nakajima et al. (1988) verificaram que as leveduras podem ser aproveitadas como fonte de proteínas de célula única ("single-cells proteins"), mas a indigestibilidade da sua parede celular é uma importante limitação para o uso destes microrganismos como suplemento alimentar para animais e seres humanos. Por isso, construíram e isolaram mutantes de *Saccharomyces cerevisiae* com a parede celular alterada, que apresentaram maior susceptibilidade às enzimas líticas da preparação comercial de zymolyase.

Sandhu et al. (1989) verificaram que o uso das enzimas líticas de *Trichoderma harzianum* e *Aspergillus nidulans* para gerar protoplastos em *Trichoderma reesei* QM9414, somente foi eficaz quando as preparações enzimáticas purificadas foram suplementadas com quitinase comercial.

Um novo método foi desenvolvido por Huang et al. (1991) para a separação dos bioprodutos das células de leveduras. Uma combinação de agentes físicos, químicos e biológicos como enzimas líticas, suportes osmóticos e esferoplastos estabilizados foram aplicadas para liberar as proteínas associadas às células, sendo que as enzimas líticas foram liberadas juntamente com as proteínas da parede celular. Este método ofereceu alta recuperação de produtos e maior seletividade do que o rompimento mecânico e, além disso, pode ser utilizado com altas concentrações de levedura (maior que 145 g de peso seco / L).

Alfonso et al. (1992) realizaram um estudo de biocontrole, utilizando-se fungo não patogênico para inibição do patógeno *Fusarium oxysporum* f.sp. lycopersici. Verificou-se que houve degradação de 45, 22, 21 e 12 %, respectivamente da parede celular do micélio jovem do patógeno, quando o mesmo foi incubado com o precipitado enzimático, obtido da cultura autolisada de *Mucor rouxii*, *Aspergillus nidulans*, *Penicillium oxalicum* e *P. purpurogenum*.

O uso das enzimas líticas como suplemento enzimático na alimentação, com o objetivo de melhorar a digestibilidade em animais, já vem tomando um grande rumo no ramo da tecnologia de alimentos. Richter et al. (1992) verificaram que o valor alimentício de cereais, quando se utiliza altas proporções de polissacarídeos sem amido, pode melhorar com o uso de misturas enzimáticas como  $\beta$ -1,3-glucanase, protease e xilanase.

As enzimas líticas são usadas com sucesso para a produção de protoplastos de fungos, mas a fase de crescimento das células microbianas é muito importante para a eficiência do método. A formação de protoplastos de *Penicillium solitum*, um fungo produtor de enzimas lipolíticas, foi dependente da fase exponencial de crescimento. A parede celular do fungo foi mais sensível à ação das enzimas líticas durante o início e o meio da fase exponencial (Sorokoletova & Lavrent' ev, 1992).

Akita et al. (1995) desenvolveram um método para o tratamento da água de resíduo de uma destilaria de 'shochu' produzida com cevada, usando a linhagem *Geotrichum* sp M111 que tem capacidade de acelerar a agregação de sólidos insolúveis da água. Nesse filtrado foi adicionada a levedura *Hansenula anomala* J45, que removeu 63 % do DBO (Demanda Bioquímica de Oxigênio). As células de leveduras remanescentes foram digeridas pela bactéria lítica *Rarobacter faecitabidus*, que tem atividade lítica contra J45- 0. A água de resíduo tratada com *R. faecitabidus* foi diluída cerca de 5 vezes com água de torneira e submetida ao tratamento do lodo ativado.

Hahn et al. (1995) construíram diferentes mutantes de *B. macerans* para o gene da  $\beta$ -glucanase e a expressão desse gene foi feita em *E. coli*, a fim de esclarecer o papel dos resíduos que podem estar envolvidos na clivagem hidrolítica da  $\beta$ -glucana. A estrutura tridimensional da glucanase foi determinada por cristalografia, utilizando-se linhagens híbridas de *Bacillus*.

Evidências de produção de uma  $\beta$ -1,3-glucanase ativa foram encontradas em folhas de pepino inoculadas com *Colletotrichum lagenarium* ou com vírus da necrose de tabaco (TNV) e nas folhas inoculadas com os patógenos. O aumento da  $\beta$ -1,3-glucanase coincidiu com a indução de resistência a doenças sistêmicas (Ji & Kuc, 1995).

Okada et al. (1995) estudaram a estrutura do gene que codifica a  $\beta$ -1,3-glucanase de *Bacillus circullans* WL-12 e sugeriram que a região C-terminal da glucanase B (GlcB) interage com a parede celular de levedura. Esta hipótese consiste no fato de que *Bacillus circullans* WL-12 foi originalmente isolado como uma bactéria lítica de parede celular de fungos e supõe-se que as glucanases apresentam o papel mais importante na lise da parede celular de levedura.

Parascandola et al. (1995) investigaram as possíveis alterações na parede celular de *Saccharomyces cerevisiae*, após a imobilização das células em uma matriz gelatinosa insolúvel. As células livres e as imobilizadas foram tratadas com SDS e zymolyase. As análises em microscópio eletrônico de transmissão (TEM) revelaram a existência de uma grande quantidade de manana-proteínas nas paredes das células imobilizadas. Porém, isto pode estar relacionado, também, a agregação das células resultantes do crescimento durante a imobilização.

As análises da lise enzimática da levedura e da autólise devem ser realizadas simultaneamente, pois tanto a lise quanto a autólise podem acontecer ao mesmo tempo. Estudos constataram que as células de leveduras são muito resistentes a autólise celular. Para se obter autolisado de leveduras de *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus*, foi necessário um tratamento térmico a 45°C ou 50°C por 23,5 horas. Durante este tratamento foram feitas observações

em microscópio eletrônico e não foi possível verificar nenhuma célula rompida, mas apenas diferenças morfológicas entre as células frescas lavadas e as células autolisadas. Enquanto, as células frescas mostraram uma forma lisa e elipsoidal, as células autolisadas pareceram como balões cilíndricos que foram esvaziados. As células autolisadas mostraram somente uma diminuição de 43 % no seu volume interno (Amrane & Prigent, 1996).

Mishra et al. (1997) estudaram o efeito de metabólitos microbianos no biocontrole de insetos e nematóides. Estes autores realizaram um 'screening' de amostras de solo e obtiveram 942 isolados microbianos, dentre eles actinomicetes, fungos e bactérias. A identificação dos isolados mostrou que pertenciam a 27 gêneros diferentes e todos foram testados quanto as suas propriedades inseticidas e nematicidas. Os metabólitos de 55 microrganismos isolados, incluindo a *Oerskovia*, causaram, aproximadamente, 100 % de mortalidade nas larvas de *Aedes aegypti*.

Glandorf et al. (1997) estudaram a influência da produção de proteínas antimicrobianas e antifúngicas sobre a microflora saprofítica do solo. Estes autores verificaram que a expressão constitutiva de proteínas antifúngicas relacionadas a patogenicidade em tabaco, na maioria das vezes não afetou a colonização radicular pelo fungo *Glomus mosseae*. Porém o aumento nos níveis de uma  $\beta$ -1,3-glucanase da classe II, de tabaco, reduziu a colonização em potencial, indicando que podem ocorrer efeitos não esperados. Com certeza outros membros da planta beneficiaram a microflora da rizosfera pelo contato com os produtos transgênicos. Pela queda natural das partes da planta, senescência, e pela casca das células da raiz, uma parcela mínima destas proteínas antimicrobianas podem ser liberadas na rizosfera e estarem ativas.

Durante o desenvolvimento do flavedo de "grapefruit", foi avaliado o comportamento das enzimas líticas contra o ataque de fungos. Inúmeros fatores, sem dúvida, contribuem para a diferença na queda da resistência entre frutos jovens e maduros, mas as enzimas  $\beta$ -1,3-glucanase e quitinases estão, também, envolvidas neste processo. A quitinase ativa é inicialmente muito alta, mas diminui

drasticamente durante os estágios precoces do crescimento do fruto, enquanto a  $\beta$ -1,3-glucanase ativa foi baixa em frutos muito jovens e aumentou com a idade dos frutos. Com isso pode-se concluir que, as mudanças na atividade enzimática são resultados da expressão diferencial dos genes e não devido à inativação ou ativação das proteínas existentes (McCollum et al., 1997).

Zhang & Yuen (2000) analisaram o efeito de fluidos de culturas da bactéria *Stenotrophomanas maltophilia* C3 no biocontrole de manchas nas folhas de centeio, causadas pelo *Bipolaris sorokiniana*. Estes autores, encontraram altos índices de quitinases, proteases,  $\beta$ -1,3-glucanases e lipases nas culturas de células C3. O fluido desta cultura mostrou um efeito protetor durável nas folhas, inibindo o desenvolvimento da doença, mesmo quando aplicado 9 dias antes da incubação, e um efeito terapêutico se aplicada dentro de 3 dias após a incubação do *Bipolaris sorokiniana*.

Salazar et al. (2001) obtiveram uma *Escherichia coli* recombinante para a superprodução de  $\beta$ -1,3-glucanase de *O. xanthineolytica*.

El-Katatny et al. (2001) estudaram a produção de quitinase e de  $\beta$ -1,3-glucanase de *Trichoderma harzianum* Rifai T24 para o biocontrole do fitopatógeno *Sclerotium rolfsii*.

### **3- MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1- Isolamento e seleção das bactérias que lisam a parede celular de leveduras**

Para o isolamento de microrganismos que lisam a parede celular de leveduras, foram coletadas amostras de lodo (resíduos do processo de fermentação) da usina de açúcar e álcool Santa Helena, Piracicaba- SP. A linhagem *Saccharomyces cerevisiae* 701 foi utilizada como levedura teste para a etapa de isolamento de bactérias líticas.

##### **3.1.1- Cultivo da levedura utilizada para o estudo da lise da parede celular**

Para a produção de massa celular de levedura, a cultura de 24 horas da linhagem de *Saccharomyces cerevisiae* 701 em meio YEPD inclinado, composto de 10,0 g de extrato de levedura; 3,0 g de extrato de malte; 20,0 g de peptona, 20,0 g de glicose e 20,0 g de Agar por litro, foi inoculada em frasco de Erlenmeyer de 250 mL com 50 mL de meio YEPD caldo. Após 24 horas de incubação dos frascos a 30°C, a massa celular foi recuperada por centrifugação a 10.000 x g durante 10 minutos a 5°C. As células de leveduras foram lavadas, assepticamente, 3 vezes com água destilada, e suspendidas em 200 mL de água destilada, contendo 0,05 % de azida de sódio (Shimoi et al., 1991). A suspensão foi utilizada para a preparação do meio YLM-Agar macio (Shimoi et al., 1991), como descrito no item 3.1.2, contendo uma concentração final de 10<sup>10</sup> células viáveis de leveduras / mL. A contagem das células viáveis de leveduras, foi feita em microscópio óptico binocular Zeiss, utilizando-se coloração de azul de metileno

em câmara de Neubauer (Collins & Lyne, 1989). Como controle foi medido a absorvância a 660 nm da suspensão diluída 10.000 vezes, tendo como referência a obtenção da leitura aproximada de 0,32. A linhagem de *S. cerevisiae* 701 foi mantida a 5°C em tubos de meio YEPD inclinado sob camada de vaselina líquida estéril.

### **3.1.2- Isolamento de microrganismos que lisam a parede celular de *Saccharomyces cerevisiae* 701**

Amostras de 1 g de lodo foram adicionadas a tubos de ensaio contendo 10 mL de água destilada esterilizada, sendo suspensas e a seguir filtradas em lã de vidro. Este filtrado foi utilizado como suspensão de microrganismos contendo bactérias capazes de lisar células de leveduras viáveis.

As bactérias com capacidade de lisar leveduras (YLM) cresceram em placas com YLM-Agar macio, contendo 5,74 g de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 1,15 g de NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,205 g de MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O e 15 g de Agar por litro, previamente esterilizado por 20 minutos a 121°C e 1 atm, e resfriado a 45°C. Foi adicionado neste meio resfriado, uma suspensão de leveduras para uma concentração final de 10<sup>10</sup> células viáveis / mL, preparada como descrito no item 3.1.1. A suspensão de microrganismos, preparada como descrito anteriormente, foi espalhada sobre a superfície do meio agarizado, com o auxílio de uma alça triangular de níquel-cromo, sendo as placas incubadas a 30°C por 3 a 10 dias (Goto-Yamamoto et al., 1993b). As colônias de cor amarela e branca, rodeadas por um halo claro, crescidas sobre a superfície do meio que indicavam a lise das células de leveduras, foram isoladas por transferência em série sobre placas de meio de mesma composição.

### **3.1.3- Seleção preliminar de bactérias que lisam células viáveis de leveduras**

As bactérias isoladas, de acordo com o item 3.1.2., foram submetidas a novo isolamento visando a seleção de colônias que apresentassem maior halo de lise, em placas de meio YLM-Agar macio contendo,  $10^{10}$  células viáveis de leveduras / mL. As colônias que apresentaram os maiores halos de lise, foram transferidas para tubos inclinados de meio TYMC, composto de 5 g de Trypticase peptona (BBL), 3 g de extrato de levedura (Difco), 3 g de extrato de malte (Difco), 0,12 g de catalase, 5,8 g de  $K_2HPO_4$ ; 1,15 g de  $NH_4H_2PO_4$ ; 0,264 g de  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  e 20 g de Agar por litro.

A suspensão de células das bactérias reisoladas e cultivadas por 24 horas em TYMC inclinado foram submetidas ao teste de aglutinação, como descrito no item 3.1.4.1.3.

### **3.1.4- Seleção de bactérias produtoras de $\beta$ -1,3-glucanase em meios de cultura n<sup>o</sup> 1 e 2**

As colônias isoladas de acordo com o item 3.1.3, designadas como YLM-B1, YLM-B22, YLM-B26, YLM-B191, YLM-Fxx, YLM-4, foram cultivadas em frascos Erlenmeyer contendo meio n<sup>o</sup> 1 (Shimoi et al., 1991) e meio n<sup>o</sup> 2 (Kitamura et al., 1974) e foram analisadas quanto a produção de  $\beta$ -1,3-glucanase, enzima responsável pela hidrólise da camada de glucana que compõe a parede celular de leveduras.

**Meio n<sup>o</sup> 1.** TYMC caldo (Shimoi et al., 1991) composto de 5 g de Trypticase peptona (BBL); 3 g de extrato de levedura (Difco), 3 g de extrato de malte (Difco); 0,12 g de catalase; 5,8 g de  $K_2HPO_4$ ; 1,15 g de  $NH_4H_2PO_4$ ; 0,264 g de  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ; por litro. A solução de catalase foi esterilizada à vácuo, pelo sistema

asséptico Sterifil (Millipore) em suporte de 47 mm, utilizando-se membrana de filtração 0,45  $\mu\text{m}$ .

**Meio n<sup>o</sup> 2.** Meio descrito por Kitamura et al. (1974) modificado, composto de 20 g de leveduras liofilizadas; 2,0 g de extrato de levedura; 2,0 g de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ; 1,0 g de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ; 1,0 g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0,1 g de  $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$  por litro.

As linhagens selecionadas para a produção de  $\beta$ -1,3-glucanase foram mantidas em meio inclinado de TYMC, como descrito no item 3.1.3. A cultura de 24 horas de cada linhagem a 30<sup>o</sup>C, foi inoculada em frascos de Erlenmeyer de 250 mL, contendo 50 mL dos meios n<sup>o</sup> 1 e n<sup>o</sup> 2. Após 24 horas de incubação a 30<sup>o</sup>C em agitador rotatório a 200 rpm; os meios foram centrifugados a 10.000 x g por 10 minutos a 5<sup>o</sup>C e a atividade de  $\beta$ -1,3-glucanase foi determinada no sobrenadante, como descrito no item 3.1.4.1.1.

### **3.1.4.1- Determinação da atividade**

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

Uma solução da laminarina de *Laminaria digitata*, utilizada como substrato, foi preparada em tampão 0,1 M acetato de sódio pH 5,5 (Gurr et al., 1992) e a atividade de  $\beta$ -1,3-glucanase foi determinada como descrito por Saeki et al., (1994). A mistura de 250  $\mu\text{L}$  de solução 1 % de laminarina e 250  $\mu\text{L}$  de solução enzimática foi incubada a 30<sup>o</sup>C por 30 minutos. A reação foi paralisada pelo aquecimento em banho-maria em ebulição por 3 minutos, sendo os açúcares redutores determinados pelo método de Somogyi e Nelson (1952), utilizando-se glicose como açúcar padrão. Uma unidade foi determinada como a quantidade de  $\beta$ -1,3-glucanase ativa que liberou um  $\mu\text{mol}$  de açúcar redutor equivalente a D-glicose por minuto de reação sob as condições do ensaio. Após testes de caracterização bioquímica da  $\beta$ -1,3-glucanase, a solução 1% de laminarina foi

preparada em tampão 0,1 M acetato de sódio pH 5,5 e a mistura de reação foi incubada a 55°C por 30 minutos.

#### **3.1.4.1.2- Determinação da atividade de protease**

A atividade proteolítica foi determinada pelo método de Rowley & Bull (1977) modificado por Andrews & Asenjo (1987 a). A mistura de 500 µL de solução enzimática e 500 µL de solução 2,5 g / L de azocaseína foi incubada a 37°C por 20 minutos. A solução de azocaseína foi filtrada pelo sistema asséptico Sterifil (Millipore) em suporte de 47 mm de diâmetro utilizando-se membrana de filtração de 0,45 µm. A reação foi paralisada pela adição de 2 mL de solução 3 M de ácido tricloroacético (TCA). Após a centrifugação a 10.000 x g por 10 minutos, a absorbância do sobrenadante foi lida a 400 nm. Uma unidade de atividade proteolítica foi definida como o aumento de uma unidade de absorbância sob as condições do ensaio.

#### **3.1.4.1.3- Determinação da atividade de aglutinação**

A atividade de aglutinação de leveduras pelas bactérias líticas foi testada utilizando-se as leveduras *S. cerevisiae* 701, *S. cerevisiae* ATCC 26602 e *Rhodotorula rubra* CCT 3895. As suspensões celulares de leveduras foram preparadas como descrito no item 3.1.1.

As suspensões celulares das leveduras *S. cerevisiae* 701, *S. cerevisiae* ATCC 26602 e *R. rubra* CCT 3895 foram inoculadas em frascos Erlenmeyer de 50 mL contendo 10 mL de meio YEPD e incubadas em agitador rotatório a 200 rpm durante 20 horas a 30°C. Após incubação os meios de culturas foram centrifugados a 10.000 x g por 10 minutos a 5°C e as células foram lavadas 3 vezes com água destilada. Em seguida as células foram ressuspensas em tampão 0,2 M fosfato pH 7,4 para a obtenção de uma suspensão de absorbância de 0,5 a 660 nm. Alíquotas de 500 µL de suspensão de levedura foram transferidas para tubos de ensaios de 13 x 70 mm, e uma alça das células da

linhagem lítica YLM-B191 foi misturada a cada uma das suspensões de leveduras. Os tubos de ensaios foram incubados com agitação por 5 a 10 minutos e a reação de aglutinação foi observada como descrito por Goto-Yamamoto et al. (1993). Após a reação de aglutinação, as células de YLM-B191 aderidas a superfície celular de *S. cerevisiae* 701, foram observadas em microscópio óptico binocular Zeiss.

### **3.2- Produção de enzimas líticas pela linhagem YLM-B191**

#### **3.2.1- Produção de proteases pela linhagem YLM-B191 em meio de cultura n<sup>o</sup> 1, 3 e 4**

Para a produção de protease, a cultura de 24 horas da linhagem YLM-B191 em tubos inclinados de meio TYMC foi transferida para frascos Erlenmeyer contendo 50 mL de meio de cultura n<sup>o</sup> 1 (descrito no item 3.1.4), n<sup>o</sup> 3 e n<sup>o</sup> 4 (descritos no item 3.2.5). Após 48 horas de fermentação a 200 rpm a 30°C, o meio de cultura foi centrifugado a 5°C por 10 minutos a 10.000 x g, e a atividade de protease no sobrenadante foi determinada como descrito no item 3.1.4.1.2.

#### **3.2.2- Produção de $\beta$ -1,3-glucanase pela linhagem YLM-B191 em frascos agitados, frascos aerados e em fermentador.**

Alíquotas de 25 mL de cultura de 24 horas da linhagem YLM-B191 em meio n<sup>o</sup> 1 (descrito no item 3.1.4), foram inoculadas em frascos Erlenmeyer agitados com injeção de ar, e em fermentador Bioflo II, contendo 500 mL do mesmo meio. Após 24 horas a 30°C, os meios de culturas foram centrifugados a 5°C por 10 minutos a 10.000 x g, e a atividade de  $\beta$ -1,3-glucanase foi determinada como descrito no item 3.1.4.1.1.

### **3.2.3- Relação entre tempo de fermentação, alteração do pH do meio de cultura, crescimento do microrganismo e produção da $\beta$ -1,3-glucanase pela linhagem YLM-B191**

A linhagem YLM-B191 selecionada de acordo com o item 3.1.4, para a obtenção de  $\beta$ -1,3-glucanase ativa, foi utilizada para os estudos de produção da enzima.

#### **3.2.3.1- Preparação do inóculo**

A cultura de 24 horas da linhagem YLM-B191 em tubo inclinado de meio TYMC foi inoculada com o auxílio de uma alça, em um frasco Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio n<sup>o</sup> 1 (TYMC). O frasco foi incubado a 30<sup>o</sup>C sob agitação de 200 rpm. O meio de cultura foi utilizado como pré-inóculo.

#### **3.2.3.2- Fermentação**

A fermentação foi realizada em frascos Erlenmeyer de 2.000 mL em agitador rotatório a 200 rpm. Foi adicionado assepticamente 50 mL de inóculo, preparado de acordo com o item 3.2.3.1, ao frasco contendo 800 mL de meio de cultura. O frasco foi incubado a 30<sup>o</sup> C por 72 horas, mantendo-se a aeração de 1 vvm. Amostras de 10 mL meio de cultura foram coletadas em diferentes tempos de fermentação e divididos em duas partes de 5 mL, sendo uma parte para a determinação do pH e do crescimento do microrganismo como descrito no item 3.2.3.3, e a outra parte para a determinação da atividade de  $\beta$ -1,3-glucanase. A atividade de  $\beta$ -1,3-glucanase foi determinada no sobrenadante, após centrifugação

de 5 mL da amostra a 10.000 x g, por 10 minutos a 5°C, de acordo com o item 3.1.4.1.1.

### **3.2.3.3- Determinação do crescimento do microrganismo**

O crescimento da linhagem YLM-B191, foi determinado por espectrofotometria a 660 nm (Ueda & Nanri, 1967). Após a fermentação, uma amostra de 5 mL de meio de cultura foi centrifugada a 10.000 x g por 10 minutos a 5°C e a massa celular foi submetida a 3 lavagens sucessivas com 5 mL de água destilada.

O crescimento celular, também foi determinado pelo conteúdo de massa celular. Após a fermentação, alíquotas de 5 mL de meio de cultura foram centrifugadas e lavadas com água destilada, como descrito acima. A massa celular, obtida da última lavagem, foi colocada em estufa a 105°C para a secagem, até atingir peso constante, e depois foi resfriada em dessecador e pesada (Singh et al., 1994). A absorbância da suspensão celular foi relacionada à massa celular seca.

### **3.2.4- Reisolamento da linhagem YLM-B191**

Devido a diminuição na atividade de  $\beta$ -1,3-glucanase pela linhagem YLM-B191, a cultura foi submetida a vários reisolamentos em placas de meio TYMC, descritos no item 3.1.3. A colônia reisolada YLM-B191-1, foi testada para a produção de  $\beta$ -1,3- glucanase como descrito a seguir.

### 3.2.5- Produção de $\beta$ -1,3-glucanase pela linhagem YLM-B191-1 em diferentes meios de cultura

Os meios n<sup>o</sup> 3, 4, 5, 6, 7 e 8, descritos a seguir, foram utilizados para a produção de  $\beta$ -1,3-glucanase pela linhagem YLM-B191-1. Alíquotas de 2,5 mL de pré-inóculo de 24 horas da linhagem YLM-B191-1 foram inoculadas em frascos de Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL dos respectivos meios de culturas e incubados sob agitação a 200 rpm durante 48 horas a 30<sup>o</sup>C. A atividade de  $\beta$ -1,3-glucanase foi determinada como descrito no item 3.1.4.1.1. O meio de cultura n<sup>o</sup> 4 também foi testado quanto a atividade de protease, como descrito no item 3.1.4.1.2.

**Meio n<sup>o</sup> 3.** Este meio continha os mesmos compostos do meio n<sup>o</sup> 1 (meio TYMC, descrito no item 3.1.4) acrescido de 1 % de parede celular de levedura (doada pelo Prof. Dr. Gil Eduardo Serra do Depto de Tecnologia de Alimentos – UNICAMP).

**Meio n<sup>o</sup> 4.** Meio de cultura descrito por Siström modificado por Scott & Schekman (1980), constituído de 1,5 % de levedura seca; 0,2 % g de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 1,36 % de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,42 % de KOH; 0,02 % de MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O; 0,0001 % de Fe<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub> 6H<sub>2</sub>O; 0,0001 % de biotina e 0,0001 % de tiamina. As soluções de vitaminas foram esterilizadas à vácuo, pelo sistema asséptico Sterifil (Millipore) em suporte de 47 mm, utilizando-se membrana de filtração 0,45  $\mu$ m.

**Meio n<sup>o</sup> 5.** Meio descrito por Kitamura (1982c), continha 0,7 % de extrato de malte, 1 % de peptona e 0,3 % de NaCl, o pH foi ajustado para 8,0.

**Meio n<sup>o</sup> 6.** Meio descrito por Andrews & Asenjo (1987a), continha 0,2 % de glicose; 0,2 % de parede celular de levedura; 0,05 % de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,03 % de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2H<sub>2</sub>O; 0,5 % de NH<sub>4</sub>Cl e 50 mL da solução de elementos traços, o pH do meio foi 5,6. Solução de elementos traços: 0,025 % de MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O; 0,005 %

de  $\text{CaCl}_2$ ; 0,002 % de  $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ; 0,002 % de  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ; 0,0005 % de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ; 0,01 % de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0,1 % de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  e 0,06 % de EDTA.

**Meio n° 7.** Meio de cultura constituído de 0,67 % de YNB (“Yeast nitrogen base”); 0,3 % de parede celular de levedura (doadada pelo prof. Dr. Gilson Eduardo Serra do Depto de Tecnologia de Alimentos – UNICAMP) em vez de glucana de levedura, como descrito por Saeki et al (1994).

**Meio n° 8.** Meio de cultura descrito por Doi et al. (1973), continha 8 % de levedura de panificação, 1% de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  e 0,01 % de  $\text{MgSO}_4$ . Para a produção de enzimas, o meio foi incubado a 30° C por 48 horas.

### **3.3- Identificação das linhagens produtoras de enzimas líticas**

As características fenotípicas, bioquímicas e fisiológicas foram determinadas para todas as linhagens isoladas, sendo os testes de assimilação de diferentes compostos orgânicos, de composição de ácidos graxos e de conteúdo de C + G do DNA realizados apenas para as linhagens YLM-4 e YLM-B191-1.

#### **3.3.1- Características morfológicas e fisiológicas das linhagens que lisam células viáveis de *Saccharomyces cerevisiae* 701**

As características fenotípicas, bioquímicas e fisiológicas das linhagens YLM-4, YLM-B1, YLM-B22, YLM-B26, YLM-B191-1, YLM-Fxx, foram estudadas como descrito por Mac FADDIN (1980). O teste de anaerobiose foi realizado utilizando-se jarra de anaerobiose AnaeroJar contendo AnaeroGen (Oxoid).

Para manutenção, as culturas microbianas de 24 horas em tubos inclinados de meio TYMC (descrito no item 3.1.3) submersas em vaselina líquida esterilizada foram conservadas a 5°C e repicadas a cada 2 - 3 meses.

### **3.3.2- Características fisiológicas e quimiotaxonômicas das linhagens YLM-4 e YLM-B191-1, que lisam células viáveis de *Saccharomyces cerevisiae* 701**

Os testes de assimilação de diferentes compostos orgânicos, de composição de ácidos graxos da parede celular, do conteúdo de C+ G do DNA e do coeficiente de similaridade foram realizados para as linhagens YLM-4 e YLM-B191-1 pelo grupo do Prof. Dr. Young- Ha Park (Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, KRIBB, P.O., Korea), de acordo com o método descrito por Lee et al. (1996 e 1997).

### **3.4- Produção e purificação da $\beta$ -1,3-glucanase de *Cellulomonas cellulans* YLM-B191-1**

#### **3.4.1- Preparação do pré-inóculo**

A cultura da linhagem de *C. cellulans* YLM-B191-1 de 24 horas, em meio TYMC inclinado (descrito no item 3.1.3), foi transferida para frasco Erlenmeyer de 250 mL, contendo 10 mL de meio n<sup>o</sup> 4. Após 24 horas de incubação sob agitação a 200 rpm a 30°C, o meio denominado pré-inóculo I, foi transferido para outro frasco contendo 200 mL de meio n<sup>o</sup> 4, incubado nas mesmas condições, que foi definido como pré-inóculo II.

### **3.4.2- Produção da $\beta$ -1,3-glucanase de *Cellulomonas cellulans* YLM-B191-1**

Uma alíquota de 75 mL do pré-inóculo II, obtido de acordo com o item 3.4.1, foi transferido assepticamente para frasco de Erlenmeyer de 4.000 mL contendo 1.500 mL de meio n<sup>o</sup> 4. Após 20 horas de incubação agitação a 200 rpm a 30<sup>o</sup>C, o cultivo foi centrifugado a 10.000 x g durante 10 minutos a 5<sup>o</sup>C. O sobrenadante do meio de cultura foi liofilizado e usado como preparação bruta de  $\beta$ -1,3-glucanase. A atividade da enzima foi determinada como descrito no item 3.1.4.1.1.

### **3.4.3- Purificação da $\beta$ -1,3-glucanase de *Cellulomonas cellulans* YLM-B191-1**

#### **3.4.3.1- Fracionamento da enzima bruta usando ultrafiltração**

O pó liofilizado (10 g), obtido de acordo com o item 3.4.2, foi ressuspendido em 50 mL de tampão 0,01 M acetato de sódio pH 4,5 e fracionado por ultrafiltração, em ultrafiltrador Amicon mod. TCF2, usando-se membrana de retenção de 30 kDa (Amicon Corp, Danvers, Mass). A porção retida pela membrana (10 mL), foi dialisada contra o mesmo tampão, a 5<sup>o</sup>C durante 10 horas. Esta porção dialisada foi, novamente, fracionada por ultrafiltração em membrana de 30 kDa e o seu volume final foi concentrado para 3,6 mL e usada como preparação bruta de  $\beta$ -1,3-glucanase. Uma alíquota de 3,0 mL desta preparação bruta foi aplicada na coluna de CM-Sepharose CL-6B de acordo com as condições a seguir.

#### **3.4.3.2- Cromatografia da $\beta$ -1,3-glucanase lítica de *Cellulomonas cellulans* YLM-B191-1 em coluna de CM-Sepharose CL-6B**

A amostra (3,0 mL) preparada de acordo com o item anterior 3.4.3.1, foi aplicada em coluna de CM-Sepharose CL-6B de 1,5 cm de diâmetro e 18 cm de comprimento, equilibrada com tampão 0,01 M acetato de sódio pH 4,5. A amostra foi eluída da coluna pela aplicação de 150 mL de tampão 0,01 M acetato de sódio pH 4,5 e 60 mL de tampão 0,01 M acetato de sódio pH 4,5 contendo 0,4 M de NaCl, consecutivamente. As frações de 5 mL foram coletadas a cada 15 minutos utilizando-se o coletor automático de frações Isco UA-6 modelo Foxy 200. O curso de eluição das proteínas da coluna foi acompanhado pela medida de absorbância a 280 nm em espectrofotômetro Beckman DU 70. A atividade de  $\beta$ -1,3-glucanase das frações foi determinada de acordo com o item 3.1.4.1.1. A concentração de proteína das soluções enzimáticas, nas diversas etapas de purificação, foi determinada de acordo com o método de Lowry (1951) utilizando-se ovoalbumina como padrão. As frações que mostraram maior atividade específica de  $\beta$ -1,3-glucanase foram dialisadas contra o tampão de equilíbrio durante 6 horas a 5°C e usada para os testes de caracterização e homogeneidade.

O acompanhamento do processo de purificação da  $\beta$ -1,3-glucanase foi monitorado por eletroforese. O gel em gradiente SDS-PAGE (5 a 15 %) descrito no item 3.5.5.2, foi usado para a amostra bruta e preparado no sistema de gradiente linear Mod. 385 Gradient Formers (BioRad), enquanto os géis SDS-PAGE (12 %) descrito no item 3.5.5.3, ou NATIVE-PAGE (12 %) descrito no item 3.5.5.4, foram usados para as amostras purificadas. As eletroforeses foram desenvolvidas no sistema vertical para mini-géis BioRad. Alíquotas obtidas das amostras do sobrenadante do meio de cultura, e da fração purificada da coluna de CM-Sepharose CL-6B foram preparadas, aplicadas e reveladas nos géis de eletroforese, como descrito no item 3.5.5.

### **3.5- Determinação das características da $\beta$ -1,3-glucanase lítica de *Cellulomonas cellulans* YLM-B191-1**

Em estudos preliminares foram determinadas as características de pH e temperatura ótima de atividade e faixa de pH e temperatura de estabilidade da preparação bruta de  $\beta$ -1,3-glucanase, nas mesmas condições usadas para determinação das características da enzima purificada, como descrito a seguir.

A  $\beta$ -1,3-glucanase purificada de acordo com os procedimentos descritos no item 3.4.3, foi utilizada para o estudo de caracterização da enzima.

#### **3.5.1- Efeito do pH na atividade enzimática da $\beta$ -1,3-glucanase de *Cellulomonas cellulans* YLM-B191-1**

Para o estudo do efeito do pH na atividade enzimática, o sistema de reação foi constituído de 0,5 mL de solução  $\beta$ -1,3-glucanase purificada (0,041 U / mL) e 0,5 mL de laminarina (1 %) em tampão 0,1 M. Os sistemas tampões foram usados dentro dos limites de ação tamponante: citrato fosfato pH 3,5 a 6,5, fosfato pH 6,5 a 8,0 e carbonato pH 8,5 a 9,5. As misturas de reação foram incubadas a 55°C em banho de água termoestabilizado por 30 minutos. Após a incubação, os açúcares redutores liberados foram determinados pelo método de Somogyi e Nelson (1952) e os valores obtidos calculados como descritos no item 3.1.4.1.1, sendo considerada a atividade relativa para efeito de comparação.

#### **3.5.2- Efeito do pH na estabilidade enzimática da $\beta$ -1,3-glucanase de *Cellulomonas cellulans* YLM-B191-1**

Para o estudo do efeito do pH na estabilidade enzimática, 0,5 mL da solução da enzima purificada contendo 0,041 U / mL de atividade, foi pré-incubada com 0,5 mL de solução tampão 0,1 M de diferentes valores de pH

durante 30 minutos a 55°C. Foram utilizados os sistemas tampões: citrato fosfato pH 3,5 a 6,5, fosfato pH 6,5 a 8,0 e carbonato pH 8,5 a 9,5. A atividade residual foi determinada pela adição de 0,5 mL de laminarina (1 %) em tampão 0,2 M acetato de sódio pH 5,5 às soluções enzimáticas e, as misturas de reações foram incubadas a 55°C durante 30 minutos. A concentração de açúcares redutores liberados foi determinada pelo método de Somogyi e Nelson (1952) e os valores obtidos calculados como descritos no item 3.1.4.1.1, sendo considerada a atividade relativa para efeito de comparação.

### **3.5.3- Efeito da temperatura na atividade enzimática da $\beta$ -1,3-glucanase de *Cellulomonas cellulans* YLM-B191-1**

Para o estudo do efeito da temperatura na atividade enzimática, o sistema de reação foi constituído de 0,5 mL de solução  $\beta$ -1,3-glucanase purificada contendo 0,041 U / mL e 0,5 mL de laminarina (1 %) em tampão 0,1 M acetato de sódio pH 5,5. As misturas de reação foram incubadas em diferentes temperaturas entre 5 e 100°C durante 30 minutos. Após a incubação, os açúcares redutores liberados foram determinados pelo método de Somogyi e Nelson (1952) e os valores obtidos calculados como descritos no item 3.1.4.1.1, sendo considerada a atividade relativa para efeito de comparação.

### **3.5.4- Estabilidade térmica da $\beta$ -1,3-glucanase de *Cellulomonas cellulans* YLM-B191-1**

Para o estudo do efeito da temperatura na estabilidade enzimática, amostras de 2,0 mL da solução da enzima purificada, contendo 0,082 unidade de atividade, em tampão 0,1 M acetato de sódio pH 5,5, foram pré-incubadas em diferentes temperaturas entre 10 e 80°C durante 120 minutos. A atividade residual foi determinada, no sistema de reação constituído de 0,5 mL de solução de  $\beta$ -1,3-glucanase e 0,5 mL de laminarina 1 % em tampão 0,1 M acetato de sódio pH 5,5.

A concentração de açúcares redutores liberados foi determinada pelo método de Somogyi e Nelson (1952) sendo considerada a atividade relativa para efeito de comparação.

### **3.5.5- Monitoramento das etapas de purificação da $\beta$ -1,3-glucanase por eletroforese em gel poliacrilamida**

As etapas da purificação da  $\beta$ -1,3-glucanase foram acompanhadas pela eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE), das preparações enzimáticas brutas e da solução purificada da enzima.

#### **3.5.5.1- Preparo da amostra para a eletroforese**

Uma alíquota de 1.000  $\mu$ L de sobrenadante do meio de fermentação (1,13 mg de proteína) dialisado, obtido como descrito no item 3.4.2, foi liofilizado. O pó foi ressuscitado em 100  $\mu$ L da solução A (descrita a seguir), e incubado a 80°C por 3 minutos. Alíquotas de 10  $\mu$ L (0,11 mg de proteína) foram aplicadas no topo do gel gradiente SDS-PAGE (5 a 15 %), descrito no item 3.5.5.2. A eletroforese foi desenvolvida pela aplicação de 19 mA por gel a 20°C por 3 horas.

Uma alíquota de 1500  $\mu$ L (0,3375 mg de proteína) da fração de  $\beta$ -1,3-glucanase purificada, obtida de acordo com o item 3.4.3.2, foi dialisada e liofilizada. Este pó suspenso em 50  $\mu$ L da solução A (descrita a seguir) foi incubado a 80°C por 3 minutos. Alíquotas de 5  $\mu$ L desta amostra (0,034 mg de proteína), foram aplicadas nos topos dos géis SDS-PAGE (12 %), e NATIVE-PAGE (5 a 15 %), descritos nos itens 3.5.5.3 e 3.5.5.4. A eletroforese foi

desenvolvida aplicando-se 12 mA por 2 a 3 horas a 15°C, para a separação das proteínas.

Após o desenvolvimento da eletroforese, os géis foram lavados, com uma solução fixadora de metanol (50 %) e ácido acético (10 %) em água deionizada, durante 1 hora e 30 minutos em mesa agitadora. As bandas de proteínas no gel foram evidenciadas pela coloração com Coomassie Blue R-250 (Solução B) ou com AgNO<sub>3</sub> (Solução C) descritas a seguir.

**Solução A:** Esta solução foi usada como tampão para a diluição da amostra, e preparada com 0,01 % de azul de bromofenol em 0,625 mL de tampão 2 M Tris / HCl pH 6,8; 2,3 mL de glicerol, 2 mL de SDS (20 %), 5,075 mL de água deionizada, e mercaptoetanol (5 %). O SDS e o mercaptoetanol não foram adicionados à solução A, quando a amostra foi preparada para a NATIVE-PAGE (5 a 15 %). A água foi deionizada pelo sistema de purificação de água Milli-Q RG-Milli-Q Plus.

**Solução B:** 0,25 g de Coomassie Blue R-250 foi diluído em 10 mL de ácido acético glacial (Sigma), 50 mL de metanol (Sigma) e 40 mL de água deionizada. O gel contendo a proteína eletroforisada permaneceu em banho nesta solução por 60 minutos, em mesa agitadora (Neuholff et al., 1988).

**Solução C:** AgNO<sub>3</sub> (0,1 %) em água deionizada. Os géis contendo as proteínas eletroforisadas permaneceram em banho nesta solução reveladora por 30 minutos, em mesa agitadora. As proteínas foram reveladas com uma solução de NaCO<sub>3</sub> (3 %) e formaldeído (50 µL) em água deionizada. Os géis foram preservados em solução 1,0 M de ácido cítrico (Sigma).

### **3.5.5.2- Eletroforese da $\beta$ -1,3-glucanase em gel gradiente SDS-poliacrilamida (5 a 15 %).**

A eletroforese foi realizada de acordo com o método de Morrissey (1981) com modificações. Os géis (5 % e 15 %) foram preparados e misturados pelo sistema de gradiente linear Mod. 385 Gradient Formers (BioRad).

**Gel 5 %:** O gel foi preparado pela mistura de 3,05 mL de acrilamida (30 %) / Bis (0,8 %); 11,41 mL de água deionizada; 0,46 mL de SDS (4 %); 3,02 mL de tampão 2,25 M Tris / HCl pH 8,8; 0,25 mL de persulfato de amônio (10 %) e 25  $\mu$ L de TEMED.

**Gel 15 %:** O gel foi preparado pela mistura de 9,15 mL de acrilamida (30 %) / Bis (0,8 %); 5,31 mL de água deionizada; 0,46 mL de SDS (4 %); 3,02 mL de tampão 2,25 M Tris / HCl, pH 8,8; 0,25 mL de persulfato de amônio (10 %) e 25  $\mu$ L de TEMED. O gel de empilhamento (5 %) foi preparado como descrito anteriormente.

### **3.5.5.3- Eletroforese da $\beta$ -1,3-glucanase em gel SDS-poliacrilamida (12%).**

A eletroforese foi realizada de acordo com o método de Morrissey (1981) com modificações. O gel foi preparado pela mistura de 7,32 mL de acrilamida (30 %) / Bis (0,8 %); 7,14 mL de água deionizada; 0,46 mL de SDS (0,4 %); 3,02 mL de tampão 2,25 M Tris / HCl, pH 8,8; 0,25 mL de persulfato de amônio (10 %) e 25  $\mu$ L de TEMED. O gel de empilhamento (5 %) foi preparado como descrito no item 3.5.5.2. A eletroforese foi realizada pelo sistema vertical para mini-géis (BioRad).

#### **3.5.5.4- Eletroforese da $\beta$ -1,3-glucanase em gel poliacrilamida (12 %)**

A eletroforese nativa foi realizada de acordo com o método de Davis (1964) com modificações. O gel foi preparado pela mistura de 6,0 mL de acrilamida / Bis; 7,12 mL de água deionizada; 1,88 mL de tampão 2,25 M Tris / HCl pH 8,9; 0,25 mL de persulfato de amônio 10 % e 25  $\mu$ L de TEMED. O gel de empilhamento (5 %) foi preparado como descrito no item 3.5.5.2. A eletroforese foi realizada pelo sistema vertical para mini-géis (BioRad).

#### **3.5.6- Determinação do peso molecular da $\beta$ -1,3-glucanase de *Cellulomonas cellulans* YLM-B191-1**

A  $\beta$ -1,3-glucanase, purificada de acordo com o item 3.4.3.2, submetida à eletroforese em gel SDS-poliacrilamida foi preparada como descrito no item 3.5.5.1.

Para a determinação do peso molecular da  $\beta$ -1,3-glucanase, foi aplicado no topo do gel SDS-PAGE (12 %) uma alíquota de 5  $\mu$ L de uma mistura padrão de peso molecular (Bio Rad), em 200  $\mu$ L de solução A, preparada de acordo com o item 3.5.5.1. A mistura padrão de proteínas continha a fosforilase b (94.000), a soro albumina bovino (67.000), a ovoalbumina (43.000), a anidrase carbônica (30.000), o inibidor tripsina de soja (20.100), e  $\alpha$ -lactoalbumina (14.000), de acordo com Shimoi et al. (1991).

### **3.5.7- Determinação dos parâmetros cinéticos: $K_M$ e $V_{max}$ , da $\beta$ -1,3-glucanase de *Cellulomonas cellulans* YLM-B191-1**

#### **3.5.7.1- Cinética enzimática**

O efeito da concentração de substrato na atividade de  $\beta$ -1,3-glucanase foi testado com o substrato laminarina (*Laminaria digitata*).

No estudo do efeito da concentração da laminarina (*Laminaria digitata*) usada como substrato, o sistema de reação foi constituído de 250  $\mu$ L de solução enzimática (0,041 Unidade de glucanase / mL) e 250  $\mu$ L de solução do substrato, em tampão 0,1 M acetato de sódio pH 5,5, na concentração em relação ao volume final, variável entre 0,04 % e 1,0 %. As misturas de reação foram incubadas durante 30 minutos em banho de água termoestabilizado a 55°C, e a atividade enzimática foi determinada de acordo com o item 3.1.4.1.1. Os valores de  $K_M$  (mg / mL) e  $V_{max}$  (Unidades de atividade de  $\beta$ -1,3-glucanase sobre a laminarina / min x mg de proteína), foram determinados utilizando-se o método gráfico de Lineweaver- Burk (Linewaver & Burk, 1934).

### **3.5.8- Efeito de sais, compostos inorgânicos e inibidores sobre a atividade da $\beta$ -1,3-glucanase de *Cellulomonas cellulans* YLM-B191-1**

#### **3.5.8.1- Efeito de sais sobre a atividade da $\beta$ -1,3-glucanase de *Cellulomonas cellulans* YLM-B191-1**

Para o estudo do efeito de sais na atividade da enzima bruta e purificada sobre o substrato laminarina, o sistema de reação foi constituído de 500  $\mu$ L de

solução 1 % de laminarina em tampão 0,1 M acetato de sódio pH 5,5; 500  $\mu$ L da preparação enzimática bruta (0,037 Unidade de atividade / mL) ou da solução de  $\beta$ -1,3-glucanase purificada (0,041 Unidade de atividade / mL) preparadas no mesmo tampão; 250  $\mu$ L de solução contendo os seguintes compostos:  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ;  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ;  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ;  $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ;  $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ;  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ;  $\text{AgNO}_3$ ;  $\text{HgCl}_2$  na concentração necessária para 1,0 e 10 mM em relação ao volume final na mistura de reação. Após 30 minutos de incubação a 55°C, os açúcares redutores liberados foram determinados pelo método de Somogyi e Nelson (1952) como descrito no item 3.1.4.1.1, utilizando-se como branco a mistura de tempo zero de reação.

### **3.5.8.2- Efeito de compostos inorgânicos e inibidores sobre a atividade da $\beta$ -1,3-glucanase de *Cellulomonas cellulans* YLM-B191-1**

O efeito de compostos inorgânicos e inibidores de enzimas foi verificado semelhantemente ao efeito de sais na atividade enzimática. Para o estudo do efeito de diversos reagentes na atividade de  $\beta$ -1,3-glucanase sobre a laminarina o sistema de reação continha 500  $\mu$ L de solução 1 % de laminarina em tampão 0,1 M acetato de sódio pH 5,5; 250  $\mu$ L da solução de  $\beta$ -1,3-glucanase purificada (0,041 Unidade / mL) ou 250  $\mu$ L da preparação enzimática bruta (0,037 Unidade de atividade / mL) em tampão 0,1 M acetato de sódio pH 5,5; e 250  $\mu$ L de solução de um dos reagentes 2- $\beta$ -mercaptoetanol, 4-(cloromercúrio) benzóico, uréia, arseniato de sódio ( $\text{NaAsO}_2$ ), 4-amino benzóico, semicarbazida, ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), iodoacetamida, iodeto de potássio, fenilmetilsulfonilfluoreto, oxalato de sódio, citrato de sódio, permanganato de potássio ( $\text{KMnO}_4$ ), N-bromosuccinimida, lauril-sulfato de sódio, na concentração necessária para 1,0 e 10 mM em relação ao volume final da mistura de reação. A atividade enzimática foi determinada de acordo com o item 3.1.4.1.1, utilizando-se como branco a mistura de reação em tempo zero.

### **3.5.9- Especificidade da $\beta$ -1,3-glucanase de *Cellulomonas cellulans* YLM-B191-1 sobre diferentes substratos**

O efeito da especificidade da enzima pelo substrato foi testado com laminarina, curdlana, amido, manana de levedura, dextrana e celulose.

No estudo de especificidade enzimática, o sistema de reação foi constituído de 250  $\mu$ L de solução enzimática (0,041 unidade de atividade / mL) e 250  $\mu$ L de solução 1 % de substrato, em tampão 0,1 M acetato de sódio pH 5,5. As misturas de reação foram incubadas durante 30 minutos em banho de água termoestabilizado a 55°C e a atividade enzimática foi determinada de acordo com o item 3.1.4.1.1. A atividade da  $\beta$ -1,3-glucanase sobre os substratos foi considerada em relação a 100 % de hidrólise da laminarina.

### **3.5.10- O modo de ação da $\beta$ -1,3-glucanase de *Cellulomonas cellulans* YLM-B191-1 sobre a laminarina**

A mistura de 500  $\mu$ L de solução 1 % de laminarina em tampão 0,1 M pH 5,5 e 500  $\mu$ L de solução de  $\beta$ -1,3-glucanase purificada (0,31 U de atividade / mL) foi incubada a 55°C por 3 horas. Os açúcares redutores foram analisados através de cromatografia descendente em papel. Aliquotas de 10  $\mu$ L de amostra, incubadas em diferentes tempos de reação, foram aplicadas em papel Watman n<sup>o</sup> 1. Os sistemas de solventes (v:v) utilizados foram: solvente (I-) acetato de etila-propanol-água (6:3:1) e solvente (II-) acetato de etila-piridina-água (6:4:3), respectivamente. O tempo de desenvolvimento do cromatograma foi aproximadamente 20 horas para a fita de papel de 46 cm de comprimento. Para comparação foi utilizada solução de glicose; mistura composta de glicose (G<sub>1</sub>), maltose (G<sub>2</sub>), maltotriose (G<sub>3</sub>), maltotetraose (G<sub>4</sub>) e maltopentaose (G<sub>5</sub>); solução

de maltose comercial contendo glicose e maltotriose, e como padrão para laminarioligossacarídeos, foi utilizada solução 5 % de laminarina hidrolisada com 5 M do ácido trifluoroacético (TFA) em banho-maria à 100°C por 3 horas. Os açúcares redutores foram revelados com AgNO<sub>3</sub> e NaOH alcoólico (Trevelyan et al., 1954 e Scott & Schekman, 1980).

### **3.6- Susceptibilidade de algumas culturas microbianas às células de *Cellulomonas cellulans* YLM-B191-1 e às suas enzimas líticas**

A atividade de lise de *C. cellulans* YLM-B191-1 e a atividade lítica das preparações enzimáticas, foram testadas contra diferentes linhagens microbianas.

#### **3.6.1- Susceptibilidade das linhagens de leveduras e bactérias às células de *Cellulomonas cellulans* YLM-B191-1 em placas de Agar macio**

##### **3.6.1.1- Manutenção das culturas microbianas**

###### **3.6.1.1.1- Linhagens de leveduras**

Os meios de culturas utilizados na manutenção das linhagens, foram YEPD para a *Saccharomyces cerevisiae* 701 e *S. cerevisiae* ATCC 26602 e PDA (Difco) para *R. rubra* CCT 3895. As três linhagens foram incubadas por 24 horas a 30°C e conservadas em vaselina estéril a 5°C.

### **3.6.1.1.2- Linhagens de bactérias**

A linhagem de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 foi incubada a 37°C em meio inclinado de BHI (Difco); *Bacillus polymyxa* a 30°C, *Escherichia coli* ATCC 11229 e *Salmonella* sp a 37°C em meio inclinado de Agar nutriente (Difco); *Cellulomonas cellulans* YLM-B191-1 a 30°C em meio inclinado de TYMC (item 3.1.3). Todas as linhagens foram incubadas por 24 horas e reservadas em vaselina estéril a 5°C.

### **3.6.1.2- Cultivo dos microrganismos para o teste de susceptibilidade**

Nos testes de lise celular descritos nos itens 3.6.1.3 e 3.6.1.4, as culturas dos microrganismos crescidas em meio Agar de manutenção (item 3.6.1.1.1 e 3.6.1.1.2) foram usadas como substrato para o microrganismo lítico *C. cellulans* YLM-B191-1, em meio Agar macio contendo 5,74 g de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 1,15 g de NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,205 g de MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O e 15 g de Agar por litro, previamente esterilizada por 20 minutos a 121°C e 1 atm, e resfriado a 45°C.

#### **3.6.1.2.1- Suspensão de leveduras**

As linhagens de leveduras *S. cerevisiae* 701, *S. cerevisiae* ATCC 26602 e *R. rubra* CCT 3895, foram incubadas por 24 horas em frascos de Erlenmeyer de 50 mL, contendo 10 mL de meios de cultura em caldo, descrito no item 3.6.1.1.1. A massa celular obtida por centrifugação a 10.000 x g por 10 minutos a 4°C, após lavada três vezes com água deionizada, foi ressuspensa em água estéril. A contagem de células viáveis foi realizada em câmara de Neubauer (Collins & Lyne, 1989) sob a observação em microscópio óptico binocular Zeiss, após a coloração das células mortas com azul de metileno.

### **3.6.1.2.2- Suspensão de bactérias**

As linhagens de bactérias *S. aureus* ATCC 6538, *E. coli* ATCC 11229, *B. polymyxa*, *Salmonella* sp e *P. aeruginosa* foram incubadas por 24 horas em frascos Erlenmeyer de 50 mL contendo 10 mL dos meios caldos, descrito no item 3.6.1.1.2. A massa celular obtida por centrifugação a 10.000 x g por 10 minutos a 5°C, após lavada três vezes com água deionizada, foi ressuspensa em água estéril. As suspensões bacterianas foram preparadas de acordo com a turbidez usando-se, como comparação óptica, a concentração do sexto tubo da escala Mc Farland (BioMerieux).

### **3.6.1.3- Susceptibilidade das linhagens de leveduras às células de *Cellulomonas cellulans* YLM-B191-1 em placas de Agar macio**

Amostras de suspensão de células de *S. cerevisiae* 701, *S. cerevisiae* ATCC 26602 ou de *R. rubra* CCT 3895, obtidas como descrito no item 3.6.1.2.1, foram misturadas como fonte de nutrientes, para uma concentração final de 10<sup>10</sup> células viáveis de leveduras / mL, em 250 mL de meio Agar macio resfriado (YLM-Agar macio), como descrito no item 3.6.1.2. Uma alça da cultura de *Cellulomonas cellulans* YLM-B191-1 de 24 horas foi estriada sobre o Agar macio e o meio foi incubado por 3 a 10 dias a 30°C para a observação de halos de lise ao redor das estrias do microrganismo lítico.

### **3.6.1.4- Susceptibilidade das linhagens de bactérias às células de *Cellulomonas cellulans* YLM-B191-1 em placas de Agar macio**

As massas celulares de *S. aureus* ATCC 6538 em meio caldo BHI, *E. coli* ATCC 11229, *Salmonella* sp, *P. aeruginosa* e *B. polymyxa* em meio caldo nutriente, obtidas de acordo com o item 3.6.1.1.2, foram suspensas em 8 mL de água destilada estéril, para uma turbidez correspondendo ao sexto tubo da escala

Mc Farland (BioMerieux), como descrito no item 3.6.1.2.2 e misturadas, assepticamente, a 92 mL de meio Agar macio resfriado, descrito no item 3.6.1.2. A linhagem de *C. cellulans* YLM-B191-1, foi estriada sobre o Agar macio e incubada por 3 a 10 dias a 30°C, para a observação de halos de hidrólise ao redor das estrias do microrganismo lítico.

### **3.6.2- Digestão da parede celular de *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 26602 pelas enzimas líticas de *Cellulomonas cellulans* YLM-B191-1 e observação em microscópio eletrônico de varredura**

A atuação das enzimas líticas de *C. cellulans* YLM-B191-1 na superfície da parede celular de *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 26602 foi analisada por microscopia eletrônica de varredura (MEV).

#### **3.6.2.1- Cultivo dos microrganismos**

##### **3.6.2.1.1- Cultivo de *S. cerevisiae* ATCC 26602**

A linhagem de *S. cerevisiae* ATCC 26602 foi incubada por 20 horas em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL do meio YPD em estufa à 30°C. A massa celular obtida por centrifugação e lavada 3 vezes em tampão 0,2 M fosfato pH 7,5, a 10.000 x g por 10 minutos a 5°C foi ressuspensa em 10 mL do mesmo tampão e usada como substrato para a ação das preparações enzimáticas brutas, ação enzimática das soluções de  $\beta$ -1,3-glucanase purificadas e ação lítica da suspensão da linhagem de *C. cellulans* YLM-B191-1.

### **3.6.2.1.2- Cultivo de *C. cellulans* YLM-B191-1**

A linhagem de *C. cellulans* YLM-B191-1 foi incubada a 30°C em agitador rotatório a 200 rpm por 20 horas em frascos de Erlenmeyer de 200 mL contendo 50 mL do meio n° 1 (TYMC descrito no item 3.1.3). A massa celular obtida por centrifugação e lavada 3 vezes em tampão 0,2 M fosfato pH 7,5, por 10 minutos a 10.000 x g a 5°C foi ressuspensa em 5 mL de tampão e usada como suspensão de células líticas.

### **3.6.2.2- Observação em microscópio eletrônico da célula intacta de *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 26602**

Como referência, para a comparação com as amostras tratadas enzimaticamente, foi usada uma suspensão de células intactas de *S. cerevisiae* ATCC 26602 (Amostra A), em tampão 0,2 M fosfato pH 7,5, incubada por 20 horas à temperatura ambiente, sem tratamento enzimático. A massa celular foi coletada por centrifugação a 10.000 x g a 4°C e preparada como descrito no item 3.6.2.6, para a observação no microscópio eletrônico de varredura.

### **3.6.2.3- Observação em microscópio eletrônico da superfície da parede celular de *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 26602, após a ação da preparação bruta das enzimas líticas de *Cellulomonas cellulans* YLM-B191-1**

A mistura (amostra B) de 150 µL (0,23 U) da preparação bruta das enzimas líticas de *C. cellulans* YLM-B191-1, 200 µL da suspensão de células viáveis de *S. cerevisiae* ATCC 26602 preparadas como descrito no item 3.6.4.1, e 150 µL de

tampão 0,2 M fosfato pH 7,5, foi incubada por 2 horas a 55°C. A massa celular foi coletada por centrifugação a 10.000 x g a 4°C e preparada como descrito no item 3.6.2.6, para a observação no microscópio eletrônico de varredura.

#### **3.6.2.4- Observação em microscópio eletrônico da parede celular de *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 26602, após a ação da $\beta$ -1,3-glucanase purificada de *Cellulomonas cellulans* YLM-B191-1**

A mistura (amostra C) de 150  $\mu$ L (0,79 U) da  $\beta$ -1,3-glucanase purificada de *C. cellulans* YLM-B191-1, 200  $\mu$ L da suspensão de células viáveis de *S. cerevisiae* ATCC 26602 cultivadas como descrito no item 3.6.4.1, e 150  $\mu$ L de tampão 0,2 M fosfato pH 7,5, foi incubada por 2 horas a 55°C. A massa celular foi coletada por centrifugação a 10.000 x g a 4°C e preparada como descrito no item 3.6.2.6, para a observação no microscópio eletrônico de varredura.

#### **3.6.2.5- Ação do microrganismo lítico *Cellulomonas cellulans* YLM-B191-1 sobre a parede celular de *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 26602 e observação em microscópio eletrônico**

A mistura (amostra D) de 500  $\mu$ L de suspensão de *S. cerevisiae* ATCC 26602 e 500  $\mu$ L da suspensão de *C. cellulans* YLM-B191-1 em tampão 0,2 M fosfato pH 7,5, cultivadas como descrito no item 3.6.2.1.2, foi incubada a 30°C por 18 horas. Em seguida a massa celular foi coletada por centrifugação a 10.000 x g durante 10 minutos a 5°C e preparada para a análise em MEV, como descrito no item 3.6.2.6. Alíquotas de 20  $\mu$ L das suspensões de levedura foram coradas com a solução 0,1 % de azul de metileno, em câmara de Neubauer (Collins & Lyne,

1989) e observadas em microscópio óptico binocular Zein, para a verificação da viabilidade celular após o tempo de incubação.

### **3.6.2.6- Preparação das amostras de *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 26602 para a observação em microscópio eletrônico de varredura (MEV)**

As amostras A, B, C e D, foram filtradas em membrana microporosa (PVDF) de 0,45  $\mu\text{m}$  em suporte de filtro metálico de superfície Swinny 13 mm de diâmetro. Em seguida, as membranas foram tratadas com uma solução fixadora composta de 18,0 mL de tampão 0,2 M fosfato pH 7,5, 16,0 mL de água destilada, 2,0 mL de glutaraldeído (50 %) e 0,8 mL de ácido tânico, a 10<sup>o</sup>C por 1 hora. Em seguida, foram lavadas em tampão 0,1 M fosfato pH 7,5 por 10 minutos. Para pós-fixação, as amostras foram tratadas em 2,5 mL de solução 1 % de tetróxido de ósmio (OsO<sub>4</sub>) em tampão 0,2 M fosfato pH 7,5 por 1 hora. O excesso de OsO<sub>4</sub> foi retirado por lavagem das amostras em tampão 0,1 M fosfato pH 7,5 por 10 minutos. As membranas contendo as células túrgidas, foram desidratadas através de tratamentos sucessivos por 10 minutos, com soluções de etanol de concentrações crescentes de 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100 %. As membranas contendo as amostras foram fixadas em "stubs" (cilindros metálicos-porta-espécimens) de 1 cm de diâmetro, com fita adesiva de dupla face.

As membranas contendo as amostras A, B, C e D foram submetidas a um tratamento crítico de pressão e temperatura, no qual todo álcool contido nas amostras, foi substituído gradualmente por CO<sub>2</sub>. O ponto crítico das amostras foi realizado em evaporador do Carbono BAL-TEC- MED 020.

Para o aumento da condutibilidade elétrica, as amostras (A, B, C e D) foram transferidas para um evaporador Sputter Coater mod. SCD 050 (Fab. Balzers), e recobertas com um banho de átomos metálicos de ouro. Em cada uma das amostras foi aplicada uma corrente de 40 mA por 2 – 3 minutos, formando um

filme de ouro com espessura de aproximadamente 10 a 20 nm. Este material foi armazenado à vácuo em um dessecador para posterior análise em um microscópio eletrônico de varredura Jeol mod. JSM-T300. As condições de operação foram: voltagem de aceleração 10 e 15 kV e o aumento observado de 9.000 e 15.000 vezes (Kitajima, E.W., 1999).

## 4- RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1- Isolamento e seleção das bactérias que lisam a parede celular de leveduras

Para o isolamento de microrganismos que lisam leveduras (yeast lysing microorganism YLM), foram utilizadas amostras de lodo de usinas de cana-de-açúcar e células viáveis de *Saccharomyces cerevisiae* 701 como amostra de levedura. A grande quantidade de nutrientes, como fontes de carbono e nitrogênio, que existe nesses locais, favorece o crescimento de microrganismos. Muitas espécies de leveduras e bactérias podem ser encontradas na superfície da cana-de-açúcar, no solo das plantações e nos resíduos das fábricas. Além disso, o grande número de leveduras descartadas no final do processo fermentativo pode ser uma grande fonte de carbono e energia para muitos microrganismos capazes de lisar a parede dessas células.

As linhagens de *Cellulomonas* spp tem sido isoladas de uma grande variedade de fontes de carbonos, como por exemplo: de colmos de canas-de-açúcar em decomposição e de solo (Han & Srinivasan, 1968); de leite, provavelmente por meio de contaminação com o solo, e de canas-de-açúcar da Índia (Stoppok et al. 1982, citado por Stackebrandt & Keddie, 1989).

Com o conhecimento prévio das condições encontradas nesses locais, obteve-se sucesso no isolamento de microrganismos que lisam as células de *Saccharomyces cerevisiae* 701.

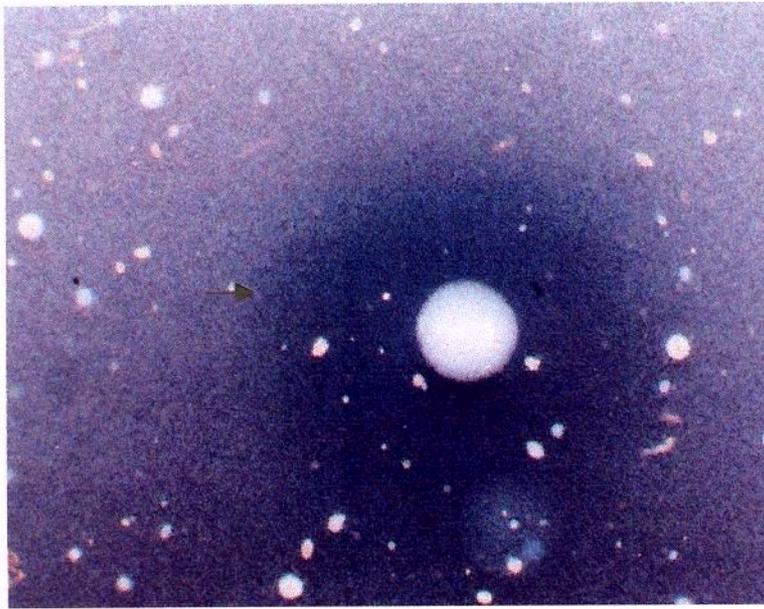
#### **4.1.1- Isolamento de microrganismos que lisam a parede celular de *Saccharomyces cerevisiae* 701**

O isolamento de microrganismos que lisam a parede celular de leveduras foi realizado de acordo com o método descrito no item 3.1.2, utilizando-se placas de meio de YLM-Agar macio contendo células viáveis de *Saccharomyces cerevisiae* 701.

As linhagens de bactérias líticas, capazes de utilizar células viáveis de leveduras, como fonte de nutrientes, foram identificadas pelos halos de lise, formados por uma zona clara e transparente ao redor das pequenas colônias crescidas no meio YLM-Agar macio contendo células de leveduras viáveis (item 3.1.2). As Figuras 1 e 2 ilustram os halos de lise formados ao redor das colônias das bactérias isoladas em placas de YLM-Agar macio, após 4 a 5 dias de incubação a 30°C. A capacidade de lisar a parede celular de células viáveis de *Saccharomyces cerevisiae* 701, foi confirmada por várias gerações das linhagens isoladas, em placas de Agar de mesma composição.

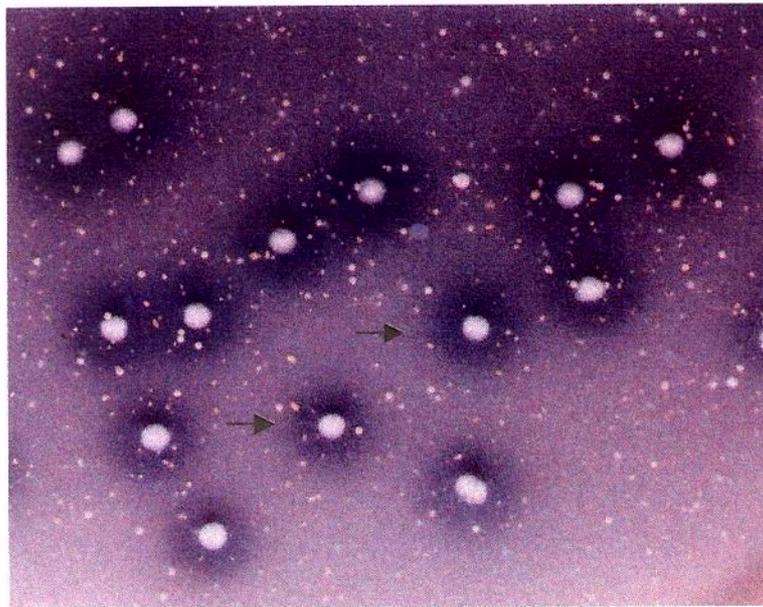
Entre as 410 cepas de bactérias isoladas das 20 amostras de lodo, 12 mostraram halos de lise em placas de YLM-Agar macio. Essas colônias foram repicadas em placas, em série, com meio de cultura da mesma composição, descrito no item 3.1.2, para a certificação do isolamento de cada uma delas, e foram mantidas em tubos inclinados de meio TYMC, descrito no item 3.1.3.

Nas placas de YLM-Agar macio contendo baixa densidade populacional de leveduras, foi observado maior susceptibilidade à lise pelas bactérias líticas, do que naquelas contendo alta densidade (maior que  $10^{10}$  células viáveis de leveduras). Estas mesmas considerações foram feitas por Scott & Schekman (1980).



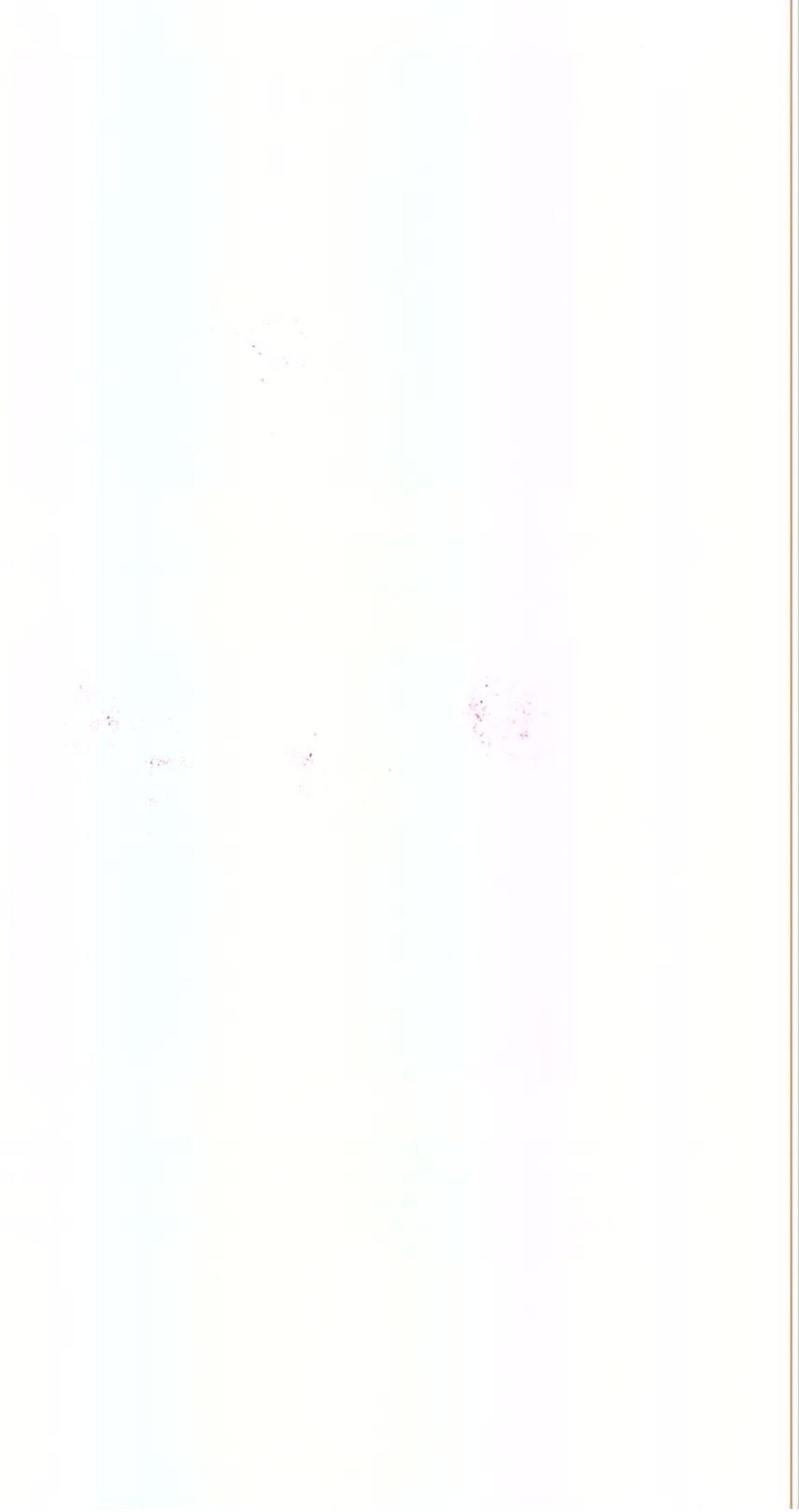
**Figura 1.** Detecção de bactérias que lisam leveduras.

→ Halo de lise ao redor da colônia isolada de bactérias em meio Agar macio contendo células viáveis de leveduras.



**Figura 2.** Placas de YLM-Agar macio contendo colônias isoladas de bactérias que lisam leveduras, pertencentes ao grupo dos actinomicetos e identificadas como *Celullomonas cellulans* YLM-B191.

→ Halo de lise ao redor da colônia isolada de bactérias em meio Agar macio contendo células viáveis de leveduras.



#### **4.1.2- Seleção preliminar de bactérias que lisam células de *Saccharomyces cerevisiae* 701**

Entre as 12 cepas isoladas, seis das que mostraram os maiores halos de lise nas placas de YLM-Agar macio, foram selecionadas de acordo com o item 3.1.3 para a caracterização morfológica e fisiológica e, para o estudo da produção de  $\beta$ -1,3-glucanases. Essas linhagens foram denominadas YLM-4, YLM-B21, YLM-B22, YLM-B26, YLM-B191, YLM-Fxx.

#### **4.1.3- Seleção dos microrganismos produtores de $\beta$ -1,3-glucanase**

A seleção do microrganismo produtor de  $\beta$ -1,3-glucanase, enzima que hidrolisa a camada de glucana da parede das células de *Saccharomyces cerevisiae* 701, foi realizada como descrito no item 3.1.4. A Tabela 1 ilustra a produção de  $\beta$ -1,3-glucanase pelas linhagens YLM-4, YLM-B21, YLM-B22, YLM-B26, YLM-B191, YLM-Fxx nos meios de cultura n<sup>o</sup> 1 e n<sup>o</sup> 2.

A linhagem YLM-B191 apresentou maior atividade de  $\beta$ -1,3-glucanase entre as linhagens testadas com 0,028 U / mL no meio de cultura n<sup>o</sup> 1 (TYMC) e 0,004 U / mL no meio de cultura n<sup>o</sup> 2.

A linhagem YLM-B191 foi também testada para a atividade de protease. Foram obtidos somente 0,007 U de protease / mL, após 24 horas de fermentação em meio n<sup>o</sup> 1.

No teste de atividade de aglutinação de leveduras pelas bactérias líticas realizado de acordo com o item 3.1.4.1.3, verificou-se reação de aglutinação, após 10 minutos da mistura das suspensões de células de bactérias líticas e células de leveduras. Observações em microscópio óptico revelaram que as bactérias líticas aderem-se a superfície das células de *S. cerevisiae* 701.

**Tabela 1.** Produção de  $\beta$ -1,3-glucoanase pelas linhagens YLM-4, YLM-B191, YLM-B1, YLM-B22, YLM-B26, YLM-Fxx.

Linhagem-YLM	Unidades de $\beta$ -1,3-glucoanase / mL	
	Meio n <sup>o</sup> 1- (TYMC) <sup>a</sup>	Meio n <sup>o</sup> 2- Kitamura <sup>b</sup>
4	0,012	0,0000
B-191	0,028	0,0004
B-1	0,015	0,0003
B-22	0,017	0,0000
B-26	0,010	0,0036
Fxx	0,026	0,0047

Uma unidade de  $\beta$ -1,3-glucoanase ativa foi definida como a quantidade de enzima que libera um  $\mu$ mol de açúcar redutor (como glicose) por minuto. <sup>a</sup> Meio n<sup>o</sup> 1 relatado por Shimoi et al. (1991); <sup>b</sup> Meio n<sup>o</sup> 2 modificado de Kitamura et al. (1974).

#### 4.2- Produção de enzimas líticas pela linhagem YLM-B191

##### 4.2.1- Produção de proteases pela linhagem YLM-B191 em meio de cultura n<sup>o</sup> 1, 3 e 4

A produção de protease pela linhagem YLM-B191, foi testada nos meios de cultura n<sup>o</sup> 1, 3 e 4, como descrito no item 3.1.4.1.2. No meio n<sup>o</sup> 1, foram encontrados 0,007 U de protease / mL, enquanto no meio n<sup>o</sup> 3 foi obtido 0,009 U e 0,013 U de protease / mL, após 24 e 48 horas a 30<sup>o</sup>C, respectivamente, e 0,007 U / mL no sobrenadante de 48 horas dialisado. No meio de cultura n<sup>o</sup> 4 foi obtido 0,0017 U e 0,002 U de enzima / mL, após 24 e 48 horas a 30<sup>o</sup>C, respectivamente. Funatsu et al. (1978) relataram que a preparação enzimática de zymolyase 5000, apresentou 13,7 U de protease / mL. Scott & Schekman (1980) obtiveram 3 U de protease / mL no meio de fermentação contendo 1,5 % de levedura autoclavada após 24 horas de incubação a 30<sup>o</sup>C, com a linhagem *Arthrobacter luteus*. Ventom & Asenjo (1990) obtiveram 40 U de protease / mL na fermentação contínua de *Oerskovia xanthineolytica*, em meio contendo 2 g / mL de glicose. Shimoi et al (1991) obtiveram 8,5 U de protease / mg de proteína na fermentação da linhagem *Rarobacter faecitabidus* em meio de cultura TYMC após 30 horas de incubação a 30<sup>o</sup>C.

#### **4.2.2- Produção de $\beta$ -1,3-glucanases pela linhagem YLM-B191 em frascos agitados, frascos aerados e em fermentador**

A produção de  $\beta$ -1,3-glucanase pela linhagem YLM-B191 a 30°C foi testada em fermentador, frascos aerados e em frascos agitados contendo meio n° 1, como descrito no item 3.2.2, sendo obtido 0,11; 0,13 e 0,14 U de  $\beta$ -1,3-glucanase / mL, respectivamente, após 24 horas de incubação. A melhor condição para a produção de  $\beta$ -1,3-glucanase ativa foi verificada quando a linhagem YLM-B191 foi incubada por 24 horas a 30°C, em frascos agitados (Tabela 2).

#### **4.2.3- Relação entre tempo de fermentação, alteração do pH do meio de cultura, crescimento do microrganismo e produção de $\beta$ -1,3-glucanase**

O estudo da relação entre tempo de fermentação, alteração do pH do meio de cultura, crescimento do microrganismo e produção da  $\beta$ -1,3-glucanase em meio n° 1 foi realizado como descrito no item 3.2.3. Verificou-se maior atividade da  $\beta$ -1,3-glucanase durante a fase exponencial do crescimento microbiano (Figura 3). Observou-se maior atividade da enzima no período de 12 a 20 horas de fermentação, sendo que após 36 horas de fermentação ocorreu diminuição na atividade da  $\beta$ -1,3-glucanase. Foi obtido 0,083; 0,085; 0,009 e 0,0033 U de  $\beta$ -1,3-glucanase / mL após 12, 20, 48 e 72 horas de fermentação, respectivamente.

**Tabela 2.** Produção de  $\beta$ -1,3-glucanase em meio TYMC pela linhagem YLM-B191, em diferentes condições de ensaio.

<b>Condições dos ensaios de produção enzimática</b>	<b>Atividade enzimática (U / mL)</b>
Fermentador Bioflo II	0,11
Erlenmeyer com injeção de ar	0,13
Frascos agitados em câmara climática	0,14

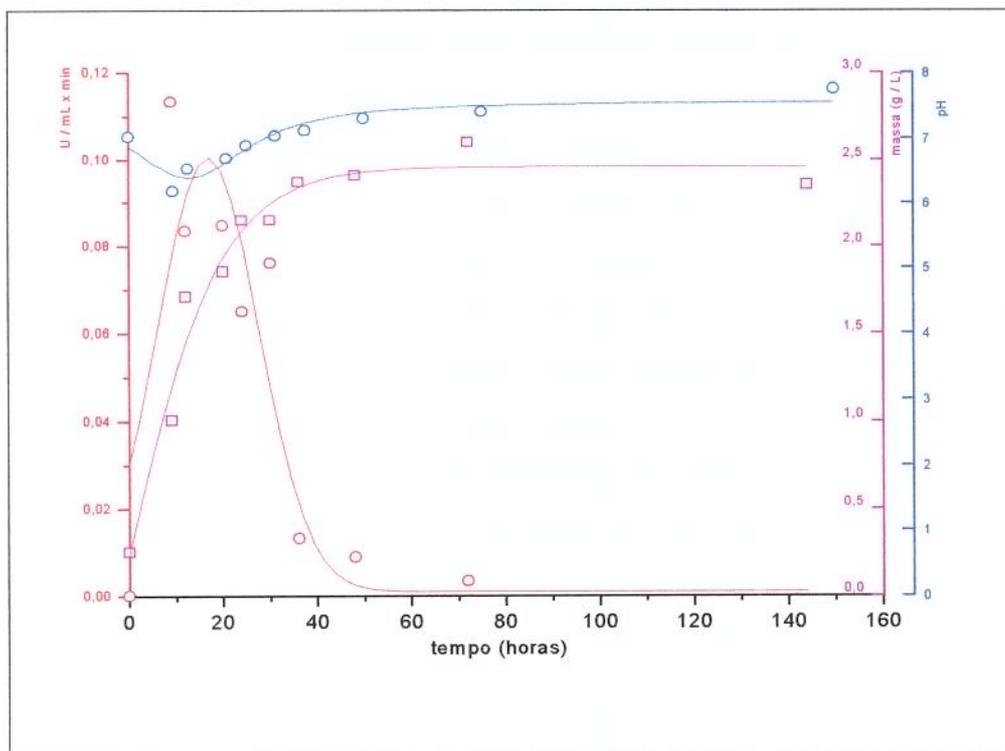
#### **4.2.4- Reisolamento da linhagem YLM-B191 e produção de $\beta$ -1,3-glucanase**

De acordo com os resultados obtidos para a atividade de  $\beta$ -1,3-glucanase nos itens 4.2.1, 4.2.2 e 4.2.3, a linhagem YLM-B191 foi submetida a reisolamento visando a seleção de colônias produtoras de  $\beta$ -1,3-glucanase com maior atividade enzimática. As colônias obtidas do reisolamento da linhagem YLM-B191, como descrito no item 3.2.4, foram testadas para a produção de  $\beta$ -1,3- glucanase ativa. A linhagem YLM-B191-1 reisolada foi inoculada no meio n<sup>o</sup> 1 e incubada por 24 horas a 30<sup>o</sup> C em frascos agitados a 200 rpm. No sobrenadante deste meio foi verificado 0,03 U de atividade de  $\beta$ -1,3- glucanase / mL.

#### **4.2.5- Produção de $\beta$ -1,3-glucanase pela linhagem YLM-B191-1 em diferentes meios de cultura**

A produção de  $\beta$ -1,3-glucanase pela linhagem YLM-B191-1 em diferentes meios de cultura foi testada como descrito no item 3.2.5. Os valores para a atividade enzimática obtidos nos experimentos, estão na Tabela 3. No sobrenadante dialisado do meio n<sup>o</sup> 3 (TYMC contendo 1 % de parede celular de

leveduras), incubado por 24 horas a 30°C, verificou-se 0,008 U de enzima / mL. No sobrenadante do meio de cultivo n° 4 (Sistrom 1958, modificado por Scott & Schekman, 1980) composto de sais, tiamina, biotina e 1,5 % de levedura liofilizada, após 24 e 48 horas de incubação (pH ~ 6,6), obtiveram 0,026 U e 0,03 U de  $\beta$ -1,3-glucanase / mL, respectivamente. No sobrenadante do meio n° 5, foram encontrados 0,001 U e 0,04 U de  $\beta$ -1,3-glucanase / mL após 24 e 48 horas de incubação, respectivamente. No meio de cultura n° 6 foi obtido 0,001 U após 24 horas e a atividade desapareceu completamente após 48 horas de incubação. No sobrenadante do meio n° 7, não foi detectada nenhuma atividade em 24 horas de incubação e 0,002 U de  $\beta$ -1,3-glucanase / mL, após 48 horas de incubação. No sobrenadante do meio n° 8, contendo sais e 8 % de levedura liofilizada foram obtidos 0,024 U e 0,05 U de  $\beta$ -1,3-glucanase / mL após 24 e 48 horas de incubação, respectivamente.



**Figura 3.** Relação entre o tempo de fermentação, crescimento do microrganismo, alteração do pH do meio e produção de  $\beta$ -1,3-glucanase.

□ massa celular; ○ pH; ○ Atividade de  $\beta$ -1,3-glucanase

Dos 6 meios usados para a produção de enzimas líticas pela linhagem de *C. cellulans* YLM-B191-1 em 24 horas de fermentação (Tabela 3); a composição do meio n<sup>o</sup> 4 mostrou algumas vantagens para a sua seleção: a)- O uso de levedura liofilizada, como indutor para a produção de enzimas líticas; b)- Obteve-se  $\beta$ -1,3-glucanase ativa e estável nos sobrenadantes em todas as fermentações.

Bacon et al. (1970) usaram parede celular de levedura de panificação *Saccharomyces cerevisiae* como indutor para a produção das enzimas líticas de *Cytophaga johnsonii*. O sobrenadante deste meio de cultura apresentou 0,16 U de  $\beta$ -1,3-glucanase / mL utilizando laminarina como substrato, sendo a mistura de reação incubada por uma hora a 30<sup>o</sup>C. Scott & Schekman (1980) estudaram o efeito de várias fontes de carbono para a indução das enzimas líticas, e verificaram que nos meios contendo leveduras autoclavadas (1,5 %), a indução dessas enzimas ocorreu entre 12 e 24 horas, e na presença de glucana de levedura (0,4 %) a indução ocorreu somente após 36 horas de incubação; com 0,4% de glicose não obtiveram resultados satisfatórios. Andrews & Asenjo (1987) em fermentação contínua de *Oerskovia xanthineolytica*, contendo glucana de levedura (0,2 ou 0,05 %) como indutor e glicose (0,2 ou 0,8 %), obtiveram 0,18 a 0,37 U de glucanase ativa / mL. Neste caso, a cultura com alta concentração de indutor e baixa concentração de glicose apresentou alta atividade específica de  $\beta$ -1,3-glucanase (660 U / g de células). Foi obtido o dobro da atividade proteolítica em meio de cultivo contendo alta concentração de glicose e pequena concentração de indutor. Essa atividade específica de glucanase indicou que sua síntese é controlada pela indução e repressão catabólica. Os autores relataram que a glucana de levedura foi um potente indutor, sendo que a glucanase foi produzida com apenas 5 horas de incubação e a atividade lítica foi 10 vezes maior do que no meio com parede de leveduras.

### 4.3- Identificação das linhagens produtoras de enzimas líticas

As seis linhagens isoladas neste trabalho exibiram muitas semelhanças morfológicas com bactérias pertencentes ao taxa corineforme, a qual inclui os gêneros *Cellulomonas*, *Arthrobacter* e *Oerskovia* da família Actinomycetaceae.

#### 4.3.1- Características morfológicas e fisiológicas das linhagens que lisam células viáveis de *Saccharomyces cerevisiae* 701

As características morfológicas e fisiológicas dos isolados YLM-4, YLM-B21, YLM-B22, YLM-B26, YLM-B191-1, YLM-Fxx que lisam a parede celular de leveduras, ilustradas na Tabela 4, foram determinadas como descrito no item 3.3.1. Na observação em microscópio óptico, as linhagens mostraram coloração Gram positiva descorada e exibiram uma grande variedade morfológica durante o ciclo celular. Foi observada a ocorrência de bastonetes irregulares, finos de comprimentos variados ou curtos e longos, com ramificações primárias formando micélios aéreos. Observou-se ainda que esses micélios se fragmentavam originando células em bastonetes (Figura 4), que muitas vezes se arranjavam em forma de V. Após 24 horas de incubação, as culturas normalmente formavam muitos bastonetes curtos e uma pequena proporção de células cocóides.

Rogosa et al. (1974) relataram que algumas características morfológicas do grupo de bactérias corineformes mostram formação de bastonetes irregulares e em formas de V, não formaram esporos, e foram Gram positivas.

Nas observações da borda das colônias em microscópio óptico verificou-se que a linhagem YLM-4 forma ramificações longas, enquanto que as demais linhagens formam ramificações mais curtas. A linhagem de referência, *Oerskovia*

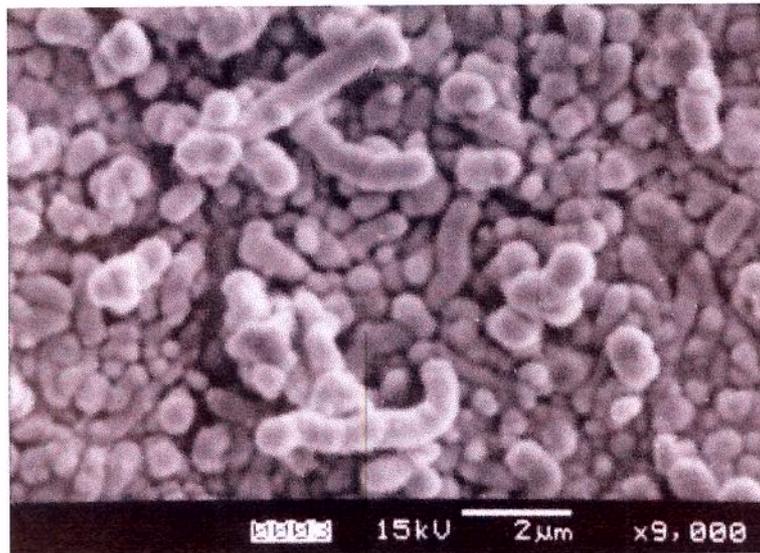
*turbata* 3029 apresentou-se bastante ramificada, enquanto a outra cepa de referência, *Arthrobacter oxydans* 3027 apresentou ramificações menores.

**Tabela 3.** Produção de  $\beta$ -1,3-glucanase, pela linhagem YLM-B191, em diferentes meios de cultura.

Meios	Autores	Atividade enzimática (U / mL)		pH do meio		
		24 horas	48 horas	0 h	24 h	48 h
3	Shimoi et al. (1991) modificado	0,008	-	-	-	-
4	Scott & Schekman (1980)	0,026	0,03	6,6	6,2	6,6
5	Kitamura (1982)	0,001	0,04	9,5	6,9	-
6	Andrews & Asenjo (1987)	0,001	0,0	5,6	4,5	4,7
7	Saeki et al. (1994)	0	0,02	4,9	5,2	4,5
8	Doi et al. (1973)	0,024	0,05	7,2	5,6	-

As colônias dos isolados YLM-B1, YLM-B22, YLM-B26, YLM-Fxx e YLM-B191-1 mostraram coloração branca creme, opaca, apresentaram formas, normalmente, circulares e convexas, com diâmetro de aproximadamente 1 a 2 mm, em meio Agar-nutriente (NA), Agar-dextrose-batata (PDA), Agar macio (contendo células viáveis de leveduras), TYM (contendo ou não parede celular de leveduras), ou TYMC. As colônias das linhagens YLM-4 e YLM-B191-1, em meio BHI, mostraram-se de coloração amarela e após uma semana de incubação as culturas velhas tornaram-se amarelas mais fortes. As colônias da linhagem YLM-B191-1, mostraram-se, as vezes, de coloração creme-amarela em meio TYM. Somente a linhagem YLM-4, mostrou coloração amarela em meio NA, TYMC, TYM, mas em meio PDA as colônias mostraram coloração branca-creme e cresceram muito lentamente.

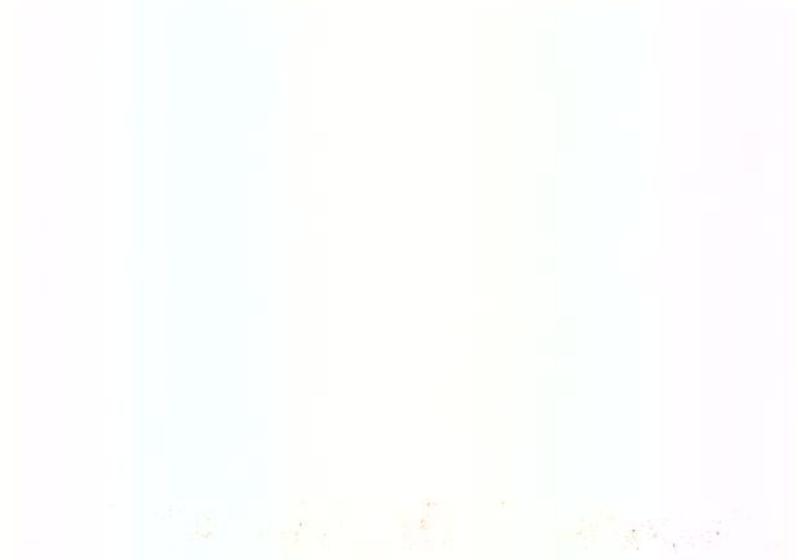
A linhagem YLM-B191-1 apresentou colônias brancas-cremes de bordas lisas em Agar macio contendo sais e células viáveis de leveduras, colônias amarela-creme pálida, em meio de cultura TYM (Figura 5), e amarela em meio BHI. Stackebrandt & Prauser (1991) e Collins & Cummins (1989) observaram que



**Figura 4.** Características morfológicas da bactéria YLM-B191-1, que lisa leveduras, observada através de micrografia eletrônica, após 18 horas de crescimento em TYMC-Agar macio a 30°C.



**Figura 5.** Reisolamento de bactérias que lisam leveduras.



as colônias das bactérias corineformes normalmente são pigmentadas quando crescidas em meio complexo. No meio YLM-Agar macio contendo sais e células viáveis de leveduras, observou-se sob microscópio a formação de ramificações muito longas na borda da colônia YLM-B191-1, e no meio BHI as ramificações apresentaram-se menores.

Nenhum dos isolados (YLM-4, YLM-B1, YLM-B22, YLM-B26, YLM-Fxx e YLM-B191-1) necessitou da adição no meio de cultivo de compostos heme, como a catalase, para o crescimento aeróbio e anaeróbio facultativo. Todos os isolados mantidos em meio Agar inclinado sem catalase, não mostraram modificações fenotípicas e bioquímicas. Os testes de anaerobiose com Anaeromate revelaram que todas as linhagens (Tabela 4) cresceram bem aerobiamente e tiveram um crescimento reduzido em condições anaeróbias, sendo que o crescimento da YLM-4, foi mais prejudicado.

Um novo gênero de bactéria corineforme denominado *Rarobacter* descrito por Yamamoto et al. (1988) produtora de enzimas líticas, necessitou de compostos heme como a catalase e vitaminas para o crescimento aeróbio.

O gênero *Cellulomonas* tem crescimento moderado sobre o meio agarizado de extrato de levedura ou sobre o meio peptona em pH neutro; as colônias são amarelo-opacas, normalmente convexas (Stackebrandt & Keddie, 1989). Este gênero tem metabolismo primariamente respiratório, mas também fermentam, pois a maioria das cepas produz ácido a partir de glicose e podem viver aerobiamente ou anaerobiamente; elas são catalase-positivas, hidrolisam amido e gelatina; podem reduzir nitrato a nitrito e possuem 71 a 76 mol % de C+G no DNA, mas requerem biotina e tiamina. As cepas de todas as espécies cresceram a 10°C; algumas a 5°C e, a temperatura máxima para o crescimento celular é na faixa de 36 a 43°C. Todas as linhagens cresceram bem aerobiamente e a maioria teve um crescimento extremamente reduzido em condições anaeróbias (Keddie et al., 1989).

Todos os isolados (Tabela 4) mostraram motilidade em meio líquido e sólido, cresceram pouco quando incubadas a 5°C e 40°C e não sobreviveram quando incubadas por 24 horas em temperatura igual ou acima de 50°C enquanto a faixa ótima de temperatura para o crescimento foi 25 a 30°C. Estas linhagens cresceram bem na faixa de pH 5,0 a 10,5 mas não cresceram em pH abaixo de 5,0 ou acima de 10,5. Elas puderam crescer na presença de 3 a 5 % de NaCl.

As seis linhagens (Tabela 4) hidrolisaram o amido e reduziram o nitrato a nitrito. Elas produziram ácidos a partir de celobiose, trealose e glicose, mas não produziram ácidos a partir de inositol e melibiose. As cepas YLM-4 e YLM-B1 produziram ácido a partir de xilose, mas não de rafinose. Somente as cepas YLM-B22 e YLM-B26 produziram ácido a partir de sorbose. A produção de gás, a partir destas fontes de carboidratos, não foi detectada em nenhum dos isolados. Todas essas linhagens foram oxidase, urease e indol negativas. Todas puderam hidrolisar caseína mas somente as cepas YLM-4 e YLM-B1 foram capazes de hidrolisar gelatina.

#### **4.3.2- Características fisiológicas e quimiotaxonômicas das linhagens YLM-4 e YLM-B191-1**

##### **4.3.2.1- Teste de assimilação de diferentes compostos orgânicos pelas linhagens YLM-4 e YLM-B191-1**

O teste de assimilação de diferentes compostos orgânicos pelas linhagens YLM-4 e YLM-B191-1 foi realizado como descrito no item 3.3.2. Das 6 linhagens somente duas, a YLM-4 e a YLM-B191-1, foram selecionadas para a identificação por comparação com a base de dados descrita por Lee et al., (1997). As cepas YLM-B191-1 e YLM-4 tiveram capacidade de assimilar somente 17 e 22 fontes de carbono, respectivamente (Tabela 5). A linhagem YLM-B191-1, foi capaz de

**Tabela 4.** Características morfológicas e fisiológicas das linhagens de bactérias YLM-4, YLM-B1, YLM-B22, YLM-B26, YLM-B191 e YLM-Fxx, que lisam leveduras.

TESTES	Linhagens YLM-						
	4	B1	B22	B26	B191	Fxx	
Forma	Hifas ramificadas/ bastonetes amarela	Hifas ramificadas/ bastonetes Branca- creme	Hifas ramificadas/ bastonetes Branca- creme	Hifas ramificadas/ bastonetes Branca- creme	Hifas ramificadas/ bastonetes Branca- creme	Hifas ramificadas/ bastonete Branca- creme	
Cor da colônia							
Coloração de Gram	+	+	+	+	+	+	
Crescimento anaeróbico	+	+	+	+	+	+	
Motilidade	+	+	+	+	+	+	
Catalase	+	+	+	+	+	+	
Redução de Nitrato	+	+	+	+	+	+	
Benzidina	+	+	+	+	+	+	
NaCl 3%	+	+	+	+	+	+	
NaCl 5%	+	+	+	+	+	+	
Cresc. 25° C	+	+	+	+	+	+	
Cresc. 30° C	+	+	+	+	+	+	
Cresc. 37° C	+	+	+	+	+	+	
Cresc. 40° C	+	+	+	+	+	+	
Cresc. 50° C	-	-	-	-	-	-	
Cresc. pH 4,5	-	-	-	-	-	-	
Cresc. pH 5,5	+	+	+	+	+	+	
Cresc. pH 7,5	+	+	+	+	+	+	
Cresc. pH 9,5	+	+	+	+	+	+	
Cresc. pH 10,5	+	+	+	+	+	+	
Hidrólise da Caseína	+	+	+	+	+	+	
Hidrólise do amido	+	+	+	+	+	+	
Hidrólise da gelatina	+	+	-	-	-	-	
Oxidase	-	+	+	+	+	+	
VM *	+	-	-	-	-	-	
Indol	-	-	-	-	-	-	
VP **	-	-	-	-	-	-	
Urease	-	-	-	-	-	-	
		<b>Fermentação de carboidratos</b>					
Celobiose	+	+	+	+	+	+	
Trealose	+	+	+	+	+	+	
Glicose	+	+	+	+	+	+	
Rafinose	-	-	+	+	+	+	
Sorbose	-	-	+	+	-	-	
Inositol	-	-	-	-	-	-	
Melibiose	-	-	-	-	-	-	
Xilose	+	+	-	-	-	-	

\* Vermelho de metila ; \*\* Voges Proskauer

assimilar as seguintes fontes de carbono:  $\beta$ -ciclodextrina, dextrina, glicogênio, amidalina, celobiose, D-galactose, gentiobiose, ácido D-glucônico,  $\alpha$ -D-glicose, maltose, maltotriose, D-manose, salicina, turanose, D-xilose, metil-piruvato e glicerol. Dos 95 substratos testados como fontes de carbonos, nenhuma das duas linhagens foi capaz de oxidar inulina, N-acetil-D-manosamina, m-inositol, lactulose, D-melezitose,  $\alpha$ -metil-D-galactosideo, D-rafinose, sedoheptulosana, estaquiase, D-tagatose, xilitol, ácido  $\alpha$ -hidroxibutírico, ácido  $\beta$ -hidroxibutírico e ácido  $\gamma$ -hidroxibutírico, ácido acético, *p*-hidroxifenil, ácido  $\alpha$ -ceto-glutâmico, ácido  $\alpha$ -ceto-valênico, lactamida, ácido D-lático-metil-ester, ácido D-málico, ácido L-málico, ácido propiônico, ácido succinâmico, alaninamida, D-alanina, L-alanina, L-alanil-glicina, L-asparagina, ácido L-glutâmico, ácido L-piroglutâmico, putrescina, 2,3-butanediol, glicose-1-fosfato.

Owens & Keddie (não publicado) verificaram que duas linhagens de *Cellulomonas* assimilaram 16 e 28 dos 180 compostos orgânicos testados. Estas espécies utilizaram como única ou como principal fonte de carbono e energia os seguintes compostos: celulose, amido, D-xilose, L-arabinose, D-glicose, D-manose, D-galactose, celobiose, maltose, trealose e sacarose. Enquanto, Keddie et al. (1966) relataram que a biotina e a tiamina são as únicas fontes orgânicas exógenas necessárias como fator de crescimento para as linhagens das 5 espécies reconhecidas do gênero *Cellulomonas* (citado por Stackebrandt & Keddie, 1989).

#### **4.3.2.2- Conteúdo de citosina-guanina (C + G) das linhagens YLM-4 e YLM-B191-1**

O teste de conteúdo de citosina-guanina (G + C) das linhagens YLM-4 e YLM-B191-1, foi realizado como descrito no item 3.3.2.

**Tabela 5.** Assimilação de diferentes fontes de carbono pelas linhagens YLM-4 e YLM-B191.

Substratos - Fontes de carbono	24h de incubação	
	YLM- 4	YLM- B191
α-ciclodextrina	-	v
β-ciclodextrina	v	+
Dextrina	+	+
Glicogênio	+	+
Inulina	-	-
Manana	v	v
Tween 40	v	v
Tween 80	+	-
N-acetil-D-glucosamina	-	v
N-acetil-D-manosamina	-	-
Amidalina	+	+
L-arabinose	+	v
D-arabitol	-	v
Arbutina	+	v
Celobiose	+	+
D-frutose	+	v
L-frutose	v	v
D-galactose	+	+
Ácido D-galacturônico	v	v
Gentiobiose	+	+
Ácido D-glucônico	v	+
α-D-glicose	+	+
m-inositol	-	-
α-D-lactose	v	v
Lactulose	-	-
Maltose	+	+
Maltotriose	+	+
D-manitol	v	v
D-manose	+	+
D-melezitose	-	-
D-melibiose	v	v
α-metil-D-galactosídeo	-	-
β-metil-D-galactosídeo	-	v
3-metil-glicose	v	v
α-metil-D-glicosídeo	v	v
β-metil-D-glicosídeo	v	-
α-metil-D-manosídeo	-	v
Palatinose	+	v
D-psicose	v	-
D-rafinose	-	-
L-ranose	v	v
D-ribose	v	v
Salicina	+	+
Sedoheptulosana	-	-
D-sorbitol	-	v
Estaquiase	-	-
D-tagatose	-	-

Continua na próxima página

Substratos - Fontes de carbono	24h de incubação	
	YLM- 4	YLM- B191
D-trealose	v	v
Turanose	+	+
Xilitol	-	-
D-xilose	+	+
Ácido acético	v	-
Ácido $\alpha$ -hidróxibutírico	-	-
Ácido $\beta$ -hidróxibutírico	-	-
Ácido $\gamma$ -hidróxibutírico	-	-
Ácido acético $\rho$ -hidroxifenil	-	-
Ácido $\alpha$ -ceto-glutâmico	-	-
Ácido $\alpha$ -ceto-valenico	-	-
Lactamida	-	-
Ácido metil-éster-D-lático	-	-
Ácido L-lático	v	-
Ácido D-málico	-	-
Ácido L-málico	-	-
Metil-piruvato	+	+
Mono-metil-succinato	v	v
Ácido propiônico	-	-
Ácido pirúvico	v	v
Ácido succinâmico	-	-
Ácido succínico	v	v
Ácido N-acetil L-glutâmico	v	v
Alaninamida	-	-
D-alanina	-	-
L-alanina	-	-
L-alanil-glicina	-	-
L-asparagina	-	-
Ácido glutâmico	-	-
Ácido glicil-L-glutâmico	v	-
Ácido L-piroglutâmico	-	-
L-serina	v	v
Putrescina	-	-
2,3-butanediol	-	-
Glicerol	+	+
Adenosina	v	-
2'-deoxi-adenosina	+	v
Inosina	+	v
Timidina	v	v
Uridina	v	v
Adenosina 5'-monofosfato	v	v
Timidina 5'-monofosfato	v	-
Uridina 5'-monofosfato	v	-
Frutose-6-fosfato	v	v
Glicose-1-fosfato	-	-
Glicose-6-fosfato	v	v
D-L- $\alpha$ -glicerol fosfato	v	-

v= variável

O conteúdo de bases G + C do DNA determinado nas linhagens YLM-B191-1 e 4, respectivamente, foi 71,3 e 72,8 mol % (Tabela 6). As espécies de *Cellulomonas* e *Oerskovia*, apresentam um conteúdo de G + C do DNA, respectivamente, de 71 a 76 mol % e 70,5 a 75 mol % (Stackebrandt & Keddie, 1989 e Lechevalier & Lechevalier, 1970). Yamamoto et al. (1988) estudando bactérias que lisaram a parede celular de leveduras, denominadas *Rarobacter faecitabidus* e *R. incanus* e isoladas de solo, de flores, de frutos, água e madeiras, coletados de diferentes regiões do Brasil, obtiveram conteúdo de guanina e citosina de 65,7 a 66,1 mol %, respectivamente.

#### 4.3.2.3- Composição dos ácidos graxos da parede celular das linhagens YLM-4 e YLM-B191-1

A composição de ácidos graxos das linhagens selecionadas, foi determinado como descrito no item 3.3.2. A Tabela 7, ilustra a composição dos ácidos graxos celulares das linhagens YLM-4 e YLM-B191-1. Na análise da parede celular das linhagens YLM-4 e YLM-B191-1, verificou-se 50,3 % e 56,6 % do ácido graxo anteiso-C<sub>15</sub>, respectivamente.

**Tabela 6.** Conteúdo de guanina e citosina do DNA (mol %) das linhagens YLM-4 e YLM-B191.

Linhagens	Conteúdo G+C
<i>Oerskovia</i> *	71-76
<i>Cellulomonas</i> **	72,7- 74,8
YLM-4	72,8
YLM-B191-1	71,3

\* e \*\* foram utilizadas como linhagens de referência

Yamamoto et al. (1988) relataram que o ácido 12-metiltetradecanóico (anteiso-C<sub>15</sub>) compõe quase 50 % dos ácidos graxos da parede celular do novo gênero *Rarobacter* gen. nov. Além disso, para a identificação, os autores consideraram a composição dos peptídeoglicanos encontrados nas parede celular desses isolados, comparando-os com aqueles encontrados em outros gêneros, como descritos na literatura.

#### **4.3.2.4- Coeficiente de similaridade entre as linhagens de referência e as linhagens YLM-4 e YLM-B191-1**

O coeficiente de similaridade entre as linhagens de referência e as linhagens YLM-4 e YLM-B191-1 foi calculado como descrito no item 3.3.2. A Tabela 8 exibe o coeficiente de similaridade das linhagens YLM-4 e YLM-B191-1, em relação as linhagens de referência – *Cellulomonas cartae* e *Oerskovia xanthineolytica*, respectivamente. Os resultados indicam um coeficiente de similaridade de 0,826 para a cepa YLM-4, em relação a *O. xanthineolytica*, enquanto mostra 0,81 para a cepa YLM-B191-1 com a *C. cartae*.

Ainda que as características dos gêneros *Oerskovia*, *Brevibacterium* e *Cellulomonas* não estejam bem estabelecidas por apresentarem muita dificuldade na identificação, o fato é que a *Oerskovia* é um dos microrganismos mais importantes para a produção de enzimas líticas de leveduras. As  $\beta$ -1,3-glucanases mostram um papel muito importante na lise de células de leveduras, visto que o componente mais abundante da parede celular de leveduras é a  $\beta$ -1,3- glucana (Saeki et al., 1994).

**Tabela 7.** Composição dos ácidos graxos celulares das linhagens YLM-4 e YLM-B191-1.

Composição dos ácidos graxos celulares (%)		
Ácidos graxos saturados <sup>a</sup>	YLM-4	YLM-B191-1
14:0 iso	0,92	0,71
14:0	5,53	6,6
15:0 iso	10,29	12,44
15:0 anteíso	56,62	50,27
15:0	2,11	3,06
16:0 iso	4,53	3,91
16:0	9,56	11,46
17:0 iso	0,66	0,94
17:0		0,59
17:0 anteíso	9,77	10,02

<sup>a</sup> As abreviações para os ácidos graxos foram as seguintes: 14:0 iso = ácido tetradecanóico com ramificação iso; 14:0 = ácido tetradecanóico; 15:0 iso = ácido pentadecanóico com ramificação; 15:0 = ácido pentadecanóico; 16:0 iso = ácido hexadecanóico com ramificação; 16:0 = ácido hexadecanóico; 17:0 iso = ácido heptadecanóico com ramificação; 17:0 = ácido heptadecanóico; 17:0 anteíso = ácido heptadecanóico com ramificação anteíso.

**Tabela 8.** Coeficientes de similaridade das cepas YLM-4 e YLM-B191-1 com as linhagens de referência dos gêneros *Oerskovia*, *Cellulomonas* e *Brevibacterium*.

Linhagens de referência	Microrganismos que lisam leveduras	
	YLM-4	YLM-B191-1
<i>Oerskovia</i> *	0,826	0,733
<i>O. xanthineolytica</i> *	0,826	0,733
<i>Brevibacterium</i>	0,807	0,415
<i>B. lyticum</i>	0,807	0,415
<i>Cellulomonas</i> **	0,760	0,810
<i>C. cartae</i>	0,554	0,810
<i>C. turbata</i> **	0,760	0,776
<i>C. biazotea</i>	0,387	0,506

\* *Oerskovia*, *O. xanthineolytica* = *Cellulomonas* (?); \*\* *Cellulomonas*, *C. turbata* = *O. turbata* (?)

Algumas diferenças entre cepas de mesma característica fenotípica são consideradas aceitáveis como, por exemplo na degradação da celulose, na utilização de certos compostos ou na motilidade (Stackebrandt et al., 1982). A *Oerskovia* é um actinomiceto, com muitas características de bactérias com forma

de bastonetes e sua classificação apresenta muitas dificuldades e incertezas. Kaneko et al. (1969), identificaram uma linhagem como *Arthrobacter luteus*, que posteriormente foi considerada sinônimo de *Oerskovia xanthineolytica* por Lechevalier & Lechevalier (1970). Stackebrandt & Keddie (1989) relataram que as linhagens de *Cellulomonas cartae* (Stackebrandt & Kandler, 1980), *Brevibacterium fermentans* (Chatelain & Second, 1966), *B. lyticum* (Takayama et al., 1960) e *Oerskovia xanthineolytica* (Lechevalier & Lechevalier, 1970) foram reavaliadas e consideradas como sinônimos subjetivos de *C. cellulans* por Stackebrandt et al. (1982).

Com base nos estudos de reassociação, sustentados pelas análises do RNAr 16S em *Oerskovia* e *Cellulomonas*, Stackebrandt et al. (1982) propuseram que as espécies de *Oerskovia* fossem transferidas para a espécie *Cellulomonas cartae*. Os estudos de homologia do DNA, considerando-se as análises comparativas do RNAr 16S (Stackebrandt & Woese, 1981) e as relações genéticas encontradas entre as espécies, mostraram uma alta similaridade de características químicas, como por exemplo, o tipo de peptídeoglicano (Stackebrandt et al., 1982) a composição de menaquinonas (Collins et al., 1979) e de ácidos graxos (Minnikin et al., 1979) as quais conduziram ao propósito de combinar *Nocardia cellulans*, *Brevibacterium fermentans*, *B. lyticum*, *O. xanthineolytica* e *Cellulomonas cartae* em uma única espécie com o nome de *C. cartae* (Stackebrandt et al. (1982). Porém, um pseudônimo específico *cellulans*, descrito anteriormente por Metcalf & Brown (1957) antecederia ao pseudônimo *cartae*, relatado por Stackebrandt & Kandler (1980) e dessa maneira, o nome legítimo para esta espécie seria *Cellulomonas cellulans* e não *C. cartae* (citado por Stackebrandt & Keddie, 1989).

Lee et al. (1996) relataram que a análise da composição dos ácidos graxos, importantes constituintes da estrutura do envelope celular, por cromatografia líquida-gasosa, é uma importante ferramenta para a classificação e identificação de bactérias. Para tanto, os resultados dos testes podem ser comparados, inicialmente, a uma compreensiva base de dados. Lee et al. (1997) consideraram

esta nova técnica de identificação, muito mais segura e muito menos trabalhosa que as ferramentas usadas para a identificação clássica.

As linhagens YLM-B191-1 e YLM-4 isoladas do lodo de fábricas de açúcar e álcool no Brasil, selecionadas para a produção de enzimas líticas, foram analisadas quanto a sua habilidade de oxidar diferentes fontes de carbono que incluem carboidratos, ácidos carboxílicos e aminoácidos, através da análise da composição de ácidos graxos celulares e da análise do conteúdo de C + G do DNA, realizados pela equipe do Prof. Dr. Young Ha Park (Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, KRIBB, P.O., Korea), e comparando-as com os dados de referência, as mesmas foram identificadas como *Cellulomonas cartae* e *Oerskovia xanthineolytica*, respectivamente. Portanto, após analisar as considerações feita por Stackebrandt et al. (1982) ambas as linhagens YLM-B191-1 e YLM-4 foram, finalmente, identificadas como *Cellulomonas cellulans*.

#### **4.4- Produção e purificação da $\beta$ -1,3-glucanase de *Cellulomonas cellulans* YLM-B191-1**

A produção e purificação da  $\beta$ -1,3-glucanase de *Cellulomonas cellulans* YLM-B191-1, foi realizada como descrito no item 3.4.

##### **4.4.1- Produção da $\beta$ -1,3-glucanase de *Cellulomonas cellulans* YLM-B191-1**

A  $\beta$ -1,3-glucanase ativa de *C. cellulans* YLM-B191-1, foi produzida como descrito no item 3.4.2. O sobrenadante do meio n<sup>o</sup> 4, obtido após incubação do inóculo por 24 horas a 30<sup>o</sup>C, apresentou 0,088 U de  $\beta$ -1,3- glucanase ativa / mL e

uma baixa atividade de protease (0,0086 U de atividade / mL). O volume de 4000 mL de sobrenadante, resultou em 92 g de pó liofilizado, contendo 352 U totais de  $\beta$ -1,3-glucanase, o qual foi usado como preparação enzimática bruta de  $\beta$ -1,3-glucanase.

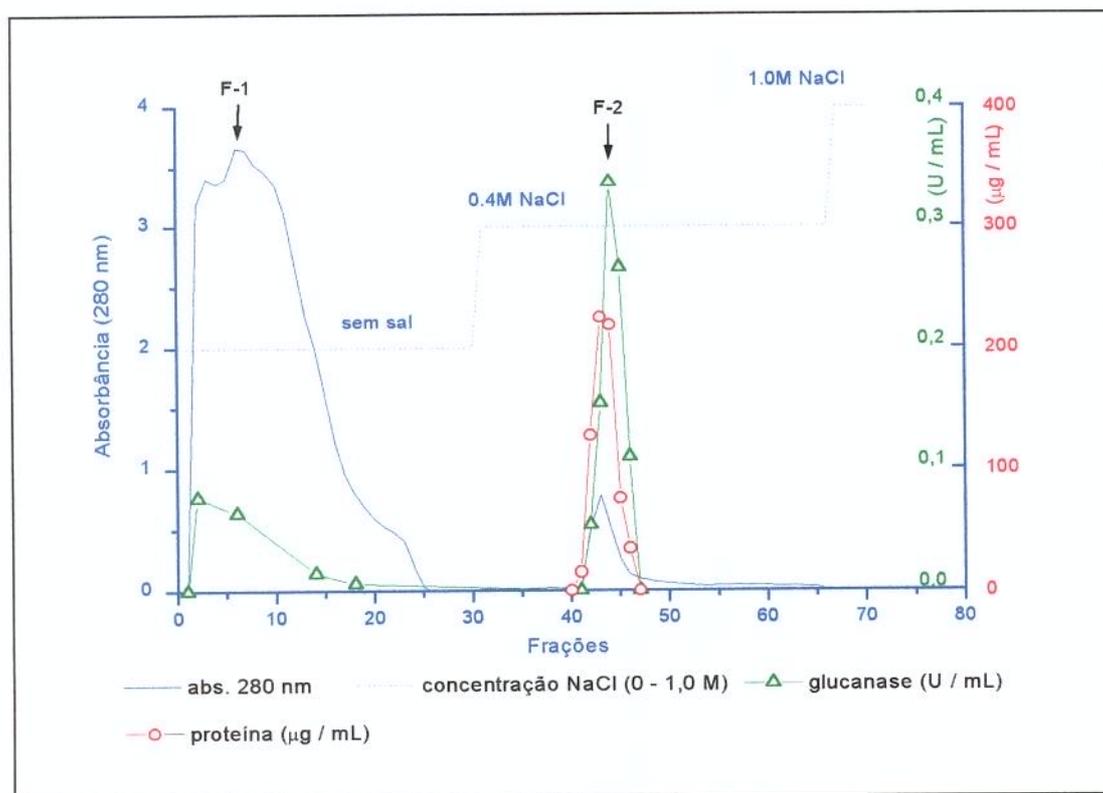
A preparação enzimática bruta liofilizada das enzimas líticas, mostrou 61,5 % de atividade residual após 30 horas a temperatura ambiente. Quando acondicionadas a baixas temperaturas (congelador) mantiveram-se estáveis por períodos maiores que 6 meses.

#### **4.4.2- Purificação da $\beta$ -1,3-glucanase de *Cellulomonas cellulans* YLM-B191-1**

A purificação da  $\beta$ -1,3-glucanase de *C. cellulans* YLM-B191-1 foi realizada de acordo com o item 3.4.3.2. Uma amostra de 10 g de preparação enzimática bruta em tampão 0,01 M acetato de sódio pH 4,5 foi ultrafiltrada em membrana de retenção (30 kDa), para a eliminação de compostos de baixo peso molecular, como descrito no item 3.4.3.1. A porção de peso molecular menor que 30 kDa, que resultou em 0,44 g de proteína, mostrou 4,47 % da atividade de  $\beta$ -1,3-glucanase ativa encontrada na preparação bruta liofilizada. A preparação enzimática bruta concentrada aplicada na coluna cromatográfica de CM-Sephrose CL-6B (descrito no item 3.4.3.2), foi eluída em 2 picos principais, F-1 e F-2. As frações do primeiro pico (F-1), foram eluídas com tampão de equilíbrio e estavam associadas a impurezas de coloração marrom-amarelada. Essas frações mostraram baixa atividade específica de  $\beta$ -1,3-glucanase (0,055 U de glucanase / mL de proteína) e, portanto, não foram estudadas. As frações do segundo pico (F-2), eluídas da coluna com tampão 0,01 M acetato de sódio contendo 0,4 M NaCl pH 4,5 (Figura 6), mostraram atividade específica de  $\beta$ -1,3-glucanase, aproximadamente, 53 vezes maior do que em F-1. As frações contidas

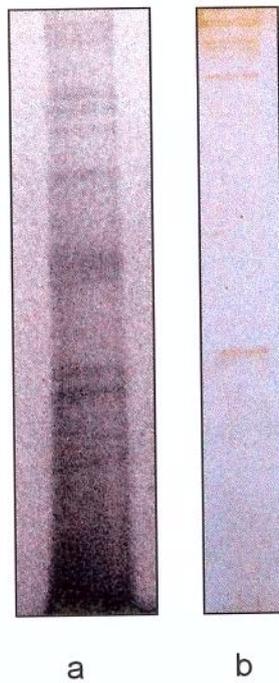
nos tubos recolhidos do pico F-2, foram dialisadas separadamente, e usadas como solução purificada de  $\beta$ -1,3-glucanase, para a caracterização enzimática a fração com maior atividade específica foi liofilizada e reservada para a determinação do peso molecular por eletroforese em SDS-gel poliacrilamida (12%). Para a realização dos ensaios de caracterização enzimática, foi necessário a obtenção de grandes quantidades da solução enzimática purificada, tendo-se a necessidade de repetir diversas vezes o processo de purificação.

A Figura 7 ilustra a eletroforese da preparação enzimática bruta liofilizada de *C. cellulans* YLM-B191-1 em gel gradiente SDS-PAGE (5 % a 15 %) e SDS-PAGE (12 %) e mostra as proteínas encontradas na amostra. A Figura 8 ilustra a eletroforese da  $\beta$ -1,3-glucanase purificada em gel SDS-PAGE, indicando a presença de uma única banda de proteína.

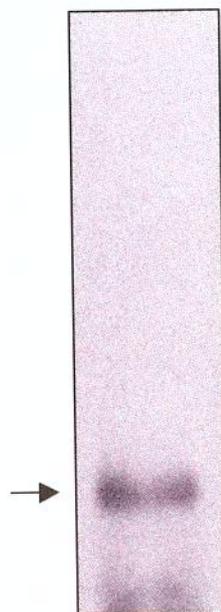


**Figura 6.** Fracionamento da preparação bruta de  $\beta$ -1,3-glucanase em coluna de CM-Sepharose CL-6B.





**Figura 7.** Eletroforese das preparações brutas de  $\beta$ -1,3-glucanase.  
a) preparação bruta aplicada em gel de gradiente – SDS-PAGE (5 a 15 %);  
b) preparação bruta aplicada em gel SDS-poliacrilamida (12 %).  
As setas indicam as bandas de proteínas



**Figura 8.** Eletroforese da  $\beta$ -1,3-glucanase purificada em gel SDS-poliacrilamida (12 %).  
→ Indica a  $\beta$ -1,3-glucanase purificada



A Tabela 9 ilustra as etapas de purificação da  $\beta$ -1,3-glucanase de *C. cellulans* YLM-B191-1. A  $\beta$ -1,3-glucanase das frações do pico F-2 (tubos 40, 41, 42, 43, 45, 46 e 47) foi purificada 32,2 vezes sendo obtido 18,9 % de recuperação. A fração do tubo 44 com maior atividade específica de  $\beta$ -1,3-glucanase foi purificada 78,2 vezes. Shimoi et al. (1991), purificaram 75 vezes a  $\beta$ -1,3-glucanase de *Rarobacter faecitabidus* através de cromatografia em coluna aniônica e obtiveram 10 % de recuperação da enzima.

As frações do pico F-2 (40, 41, 42, 43, 44, 45, 46 e 47) mostraram atividade específica de 2,9 U de  $\beta$ -1,3-glucanase / mg de proteína e nenhuma atividade de protease foi encontrada nestas frações.

**Tabela 9.** Purificação da  $\beta$ -1,3-glucanase de *C. cellulans* YLM-B191-1.

Etapas da purificação	Quantidade	Proteína Total (mg)	Atividade Total (unidades de $\beta$ -1,3-glucanase)	Atividade Específica (unidades/mg de proteína)	Purificação	Recuperação (%)
Liofilizado	10 g	533,2	47,9	0,09	1,00	100
Concentrado da ultrafiltração	3,6 mL	86,17	35,08	0,407	4,52	73,23
Alíquota do concentrado da ultrafiltração	3,0 mL	71,8	29,22	0,407	4,52	61
Coluna de CM-Sepharose (Frações do 1 <sup>o</sup> pico)		22,1	1,22	0,055	0,61	2,55
Coluna de CM-Sepharose (Frações do 2 <sup>o</sup> pico)		3,12	9,07	2,907	32,3	18,93
Coluna de CM-Sepharose (tubo 44)		0,376	2,647	7,04	78,2	5,53

Doi et al. (1973) verificaram que as soluções enzimáticas purificadas de *Arthrobacter citreus* mostraram atividade específica de 5,5 U / mg de proteína. VENTOM & ASENJO (1981) verificaram que após a purificação da  $\beta$ -1,3-glucanase de *Oerskovia xanthineolytica* LL-G109, a atividade específica foi de 11,1 U /mg.

Para Scott & Schekman (1980) a preparação enzimática bruta de *Oerskovia xanthineolytica*, continha diferentes  $\beta$ -1,3-glucanases, ou outras enzimas responsáveis pela lise, enquanto Ventom & Asenjo (1981) encontraram glucanases e proteases.

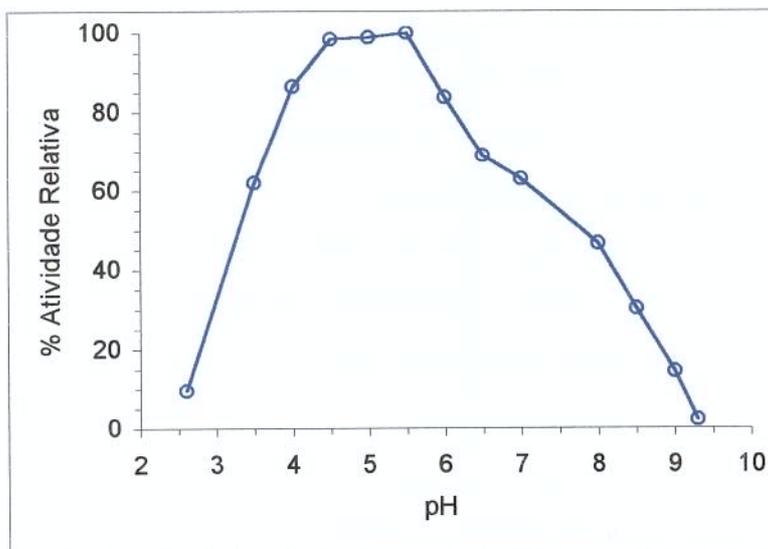
No estudo da purificação da  $\beta$ -1,3-glucanase de *C. cellulans* YLM-B191-1, em colunas de filtração em BioGel ou de troca iônica, como: CM- e DEAE-Celulose, DEAE-Toyopearl, mesmo em diferentes condições, como: molaridade e pH da solução tampão (6,5 a 7,5) ou concentrações crescentes de NaCl não foi obtido recuperação de atividade  $\beta$ -1,3-glucanase. Scott & Schekman (1980) relataram que tentativas anteriores de purificação das enzimas líticas por filtração em gel de Sephadex resultaram aparentemente numa perda total da atividade lítica e o uso de gradiente de sal para a eluição da proteína não contribuiu para melhorar sua purificação.

#### **4.5- Determinação das características da $\beta$ -1,3-glucanase lítica de *Cellulomonas cellulans* YLM-B191-1**

O estudo das características bioquímicas da  $\beta$ -1,3-glucanase de *C. cellulans* YLM-B191-1 foi realizado como descrito no item 3.5.

#### 4.5.1- Efeito do pH na atividade enzimática da $\beta$ -1,3-glucanase de *Cellulomonas cellulans* YLM-B191-1

No estudo preliminar da  $\beta$ -1,3-glucanase da preparação bruta de *C. cellulans* YLM-B191-1, obtida como descrito no item 3.5.1, foram realizados os testes de caracterização de acordo com item 3.5. A preparação bruta de  $\beta$ -1,3-glucanase mostrou atividade máxima em pH 4,5 a 5,5 a 55°C e mostrou-se estável por 4 horas em pH 5,5 a 45°C, e por 1 hora em pH 6,5 a 55°C. A  $\beta$ -1,3-glucanase purificada de *C. cellulans* YLM-B191-1 apresentou atividade ótima na faixa de pH 4,5 a 5,5 a 55°C (Figura 9).



**Figura 9.** Efeito do pH na atividade da  $\beta$ -1,3-glucanase purificada.

A  $\beta$ -1,3-glucanase purificada de *C. cellulans* YLM-B191-1 apresentou atividade ótima em faixa de pH similar as  $\beta$ -1,3-glucanases purificadas de *Rhizopus chinensis* R-69 (Yamamoto & Nagasaki, 1975b), de *T. longibrachiatum*

(Tangarone et al., 1989), de *T. harzianum* (Noronha & Ulhoa, 1996; Thrane et al., 1997); e de *Rarobacter faecitabidus* (Shimoi et al., 1991), do cogumelo *Agaricus bisporus* H 25 (Galan et al., 1999) e do fungo *Chaetomium indicum* (Burtseva et al., 2000) e da enzima lítica de *Streptomyces* sp P-51 (Yoshimoto et al., 1975).

Kitamura & Yamamoto (1972) e Kitamura et al. (1974) verificaram que o complexo de enzimas líticas denominado zymolyase, obtido do caldo enzimático produzido por *Arthrobacter luteus* apresentou atividade ótima de lise de células viáveis de leveduras em pH 7,5 a 35°C. Essa linhagem de *Arthrobacter luteus* produtora de zymolyase foi reclassificada como *Oerskovia xanthineolytica* (Scott & Schekman, 1980). A  $\beta$ -1,3-glucanase de *Arthrobacter* sp descrita por Doi et al. (1973) apresentou atividade ótima na faixa de pH 5,5 a 6,5.

As  $\beta$ -1,3-glucanases de linhagens de *Oerskovia* sp apresentaram atividade ótima na faixa de 5,0 a 8,0, dependendo do substrato utilizado. Obata et al. (1976), descreveram três  $\beta$ -1,3-glucanases de *Oerskovia* sp CK; a enzima F-0 mostrou atividade ótima em pH 6,5 a 50 - 55°C e a enzima F-2 mostrou atividade ótima em pH 7,5 e 35°C. Scott & Schekman (1980) relataram que a  $\beta$ -1,3-glucanase de *Oerskovia xanthineolytica* mostrou atividade ótima no pH 6,0, enquanto que a  $\beta$ -1,3-glucanase de *Oerskovia xanthineolytica* LL-G109 estudada por Ventom & Asenjo (1991) apresentou atividade ótima em pH 6,0 e 8,0, utilizando-se os substratos laminarina e glucana de levedura, respectivamente. Saeki et al. (1994) verificaram que a atividade máxima da  $\beta$ -1,3-glucanase purificada de *Oerskovia xanthineolytica* TK-1 sobre a glucana de levedura, curdlana e laminarina foi em pH 5,5; 5,0 a 6,5 e 7,5, respectivamente.

A endo  $\beta$ -1,3-glucanase de *Flavobacterium dormitator* var. *glucanoliticae* apresentou atividade em pH 6,0 (NAGASAKI et al., 1976).

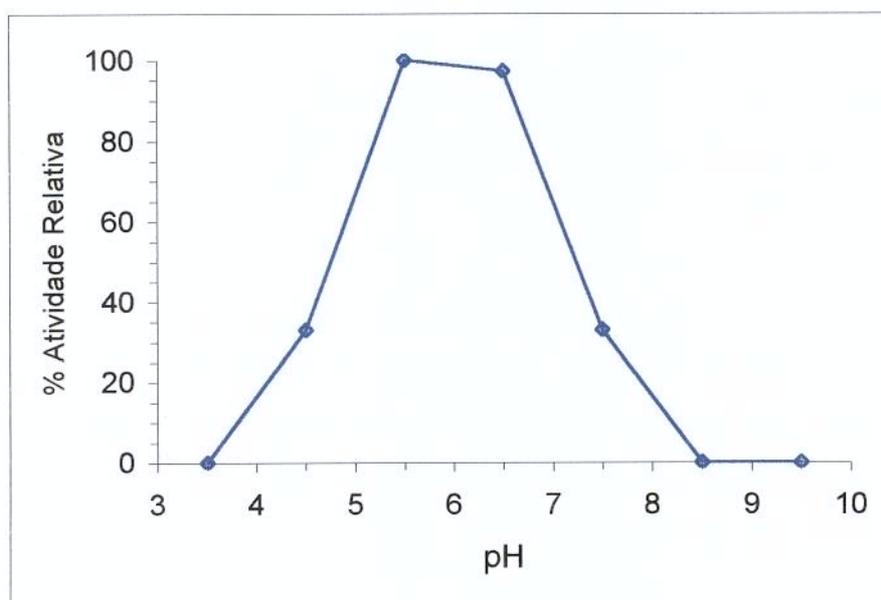
A endo- $\beta$ -1,3-D-glucanase de centeio germinado mostrou atividade ótima em pH 5,0 (Ballance et al., 1978). As  $\beta$ -1,3-D-glucanases de vegetais tem sido relacionadas a atividade antimicrobiana e antifúngica (Hilton & Pressey, 1980;

Mauch et al., 1988; Chambers et al., 1993; Mishra et al., 1997; Glandorf et al., 1997; Zhang & Yuen, 2000).

Bielecki et al. (1989) relataram que as quatro  $\beta$ -1,3-glucanases (GI, GII, GIV e GVIII) de *Streptomyces* sp.1228 apresentaram pH ótimo ao redor de 5,5 e 6,0.

#### 4.5.2- Efeito do pH na estabilidade enzimática da $\beta$ -1,3-glucanase de *Cellulomonas cellulans* YLM-B191-1

O estudo do efeito do pH na estabilidade da  $\beta$ -1,3-glucanase purificada foi realizado como descrito no item 3.5.2. Nos estudos preliminares, a preparação bruta de  $\beta$ -1,3-glucanase mostrou-se estável em pH 4,5 a 45°C por 4 horas e em pH 6,5 a 55°C por 1 hora de tratamento. A  $\beta$ -1,3-glucanase purificada de *Cellulomonas cellulans* YLM-B191-1, mostrou-se completamente estável na faixa de pH entre 5,5 e 6,5 após 30 minutos a 55°C (Figura 10).



**Figura 10.** Efeito do pH na estabilidade da  $\beta$ -1,3-glucanase purificada.

A  $\beta$ -1,3-glucanase de *Arthrobacter citreus* estudada por Doi et al. (1973) mostrou-se estável na faixa de pH 3,0 a 8,0 após 30 minutos de tratamento a 30°C. Kitamura et al. (1974) verificaram que a zymolyase de *Arthrobacter luteus* mostrou-se estável numa faixa de pH entre 5,0 e 11,0 para a lise de células viáveis de leveduras, porém perdeu completamente a estabilidade quando incubada a 60°C por 5 minutos. A  $\beta$ -1,3-glucanase de *Oerskovia xanthineolytica* TK-1 mostrou-se estável por 30 minutos a 30°C, na faixa de pH 5,0 a 8,0 (Saeki et al., 1994).

A  $\beta$ -1,3-glucanase purificada de *Rhizopus chinensis* R-69 revelou-se estável na faixa de pH 4,0 a 8,0 (Yamamoto & Nagasaki, 1975b).

Yoshimoto et al. (1975) verificaram que a enzima lítica de *Streptomyces* sp P-51, que lisa leveduras, apresentou-se estável na faixa de pH entre 4,0 a 8,0 por 20 minutos a 70°C.

A endo  $\beta$ -1,3-glucanase de *Flavobacterium dormitator* var. *glucanoliticae* mostrou-se estável numa faixa de pH entre 6,0 a 9,0 quando aquecida a 50°C por 10 minutos (Nagasaki et al, 1976).

Tangarone et al. (1989) verificaram que a endo- $\beta$ -1,3-D-glucanase de *Trichoderma longibrachiatum* mostrou estabilidade na ausência de substrato na faixa de pH 4,9 a 9,3.

Pitson et al. (1995) obtiveram três glucanases (GN) de fungo filamentoso *Acremonium persicinum*, sendo que 80 % da atividade máxima da GN-I foi observada entre pH 5,0 a 7,5, e entre 4,5 a 7,0 para GN-II e GN-III, enquanto as três GN mostraram-se completamente estáveis (mais de 90 %) na faixa de pH entre 4,5 a 10,5 após 24 horas a 4°C.

Burtseva et al. (2000) verificaram que a  $\beta$ -1,3-glucanase do fungo *Chaetomium indicum* foi estável na faixa de pH 4,5 a 7,5.

#### 4.5.3- Efeito da temperatura na atividade enzimática da $\beta$ -1,3-glucanase de *Cellulomonas cellulans* YLM-B191-1

O estudo do efeito da temperatura na atividade da  $\beta$ -1,3-glucanase purificada de *C. cellulans* YLM-B191-1 foi realizado como descrito no item 3.5.3. A preparação bruta da  $\beta$ -1,3-glucanase de *C. cellulans* YLM-B191-1 na presença de laminarina, mostrou atividade máxima na entre 55 e 57°C, quando incubada por 30 minutos em pH 5,5 e a  $\beta$ -1,3-glucanase purificada mostrou atividade enzimática máxima na faixa temperatura entre 50 a 60°C em pH 5,5 (Figura 11).

A endo- $\beta$ -1,3-glucanase de *Flavobacterium dormitator* var. *glucanoliticae* estudada por Nagasaki et al. (1976) apresentou atividade ótima a 50°C.

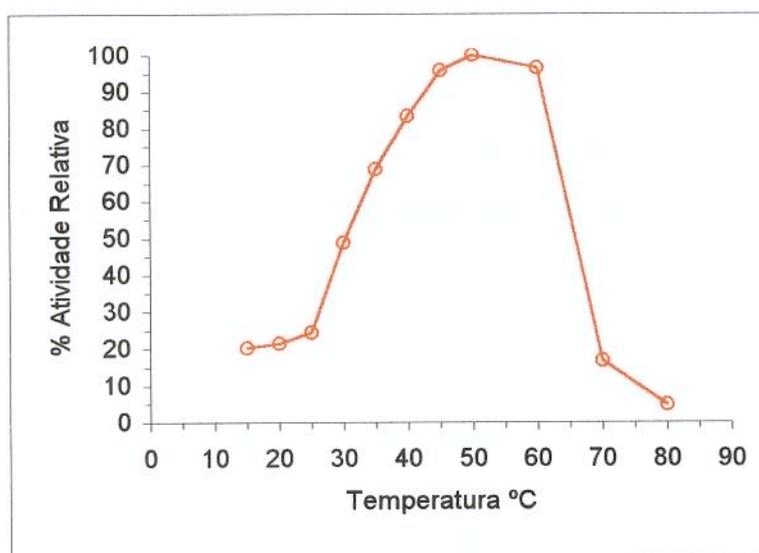


Figura 11. Efeito da temperatura na atividade da  $\beta$ -1,3-glucanase purificada.

As  $\beta$ -1,3-glucanases de *Trichoderma longibrachiatum* (Tangarone et al. 1989) *T. harzianum* (Noronha & Ulhoa 1996) e *T. harzianum* (Thrane et al. 1997) apresentaram atividade ótima a 55°C, 45 a 50°C e 40°C, respectivamente.

Bielecki et al. (1989) verificaram que a  $\beta$ -1,3-glucanase de *Streptomyces sp* apresentou temperatura ótima entre 50 a 55°C.

As  $\beta$ -1,3-glucanases de *Oerskovia xanthineolytica* TK-1 (Saeki et al., 1994) e *Oerskovia xanthineolytica* LL-G109 (Parrado et al. 1996) mostraram atividade ótima a 60°C e a 65°C, respectivamente.

As três glucanases, GN-I, GN-II e GN-III do fungo filamentoso *Acremonium persicinum* mostraram temperatura ótima a 65, a 55 e a 60°C, respectivamente (Pitson et al., 1995).

Galan et al. (1999) purificaram uma endo- $\beta$ -1,3-glucanase de *Agaricus bisporus* H-25, que mostrou temperatura ótima de 45°C, com laminarina como substrato.

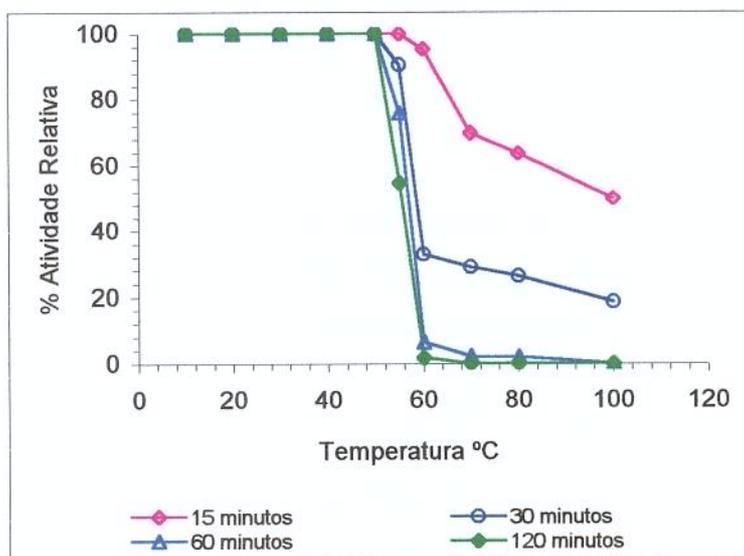
Burtseva et al. (2000) verificaram que o fungo *Chaetomium indicum* produziu uma  $\beta$ -1,3-glucanase com temperatura ótima de atividade a 60°C.

#### **4.5.4- Estabilidade térmica da $\beta$ -1,3-glucanase de *Cellulomonas cellulans* YLM-B191-1**

O estudo do efeito da temperatura na estabilidade da  $\beta$ -1,3-glucanase purificada de *C. cellulans* YLM-B191-1 foi realizado como descrito no item 3.5.4. Na ausência de substrato a preparação bruta dessa enzima perdeu completamente a sua atividade, quando incubada por 1 hora em temperaturas

superiores a 60°C, enquanto reteve 61,5 % de sua atividade após 30 horas a temperatura ambiente e as amostras liofilizadas foram completamente estáveis por 6 meses a -20°C. A  $\beta$ -1,3-glucanase purificada mostrou-se completamente estável após 120 minutos de tratamento térmico a 50°C ou após 15 minutos a 55°C. A enzima purificada reteve 90 % e 55 % da sua atividade residual quando incubada a 55°C por 30 minutos e por 120 minutos, respectivamente, enquanto a 60°C por 30 minutos, a enzima reteve apenas 25 % da atividade residual (Figura 12). A enzima foi inativada após 60 minutos de tratamento térmico a 60°C.

As  $\beta$ -1,3-glucanases de *Arthrobacter* sp, estudadas por Doi et al. (1973) foram estáveis em ampla faixa de pH, mas perdiam rapidamente a atividade em temperaturas superiores a 60°C. O complexo enzimático denominado zymolyase contendo várias  $\beta$ -1,3-glucanases de *Arthrobacter luteus* perdeu 71 % da sua atividade quando incubada a 50°C por 5 minutos (Kitamura et al., 1974).



**Figura 12.** Termoestabilidade da  $\beta$ -1,3-glucanase purificada.

Saeki et al. (1994) verificaram que a  $\beta$ -1,3-glucanase de *Oerskovia xanthineolytica* TK-1 após a incubação a 60°C em pH 5,5, na ausência do substrato, reteve somente 5 % de sua atividade inicial, enquanto que a  $\beta$ -1,3-glucanase de *Oerskovia xanthineolytica* LL-G109 (Parrado et al., 1996) foi estável por 30 minutos até 55°C e a atividade diminuiu rapidamente em temperaturas superiores a 75°C.

Nagasaki et al. (1976) verificaram que a endo- $\beta$ -1,3-glucanase de *Flavobacterium dormitator* var. *glucanoliticae* mostrou-se instável, sendo inativada após 10 minutos a 45°C e, em temperaturas superiores a 60°C a enzima perdeu imediatamente a sua atividade.

A endo- $\beta$ -1,3-D-glucanase de centeio germinado, mostrou-se estável a 45°C (Ballance et al., 1978).

A  $\beta$ -1,3-glucanase do fungo *Trichoderma longibrachiatum*, estudada por Tangarone et al. (1989) foi inativada em temperaturas superiores a 50°C, enquanto que a atividade da  $\beta$ -1,3-glucanase de *T. harzianum*. (Thrane et al., 1997), diminuiu drasticamente, quando incubada a temperaturas superiores a 35°C.

Bielecki et al. (1989) verificaram que as duas  $\beta$ -1,3-glucanases (GI e GVIII) de *Streptomyces* sp 1228, foram termoestáveis e após 15 minutos a 80°C, perderam menos de 50 % da atividade inicial.

Shimoi et al. (1991) purificou uma  $\beta$ -1,3-glucanase de *Rarobacter faecitabidus*, que foi completamente inativada após 15 minutos de incubação a 60°C.

Pitson et al. (1995) verificaram que a  $\beta$ -1,3-glucanase I (GN-I) de *Acremonium persicinum* mostrou-se aparentemente estável (atividade maior que 90 %) após 30 minutos de incubação a 55°C e, reteve menos de 50 % da

atividade após incubação por 15 minutos a 60°C. As  $\beta$ -1,3-glucanases II e III (GN-II e III) mostraram 80 a 90 % da sua atividade a 50°C, mas foram completamente inativadas após 30 minutos a 55°C. A estabilidade térmica parece aumentar na presença do substrato. A preparação bruta destas enzimas mostraram mais de 95 % da atividade após 5 semanas a 30°C em pH 5,5. As  $\beta$ -1,3-glucanases I, II e III (GN-I, GN-II e GN-III) purificadas foram bem estáveis, sem perdas na atividade por 4 semanas a 4°C. Em algumas amostras armazenadas a -20°C foram detectadas perdas na atividade, enquanto em outras não, indicando que este não é um método efetivo para a estocagem destas enzimas. As preparações brutas e purificadas de GNs de *A. persicinum* quando estocadas a -80°C em tampão 0,05 M acetato pH 5,0 por 12 meses, não apresentaram perdas apreciáveis na atividade enzimática.

Burtseva et al. (2000) verificaram que a  $\beta$ -1,3-glucanase do fungo *Chaetomium indicum* mostrou-se estável em temperaturas inferiores a 50°C.

#### **4.5.5- Monitoramento das etapas de purificação da $\beta$ -1,3-glucanase por eletroforese em gel poliacrilamida**

##### **4.5.5.1- Eletroforese da $\beta$ -1,3-glucanase bruta em gel gradiente SDS-poliacrilamida (5 a 15 %)**

A amostra bruta liofilizada foi preparada de acordo com o item 3.5.5.1, e aplicada no gel gradiente SDS-PAGE (5 a 15%) descrito no item 3.5.5.2. Após a revelação do gel com AgNO<sub>3</sub> e formaldeído, foram evidenciados diversas bandas de proteínas, com diferentes pesos moleculares (Figura 7a).

#### **4.5.5.2- Eletroforese da $\beta$ -1,3-glucanase em gel SDS-poliacrilamida (12 %)**

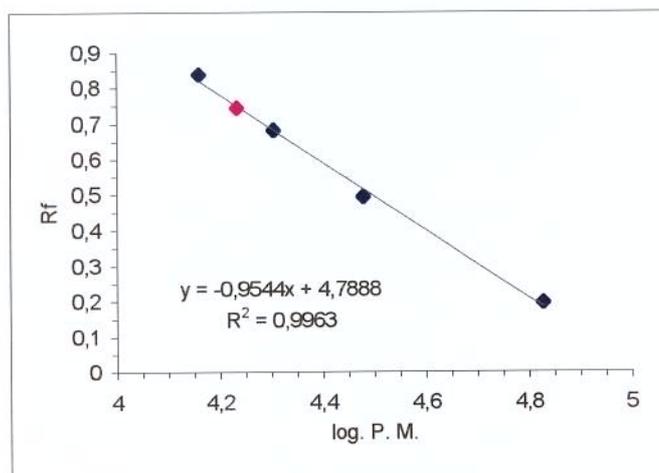
A amostra de  $\beta$ -1,3-glucanase purificada e preparada de acordo com o item 3.5.5.1, foi aplicada no topo do gel SDS-PAGE (12 %) descrito no item 3.5.5.3. As Figuras 8 e 14 mostram a revelação de apenas uma única banda de proteína presente na solução enzimática purificada, sugerindo ser uma proteína simples.

#### **4.5.5.3- Eletroforese da $\beta$ -1,3-glucanase em gel poliactilamida (12 %)**

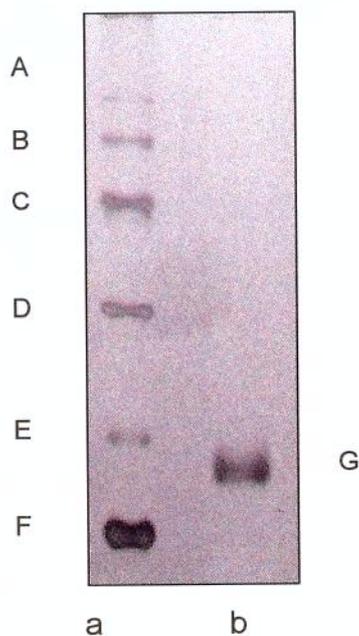
A amostra de  $\beta$ -1,3-glucanase purificada, preparada de acordo com o item 3.5.5.1, foi aplicada no gel NATIVE-PAGE (12 %), descrito no item 3.5.5.4, e verificou-se que a proteína apresentou o mesmo perfil eletroforético do gel SDS-PAGE (12 %), sugerindo que seja uma proteína monomérica.

#### **4.5.6- Determinação do peso molecular da $\beta$ -1,3-glucanase de *Cellulomonas cellulans* YLM-B191-1**

O peso molecular da  $\beta$ -1,3-glucanase de *C. cellulans* YLM-B191-1 foi estimado de acordo com o método descrito no item 3.5.6. A Figura 13, ilustra a eletroforese da  $\beta$ -1,3-glucanase purificada e dos padrões de peso molecular em SDS-PAGE (12 %), como uma banda de uma proteína simples. A  $\beta$ -1,3-glucanase apresentou peso molecular estimado em 17,1 kDa (Figura 14).



**Figura 13.** Relação entre o Rf e o peso molecular das proteínas em gel SDS-poliacrilamida (12%). ■ β-1,3-glucanase; ■ padrões moleculares.



**Figura 14.** Peso molecular da β-1,3-glucanase purificada estimado pela eletroforese em gel SDS-poliacrilamida.

a) mistura de padrões de peso molecular; A: fosforilase b (94.000); B: soro albumina bovino (67.000); C: ovoalbumina (43.000); D: anidrase carbônica (30.000); E: inibidor tripsina de soja (20.100); F: α-lactoalbumina (14.000);  
 b) G: β-1,3-glucanase corada com AgNO<sub>3</sub>.



Os pesos moleculares de glucanases, produzidas por diversos microrganismos e estimados em gel SDS-PAGE por vários autores, variaram entre 12 e 90 kDa. O peso molecular da  $\beta$ -1,3-glucanase de *Arthrobacter luteus* (zymolyase A) foi estimado em 55 e 58 kDa, respectivamente, por Scott & Schekman (1980) e Kitamura et al., (1982d). Estas linhagens foram posteriormente reclassificadas como *Oerskovia xanthineolytica* (Scott & Schekman, 1980).

A massa molecular da glucanase de *Oerskovia xanthineolytica* LL-G109 foi estimada em 31 kDa por eletroforese de poliacrilamida (Ventom & Asenjo, 1990a e b) e em 12 kDa por filtração em gel (Ventom & Asenjo, 1991). Saeki et al. (1994) verificaram que as  $\beta$ -1,3-glucanases de várias linhagens de *Oerskovia* sp apresentaram massas moleculares numa faixa entre 12 e 58 kDa. Parrado et al. (1996) estudaram uma  $\beta$ -1,3-glucanase de *Oerskovia xanthineolytica* que apresentou peso molecular de  $27195,6 \pm 1,3$  Da por SDS-PAGE.

Totsuka & Usui (1986) obtiveram duas glucanases de *Rhizoctonia solani* com 70 e 29 kDa, estimados por SDS-PAGE.

As endo  $\beta$ -1,3-glucanases de *Trichoderma longibrachiatum* (Tangarone et al., 1989) de *Trichoderma harzianum* (Noronha & Ulhoa, 1996 e 2000), de *T. harzianum* (Thrane et al., 1997), e de *T. harzianum* (Noronha et al., 2000) apresentaram diferentes pesos moleculares, os quais foram estimados em 70 kDa, 29 kDa, 17 kDa e 36 kDa, respectivamente.

Shimoi et al. (1991) estimaram o peso molecular da  $\beta$ -1,3-glucanase de *Rarobacter faecitabidus* em 82 kDa em SDS-PAGE.

Pitson et al. (1995) estudaram três  $\beta$ -D-1,3-glucanohidrolases (GN-I, GN-II e GN-III) extracelulares de *Acremonium persicinum*, um fungo filamentoso, e o peso molecular dessas proteínas foi estimado por SDS-PAGE, em 81; 85 e 89 kDa, respectivamente.

Galan et al. (1999) purificaram uma endo- $\beta$ -1,3-glucanase de *Agaricus bisporus* H 25 e o seu peso molecular foi estimado em 32 kDa por SDS-PAGE.

A determinação do peso molecular da  $\beta$ -1,3-glucanase purificada de *C. cellulans* YLM-B191-1, foi também realizada por colunas de filtração em BioGel; porém a enzima foi aparentemente adsorvida ou inativada durante a sua eluição. Sanchez et al. (1982) obtiveram resultados semelhantes para a purificação de preparações de glucanases e sugeriram que estas enzimas apresentavam enorme afinidade à matriz do gel.

#### **4.5.7- Determinação dos parâmetros cinéticos: $K_M$ e $V_{max}$ , da $\beta$ -1,3-glucanase de *Cellulomonas cellulans* YLM-B191-1**

A determinação dos parâmetros cinéticos:  $K_M$  e  $V_{max}$ , da  $\beta$ -1,3-glucanase de *C. cellulans* YLM-B191-1 foi realizada como descrito no item 3.5.7.

##### **4.5.7.1- Cinética enzimática**

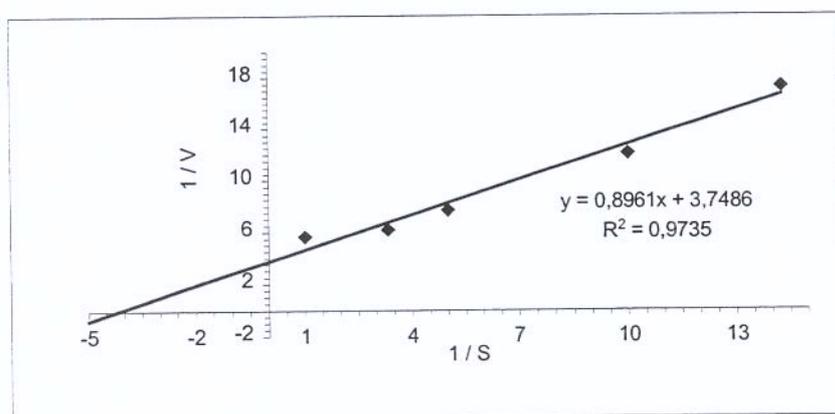
O valor de  $K_M$  aparente e de  $V_{max}$  da  $\beta$ -1,3-glucanase para a hidrólise da laminarina, determinado pelo método gráfico de Lineweaver-Burk (Figura 15), foi de 2,38 mg / mL (0,24 %) e 0,26 U  $\mu$ mol de glicose / mg de proteína, respectivamente.

A enzima comercial zymolyase obtida de *Arthrobacter luteus* que atua como uma endoenzima mostrou um valor de  $K_M$  de 10,9 mg / mL (1,09 %), para a laminarina insolúvel (Kitamura & Yamamoto, 1972 e Kitamura et al., 1974). Scott &

Schekman (1980) verificaram que a endo- $\beta$ -1,3-glucanase, produzida pela linhagem de *Arthrobacter luteus* (isolada por Yashishi Yamamoto e reclassificada como *Oerskovia xanthineolytica* por Mary Lechevalier) mostrou um valor de  $K_M$  de 5,9 mg / mL (0,59 %) para o substrato laminarina. Ventom & Asenjo (1991) caracterizaram as enzimas líticas de *Oerskovia xanthineolytica* LL-G109, e o valor de  $K_M$  foi estimado em 0,95 mg / mL (0,095 %) para a reação da  $\beta$ -1,3-glucanase sobre a laminarina e 2,5 mg / mL (0,25 %) para o substrato glucana de levedura.

Uma endo- $\beta$ -1,3-D-glucanase de centeio germinado mostrou um  $K_M$  de 0,25 mg / mL (0,025 %) com laminarina como substrato (Ballance et al., 1978).

O valor de  $K_M$  da endo  $\beta$ -1,3-glucanase de *Trichoderma longibrachiatum* para o substrato laminarina foi 0,0016 % (Tangarone et al., 1989) enquanto que a endo  $\beta$ -1,3-glucanase de *T. harzianum* (Noronha & Ulhoa, 1996) apresentou valor de  $K_M$  1,18 mg / mL (0,12 %) e de  $V_{max}$  de 1,26 U / mL.



**Figura 15.** Efeito da concentração do substrato laminarina na atividade de  $\beta$ -1,3-glucanase.

O valor de  $K_M$  foi estimado em 0,26 mg / mL (0,026 %) para os ensaios com glucanases de *Flavobacterium dormitator* var. *glucanolyticae* para o substrato laminarina (Nagasaki et al., 1976).

Bielecki et al. (1989) caracterizaram diversas  $\beta$ -1,3-glucanases de *Streptomyces* SP1228, usando a laminarina como substrato e estimaram os valores de  $K_M$  em  $6,65 \times 10^{-5}$  mol / L para GI;  $2,35 \times 10^{-4}$  mol / L para GII;  $8,1 \times 10^{-5}$  mol / L para GIV e  $8,1 \times 10^{-4}$  mol / L para GVIII.

PITSON et al. (1995) caracterizaram três  $\beta$ -1,3-D-glucohidrolases (GN-I, GN-II e GN-III), do fungo filamentososo *Acremonium persicinum* e, quando ensaiadas com laminarina de *Laminarina digitata*, os valores de  $K_M$  foram estimados em 0,1 mg / mL (0,01 %); 0,23 mg / mL (0,023 %) e 0,22 mg / mL (0,022 %), respectivamente.

Os resultados obtidos demonstraram que a  $\beta$ -1,3-glucanase de *Cellulomonas cellulans* YLM-B191-1, apresentou maior afinidade em relação ao substrato laminarina do que a  $\beta$ -1,3-glucanase (zymolyase) obtida de *Arthrobacter luteus* (Kitamura & Yamamoto, 1972 e Kitamura et al., 1974) e de *Oerskovia xanthineolytica* (Scott & Schekman, 1980) e menor afinidade pelo mesmo substrato, em relação as  $\beta$ -1,3-glucanases obtidas de linhagens de *Oerskovia xanthineolytica* LL-G109 (Ventom & Asenjo, 1991), de *Flavobacterium dormitator* var. *glucanolyticae* (Nagasaki et al., 1976), de *Trichoderma longibrachiatum* (Tangarone et al., 1989) de *Acremonium persicinum* (Pitson et al., 1995) e de *T. harzianum* (Noronha & Ulhoa, 1996).

#### 4.5.8- Efeito de sais, compostos inorgânicos e inibidores sobre a atividade da $\beta$ -1,3-glucanase de *Cellulomonas cellulans* YLM-B191-1

O efeito de sais, compostos inorgânicos e inibidores sobre a atividade da  $\beta$ -1,3-glucanase de *Cellulomonas cellulans* YLM-B191-1, foi determinado como descrito no item 3.5.8.

##### 4.5.8.1- Efeito de sais na atividade da $\beta$ -1,3-glucanase bruta de *Cellulomonas cellulans* YLM-B191-1

A Tabela 10 mostra o efeito de sais na atividade da preparação bruta de *Cellulomonas cellulans* YLM-B191-1 sobre a laminarina. A preparação bruta da enzima foi fortemente inibida por  $\text{HgCl}_2$ ,  $\text{AgNO}_3$  e  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  na concentração final 10 mM sendo obtido, respectivamente, 10,2; 15,5 e 45 % da atividade inicial e foi moderadamente inibida na presença de 10 mM de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ;  $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ;  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ;  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  e  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ .

**Tabela 10.** O efeito de sais sobre a atividade da preparação bruta da  $\beta$ -1,3-glucanase.

Sal Concentração final 10 mM	Atividade Relativa (%)
Controle	100
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	78
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	75
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	74
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	75
$\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	68,5
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	66,5
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	45
$\text{AgNO}_3$	15,5
$\text{HgCl}_2$	10,2

Doi et al. (1973) verificaram que concentrações menores que 0,01 mM de  $\text{HgCl}_2$  e 1 mM de  $\text{CuSO}_4$  inibiram fortemente a reação enzimática da  $\beta$ -1,3-glucanase de *Arthrobacter*, em 74 % e 42 %, respectivamente.

Nagasaki et al. (1976) usaram alguns sais na concentração de 1 mM e verificaram que a  $\beta$ -1,3-glucanase de *Flavobacterium dormitator* var. *glucanolyticae* foi inibida por  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  em 83,2 % e  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  em 58,6%, enquanto foi 9,7 % e 14,6 % mais ativa na presença de  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  e  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , respectivamente.

Totsuka & Usui (1986) verificaram que íons metálicos na concentração de 0,4 mM não afetaram muito a atividade da  $\beta$ -1,3-glucanase de *Rhizoctonia solani*. Somente o íon  $\text{Hg}^{2+}$  inativou fortemente a enzima. Foi obtido 87 % de inativação da  $\beta$ -1,3-glucanase na presença desse íon.

As  $\beta$ -1,3-glucanases II e IV (GII e GIV) de *Streptomyces* SP1228 (Bielecki et al. 1989) foram completamente inibidas na presença de 1 mM / L de  $\text{HgCl}_2$ , enquanto as  $\beta$ -1,3-glucanases I e VIII (GI e GVIII) foram inibidas em aproximadamente 50 %.

Tangarone et al. (1989) verificaram que a endo- $\beta$ -1,3-D-glucanase de *Trichoderma longibrachiatum* foi fortemente inibida por  $\text{HgCl}_2$ ,  $\text{MnCl}_2$  e  $\text{KMnO}_4$ . As endo  $\beta$ -1,3-glucanases purificadas de *T. harzanium* (Noronha et al., 1996) foram fortemente inibidas na presença de  $\text{HgCl}_2$  e estimuladas pelos cátions  $\text{Zn}^{2+}$  e  $\text{Ca}^{2+}$ , enquanto que a endo- $\beta$ -1,3-glucanase de *T. harzanium* (Thrane et al., 1997) foi totalmente inibida por íons mercúrio e SDS, enquanto  $\beta$ -mercaptoetanol reduziu em 25 % a ação desta enzima.

Pitson et al. (1995) verificaram que as  $\beta$ -1,3-glucanases GN-I, GN-II e GN-III de *Acremonium persicinum*, foram fortemente inibidas na presença de 1 mM de  $\text{MnCl}_2$ .

#### 4.5.8.2- Efeito de compostos inorgânicos e inibidores na atividade da $\beta$ -1,3-glucanase bruta de *Cellulomonas cellulans* YLM-B191-1

A Tabela 11 mostra o efeito de compostos inorgânicos e inibidores na atividade da preparação bruta sobre a laminarina. Foi observado moderada inibição da preparação bruta da  $\beta$ -1,3-glucanase de *Cellulomonas cellulans* YLM-B191-1 sobre a laminarina na presença de 10 mM de citrato de sódio, oxalato de sódio, fenilmetilsulfonil fluoreto, iodeto de potássio, iodoacetamida, ácido etilenediaminotetracético, semicarbazida, ácido 4-aminobenzóico, arseniato de sódio ( $\text{NaAsO}_2$ ), uréia, ác. 4-(cloromercúrio) benzóico. Os reagentes permanganato de sódio ( $\text{KMnO}_4$ ) e N-bromosuccinimida inibiram fortemente a  $\beta$ -1,3-glucanase bruta, enquanto o lauril sulfato de sódio inibiu completamente a enzima.

**Tabela 11.** Efeito de compostos inorgânicos e inibidores sobre a atividade da  $\beta$ -1,3-glucanase da preparação bruta de *C. cellulans* YLM-B191-1.

Inibidores Concentração Final 10 mM	Atividade relativa (%)
Controle	100
2-mercaptoetanol	131
Ac. 4-(cloromercúrio) benzóico	93
Uréia	92
Arseniato de sódio	87
Ac. 4-aminobenzóico	87
Semicarbazida	84
Ac. Etilenediaminotetracético	84
Iodoacetamida	84
Iodeto de potássio	83
Fenilmetilsulfonil fluoreto	82
Oxalato de sódio	80
Citrato de sódio	77
Permanganato de potássio	19
N-Bromosuccinimida	17
Lauril sulfato de sódio	0

#### 4.5.8.3- Efeito de sais, compostos orgânicos e inibidores na atividade da $\beta$ -1,3-glucanase purificada de *Cellulomonas cellulans* YLM-B191-1

A  $\beta$ -1,3-glucanase purificada de *Cellulomonas cellulans* YLM-B191-1 foi completamente inibida na presença de solução 10 mM de  $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  e  $\text{HgCl}_2$  e moderadamente inibida na presença de solução 10 mM de  $\text{AgNO}_3$  (Tabela 12). A presença de 10 mM de  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  na mistura de reação, resultou num aumento cerca de 11% na atividade da enzima  $\beta$ -1,3-glucanase purificada sobre a laminarina (Tabela 12).

A tabela 12 ilustra que o detergente lauril sulfato de sódio e o reagente N-bromosuccinimida na concentração final 1 mM, inibiram completamente a  $\beta$ -1,3-glucanase purificada de *Cellulomonas cellulans* YLM-B191-1, enquanto que o permanganato de potássio ( $\text{KMnO}_4$ ) inibiu fortemente a enzima, pois obteve-se apenas 13,9 e 2,11 % da atividade enzimática na presença de 1 mM e 10 mM do inibidor, respectivamente.

A presença de 10 mM de 2-mercaptoetanol na mistura de reação aumentou em 2,73 vezes a atividade da  $\beta$ -1,3-glucanase purificada de *Cellulomonas cellulans* YLM-B191-1 sobre a laminarina (Tabela 12). Isto sugere que grupos tiol podem estar envolvidos no sítio catalítico da enzima ou que estes grupos são essenciais para a manutenção da estrutura tridimensional da proteína ativa.

Nagasaki et al. (1976) verificaram que a  $\beta$ -1,3-glucanase de *Flavobacterium dormitator* var. *glucanolyticae* foi fortemente inibida por 1 mM de permanganato de potássio ( $\text{KMnO}_4$ ) e, ou de EDTA, e ativada na presença de 1 mM de oxalato de sódio, de laurilsulfato de sódio ou de dietilditiocarbamato de sódio.

Scott & Schekman (1980) verificaram que a remoção de 2-mercaptoetanol no ensaio de atividade lítica provocou queda na ação lítica da  $\beta$ -1,3-glucanase de *Oerskovia xanthineolytica*.

Bielecki et al. (1989) verificaram que 1 mM / L de EDTA, de 2-mercaptoetanol ou D-glucono- $\delta$ -lactone ativaram as  $\beta$ -1,3-glicanases GI, GII e GIV.

Pitson et al. (1995) relataram que as  $\beta$ -1,3-glicanases GN-I, GN-II e GN-III de *Acremonium persicinum* foram fortemente inibidas na presença de 1 mM de permanganato de potássio (KMnO<sub>4</sub>) e de N-bromosuccinimida.

**Tabela 12.** Efeito de sais e inibidores sobre a atividade da enzima  $\beta$ -1,3-glicanase purificada de *C. cellulans* YLM-B191-1.

Compostos	Atividade relativa (%)	
	Conc. Final 1 mM	Conc. Final 10 mM
Controle	100	100
AgNO <sub>3</sub>	90,5	57,1
CoCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	87,8	111,3
ZnSO <sub>4</sub> xH <sub>2</sub> O	61,4	0
CuSO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O	7,9	0
HgCl <sub>2</sub>	19,6	0
N-Bromosuccinimida	0	0
Lauril sulfato de sódio	0	0
Permanganato de potássio	13,9	2,11
2-mercaptoetanol	-	273

#### 4.5.9- Especificidade da $\beta$ -1,3-glicanase de *Cellulomonas cellulans* YLM-B191-1 sobre diferentes substratos

A especificidade da  $\beta$ -1,3-glicanase de *C. cellulans* YLM-B191-1 foi determinada como descrito no item 3.5.9. A  $\beta$ -1,3-glicanase hidrolisa carboidratos que apresentam, predominantemente, ligações  $\beta$ -1,3-glicosídicas, tais como os polímeros de laminarina e curdlana (Tabela 13). A atividade relativa da  $\beta$ -1,3-glicanase sobre a laminarina foi considerada 100 % e na presença da curdlana

houve uma ação enzimática mais intensa, resultando numa atividade relativa de 159 %. A  $\beta$ -1,3-glucanase não mostrou atividade sobre a manana de levedura.

**Tabela 13.** Especificidade da enzima  $\beta$ -1,3-glucanase purificada de *C. cellulans* YLM-B191-1.

Substrato	Tipo de ligação	Atividade enzimática (U / mL)	% Atividade relativa
Laminarina	$\beta$ -1,3	2,68	100
Curdlana	$\beta$ -1,3	4,29	159
Amido	$\alpha$ -1,4, $\alpha$ -1,6	0	0
Manana de levedura	$\alpha$ -1,2, $\alpha$ -1,3	0	0
Dextrana	$\alpha$ -1,6	0	0
Celulose	$\beta$ -1,4	0	0

#### 4.5.10- O modo de ação da $\beta$ -1,3-glucanase de *Cellulomonas cellulans* YLM-B191-1 sobre a laminarina

O modo de ação da enzima sobre a laminarina foi estudado pela análise dos produtos de hidrólise, como descrito no item 3.5.10. A laminarina despolimerizada pela ação da enzima, foi convertida em oligossacarídeos, após exaustiva digestão enzimática. A Figura 16, mostra os produtos da digestão da laminarina pela preparação enzimática bruta de *C. cellulans* YLM- B191. A Figura 16.I ilustra a presença de glicose na amostra de laminarina (L1) hidrolisada com ácido. A Figura 16.II ilustra os açúcares redutores resultantes da hidrólise da laminarina (L2 e L3) pela  $\beta$ -1,3-glucanase da preparação bruta, após 120 e 150 minutos de incubação, respectivamente. Foi observado a produção de glicose, biose, triose e tetraose, e incubações prolongadas (180 minutos) resultaram em glicose e biose, sugerindo que a enzima atua como uma endoglucanase.

A ação enzimática da  $\beta$ -1,3-glucanase de *Cytophaga johnsonii* sobre a glucana solúvel da parede celular de levedura resultou na produção de oligossacarídeos de maior peso molecular e, posteriormente, de pequena quantidade de oligossacarídeos de menor peso molecular e glicose. A ação da  $\beta$ -1,3-glucanase não lítica atuou sobre a laminarina produzindo glicose e uma série de oligossacarídeos dos quais a laminaritriose foi predominante. Incubações prolongadas resultaram principalmente em mono-, di- e trissacarídeos (Bacon et al., 1970).

Kitamura & Yamamoto (1972) e Kitamura et al. (1974) relataram que a zymolyase continha uma  $\beta$ -1,3-glucanase que hidrolisava polímeros lineares de glicose com ligações  $\beta$ -1,3, liberando especificamente laminaripentaose como unidade mínima. A enzima apresentou especificidade para seqüências longas de resíduos de glicose com ligações  $\beta$ -1,3 e, podiam causar endo- ou exo-hidrólise dependendo principalmente do comprimento da cadeia ou da solubilidade do substrato.

Kopecká et al. (1974) verificaram que a exo- $\beta$ -glucanase de *Schizosaccharomyces versatilis* não mostrou efeito detectável sobre as paredes celulares de leveduras de panificação, pois ela não penetra na camada de manana da parede e, sua ação fica limitada a glucana exposta pelos fragmentos periféricos em células quebradas, enquanto a endo- $\beta$ -1,3-glucanase de *S. versatilis* teve uma ação pronunciada e contínua sobre as células de leveduras de panificação e foi capaz de causar uma completa digestão dos componentes fibrilares da parede celular, bem como da glucana amorfa, dos fragmentos celulares não digeridos ou das cicatrizes de brotamento. Eles verificaram também que a parede celular de levedura de panificação mostrou-se resistente a hidrólise quando tratada com preparações de endo- $\beta$ -1,3-glucanase e endo- $\beta$ -1,6-glucanase purificadas de *Bacillus circulans*.

Nagasaki et al. (1976) verificaram que a  $\beta$ -1,3-glucanase de *Flavobacterium dormitator* var. *glucanolyticae* que rompe as células de leveduras viáveis, atuou

como uma endo  $\beta$ -1,3-glucanase, preferencialmente sobre sacarídeos de cadeias longas. Contudo pequenos oligossacarídeos, como laminaritriose e laminaribiose, foram também decompostos pela enzima.

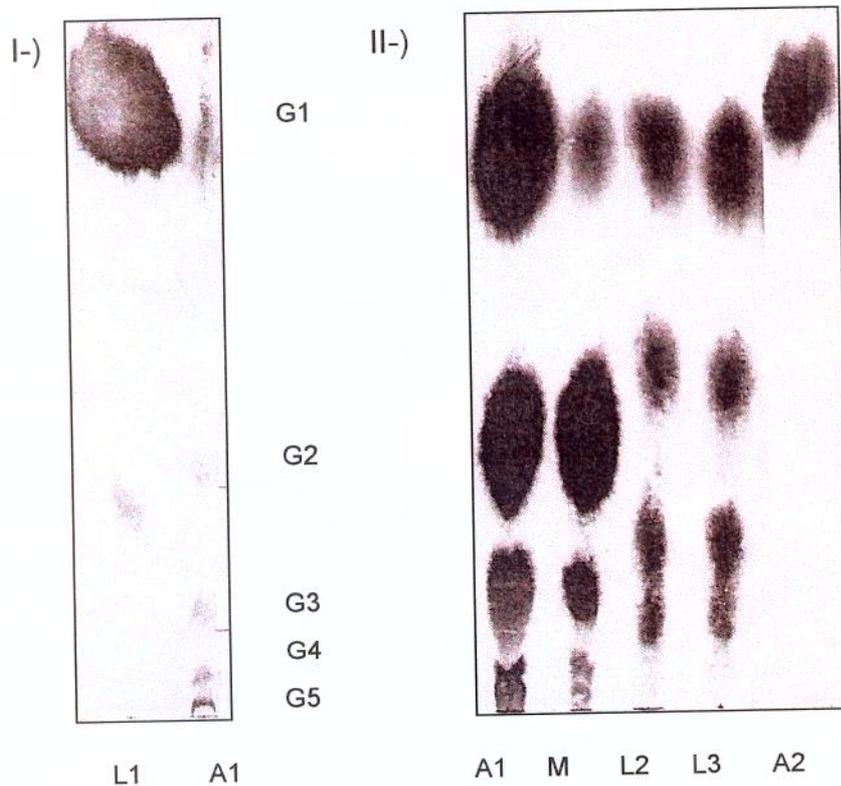
Tangarone et al. (1989) verificaram que endo- $\beta$ -1,3-D-glucanase de *Trichoderma longibrachiatum* hidrolisou laminarina a oligossacarídeos variando em tamanho, de glicose a pentaose, e em quantidade. A enzima clivou laminaripentaose em laminaritetraose, laminaribiose e glicose, mas não clivou laminaribiose a glicose e foi capaz de hidrolisar somente glucanas contendo ligações  $\beta$ -1,3.

A enzima  $\beta$ -1,3-D-glucanase de *Bacillus circulans* atuou como uma exo-glucanase removendo unidades de laminaribiose de seus terminais não redutores (Kanzawa et al., 1994).

Pitson et al. (1995) purificaram e caracterizaram três  $\beta$ -D-1,3-glucanohidrolases extracelulares do fungo filamentoso *Acremonium persicinum*, designadas como GN-I, GN-II e GN-III, que atuaram sobre a laminarina de *Eisenia* sp com uma ação endo-hidrolítica.

Uma glucanase purificada de grãos de arroz (*Oryza sativa* L) da variedade cv. Kibara 397 atuou como uma endo- $\beta$ -1,3-glucanase pela análise dos produtos finais quando foi usado laminarina de *Laminaria digitata* como substrato (Akiyama et al., 1996).

Burtseva et al. (2000) verificaram através da análise dos produtos de hidrólise enzimática da laminarina e de habilidade de transglicosilação que as enzimas líticas do fungo *Chaetomium indicum* eram duas exo- $\beta$ -glucanases.



**Figura 16.** Produtos da hidrólise da laminarina pela  $\beta$ -1,3-glucanase bruta de *C. cellulans* YLM-B191-1.

L1: Solução 1% laminarina hidrolisada por ácido;

A1: Mistura de açúcares padrões (glicose-G1; maltose-G2; maltotriose-G3; maltotetraose-G4 e maltopentaose-G5);

A2: glicose;

M: maltose comercial (glicose, maltose e maltotetraose);

L2: Solução 1% de laminarina em tampão 0,1 M acetato de sódio pH 5,5 e preparação bruta de  $\beta$ -1,3-glucanases (30 % p / v), incubada a 55<sup>o</sup> C por 120 minutos;

L3: Solução 1% de laminarina em tampão 0,1 M acetato de sódio pH 5,5 e preparação bruta de  $\beta$ -1,3-glucanases (30 % p / v), incubada a 55<sup>o</sup> C por 150 minutos.



#### **4.6- Susceptibilidade de algumas culturas microbianas às células de *Cellulomonas cellulans* YLM-B191-1 e às suas enzimas líticas**

A atividade lítica da preparação enzimática bruta, da  $\beta$ -1,3-glucanase purificada e do microrganismo lítico *C. cellulans* YLM-B191-1 sobre células de bactérias e leveduras foram testadas como descrito no item 3.6.

##### **4.6.1- Susceptibilidade das linhagens de leveduras e bactérias às células de *Cellulomonas cellulans* YLM-B191-1 em placas de Agar macio**

###### **4.6.1.1- Susceptibilidade das linhagens de leveduras às células de *Cellulomonas cellulans* YLM-B191-1 em placas de Agar macio**

A ação lítica da bactéria *C. cellulans* YLM-B191-1 foi testada em placas de Agar macio contendo células viáveis de *S. cerevisiae* 701, de *S. cerevisiae* ATCC 26602 ou de *R. rubra* CCT 3895, como descrito no item 3.6.1.3. Halos formando uma zona mais clara ao redor das colônias de *C. cellulans* YLM-B191-1 foram evidenciados nas placas de Agar macio contendo células de *S. cerevisiae* 701 ou de *S. cerevisiae* ATCC 26602. Esses halos indicaram que as bactérias foram capazes de lisar células viáveis de leveduras e usá-las como fonte de carbono e energia. Nas placas de Agar macio contendo células de *R. rubra* CCT 3895 não foram observados halos de lise. Kaneko et al. (1973) relataram que isto pode estar relacionado ao fato de que a parede celular destas leveduras não contém glucana, mas é composta, somente, de quitina e manana.

#### **4.6.1.2- Susceptibilidade das linhagens de bactérias às células de *Cellulomonas cellulans* YLM-B191-1 em placas de Agar macio**

A ação lítica da linhagem *C. cellulans* YLM-B191-1 foi testada em placas de Agar macio contendo células viáveis de *E. coli* ATCC 11229, *Salmonella* sp, *S. aureus* ATCC 6538, *P. aeruginosa* e *B. polymyxa*, como descrito no item 3.6.1.4. Somente nas placas de Agar macio contendo células de *S. aureus* ATCC 6538 verificou-se zonas mais claras ao redor das colônias de *C. cellulans* YLM-B191-1. Estes halos indicaram que as células de *C. cellulans* YLM-B191-1 foram capazes de lisar e usar as células viáveis de *S. aureus* ATCC 6538 como fonte de carbono e energia. Porém, nas placas de Agar macio contendo células viáveis de *P. aeruginosa*, *B. polymyxa*, *E. coli* ATCC 11229, *Salmonella* sp e *S. aureus* ATCC 6538 não foram observados halos de lise.

#### **4.6.2- Digestão da parede celular de *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 26602 pelas enzimas líticas de *Cellulomonas cellulans* YLM-B191-1 e observação em microscópio eletrônico**

##### **4.6.2.1- Observação em microscópio eletrônico da célula intacta de *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 26602**

A suspensão de células de *S. cerevisiae* ATCC 26602 foi cultivada por 20 horas a temperatura ambiente e as células foram tratadas para observação em microscópio eletrônico de varredura (MEV), como descrito no item 3.6.2.2.

A Figura 17 (Amostra A) ilustra a superfície externa lisa e uniforme da parede celular intacta de *S. cerevisiae* ATCC 26602, sem o tratamento com as enzimas líticas. Na Amostra A não foram observados células autolisadas de leveduras.

Kopek et al. (1974) observaram em microscópio eletrônico que as células intactas de leveduras apresentaram uma parede celular completamente lisa e sem microfibrilas.

Yamamura et al. (1991) estudando a estrutura da parede celular através de microscopia eletrônica não verificaram mudanças notáveis na parede celular ou nas membranas celulares de leveduras que justificassem uma autólise após longos períodos de incubano das células  temperaturas elevadas. A resistência da parede confere proteo física as células de leveduras.

Klis (1994) relatou que a parede celular de leveduras  responsável pela força mecânica da célula, enquanto Stratford (1994) descreveu que a parede celular apresenta além de proteo física, estabilidade osmótica, serve de suporte para enzimas e de ligante de compostos, favorece a adesão célula-célula e a permeabilidade como barreira seletiva.

As análises da lise enzimática da levedura e da autólise devem ser realizadas simultaneamente, pois tanto a lise quanto a autólise podem acontecer ao mesmo tempo. Estudos constataram que as células de leveduras são muito resistentes a autólise celular. Para se obter autolisado de leveduras de *Kluyveromyces marxianus var. marxianus*, foi necessário um tratamento térmico a 45C ou 50C por 23,5 horas. Durante este tratamento foram feitas observaes em microscópio eletrônico e não foi possível verificar nenhuma célula rompida, mas apenas diferenças morfológicas entre as células frescas lavadas e as células autolisadas. Enquanto as células frescas mostraram uma forma lisa e elipsoidal, as células autolisadas pareceram como balões cilíndricos que foram esvaziados. As células autolisadas mostraram somente uma diminuio de 43 % no seu volume interno (Amrane & Prigent, 1996).

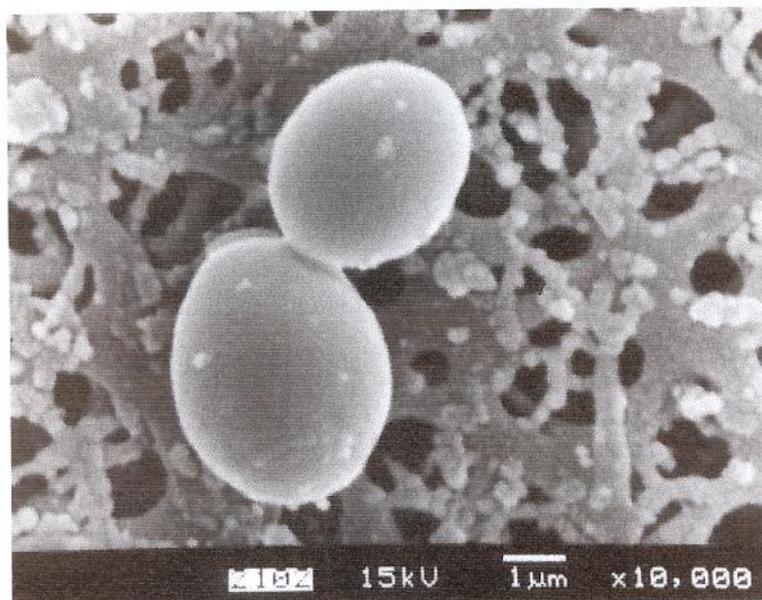
#### **4.6.2.2- Observação em microscópio eletrônico da parede celular de *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 26602 após a ação da preparação bruta de enzimas líticas de *Cellulomonas cellulans* YLM-B191-1**

As suspensões de células viáveis de *S. cerevisiae* ATCC 26602 foram submetidas a ação da preparação enzimática bruta de *C. cellulans* YLM-B191-1, e observadas por microscopia eletrônica de varredura, como descrito no item 3.6.2.3.

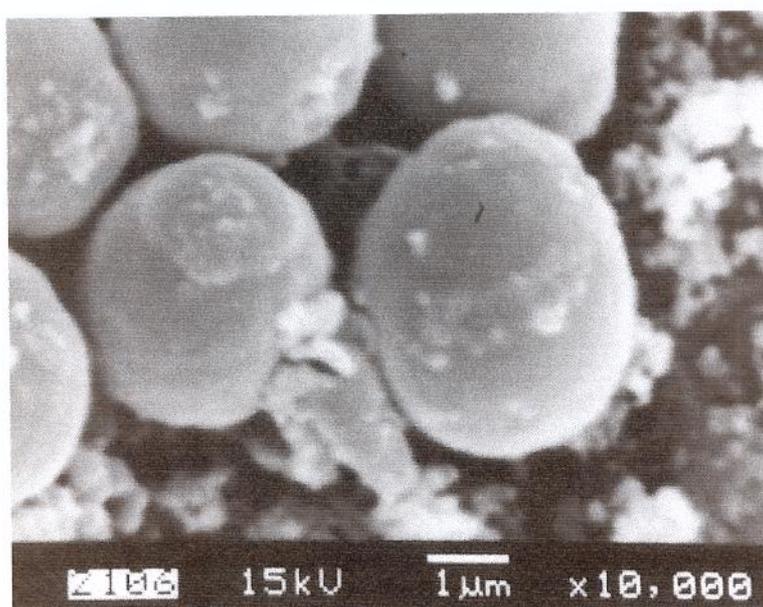
A Figura 18 (Amostra B) mostra a superfície da levedura após a ação da preparação enzimática bruta de *C. cellulans* YLM-B191-1. A ação da enzima bruta sobre a parede da levedura, após 18 horas a 30°C, mostrou alterações significativas na superfície celular.

As regiões das cicatrizes de brotamento das células de *S. cerevisiae* ATCC 26602 mostraram-se fortemente digeridas após tratamento enzimático. Apesar das observações em microscópio eletrônico revelarem uma parede celular áspera e completamente deformada (Figura 18), as observações em microscópio óptico mostraram que as células de leveduras tratadas com azul de metileno, continuavam viáveis, após a ação da preparação enzimática bruta.

Bacon et al. (1969) considerando a parede celular de leveduras constituída por duas camadas: uma de manana-proteína e a outra contendo a glucana, relataram que este conceito tem sido baseado em estudos minuciosos da estrutura das cicatrizes de brotamento. Seções ultrafinas mostraram que a superfície dessas crateras, formadas nas regiões de brotamento, não é a parte exposta de uma camada interna, mas sim uma cicatriz desenvolvida como uma marca autêntica, entre a célula mãe e a célula filha. Os autores relataram que a camada de manana-proteína sobrepõe a camada de glucana e isto poderia explicar a resistência das células vivas de leveduras ao ataque das misturas enzimáticas, como  $\beta$ -1,3-glucanases, elaboradas por alguns microrganismos.



**Figura 17.** Superfície celular de *S. cerevisiae* ATCC 26602 (Amostra A).



**Figura 18.** Superfície celular de *S. cerevisiae* ATCC 26602, após a ação da preparação bruta de enzimas líticas produzidas pela *C. cellulans* YLM-B191-1, por 2 horas a 55°C (Amostra B).



Kopecká et al. (1974) estudaram a ultraestrutura da parede celular de isolados de *S. cerevisiae* durante a fase exponencial e a fase estacionária. Os autores verificaram que as regiões de brotamento de leveduras são estruturas resistentes ao efeito das  $\beta$ -1,3-glucanases. Esta enzima pode ser usada nos estudos da rede microfibrilar de leveduras e também para a recuperação de protoplastos. O desaparecimento por completo das microfibrilas, após o tratamento com as  $\beta$ -1,3-glucanases de *S. versatilis*, confirmou que estes componentes fibrilares são constituídos de glucanas com ligações  $\beta$ -1,3. Os autores relataram que as moléculas ramificadas de glucana apresentam papel importante, permitindo a associação das cadeias mais afastadas de polissacarídeos com outras moléculas de ramificações superficiais, dando origem a um componente fibrilar contínuo. A representação qualitativa da molécula de glucana ramificada poderia refletir na densidade da rede que forma a camada de glucana. Os autores observaram que algumas cicatrizes de brotamento foram as únicas estruturas da parede resistentes aos efeitos das enzimas de *Bacillus circulans*. Algumas delas mostraram poucas microfibrilas nas suas periferias e outras mostraram microfibrilas completamente digeridas, após o tratamento com endo  $\beta$ -1,3-glucanases e endo- $\beta$ -1,6-glucanases ou com a mistura de ambas as enzimas produzidas por este microrganismo. O material amorfo da parede externa e interna da levedura de panificação era removido, progressivamente, pelas enzimas e os componentes fibrilares tornaram-se visíveis por microscopia eletrônica.

Kreger & Kopecká (1975) confirmaram a posição interna da fração de glucana na parede celular de leveduras, através de observações em microscópio eletrônico.

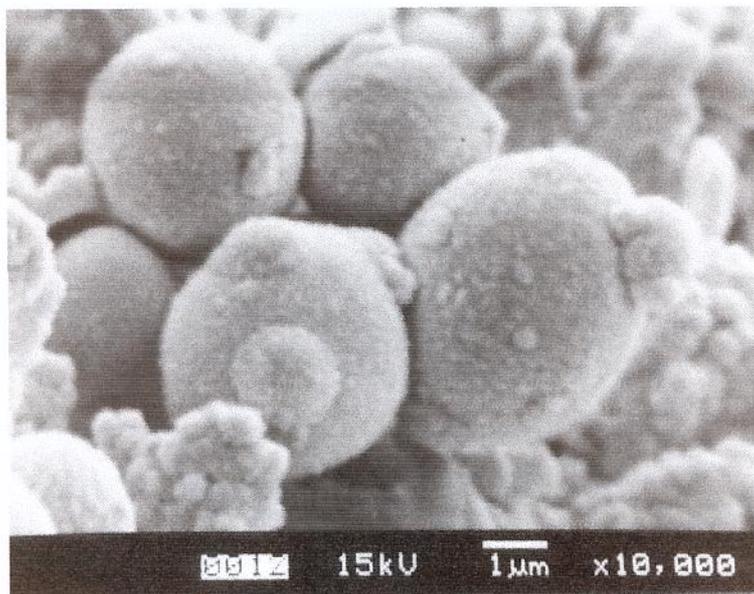
#### 4.6.2.3- Observação em microscópio eletrônico da parede celular de *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 26602, após a ação da $\beta$ -1,3-glucanase purificada de *Cellulomonas cellulans* YLM-B191-1

As suspensões de células viáveis de *S. cerevisiae* ATCC 26602 foram submetidas a ação da  $\beta$ -1,3-glucanase purificada de *C. cellulans* YLM-B191-1, por duas horas a 55°C, e observadas por microscopia eletrônica de varredura, como descrito no item 3.6.2.4.

A Figura 19 (Amostra C) ilustra a parede celular de *S. cerevisiae* ATCC 26602 após tratamento com a  $\beta$ -1,3-glucanase purificada de *C. cellulans* YLM-B191-1. A coloração negativa da microscopia eletrônica revelou a digestão parcial da parede celular da levedura pela  $\beta$ -1,3-glucanase purificada.

Os componentes fibrilares da parede celular das leveduras sofreram digestão, tornando a superfície celular áspera (Figura 19), quando comparada com a superfície da levedura sem o tratamento enzimático (Figura 17). Isto se deve a ação da endo- $\beta$ -1,3-glucanase purificada de *C. cellulans* YLM-B191-1 de 17,1 kDa, que atuou sozinha na parede celular da levedura, modificando-a. Porém, após a ação enzimática, verificou-se que o número total de células da suspensão de leveduras não mudou e que o número de células viáveis de leveduras diminuiu somente após 30 horas de incubação com o microrganismo lítico *C. cellulans* YLM-B191-1. Apesar disso, as células de leveduras mostraram resistência à lise total após a ação da  $\beta$ -1,3-glucanase purificada.

Bacon et al. (1969) relataram que a camada de manana-proteína que se sobrepõe à camada de glucana, confere resistência das células vivas de leveduras, ao ataque das misturas de enzimas elaboradas pelos microrganismos.



**Figura 19.** Superfície celular de *S. cerevisiae* ATCC 26602, após a ação da enzima  $\beta$ -1,3-glucanase purificada de *C. cellulans* YLM-B191-1, por 2 horas a 55°C (Amostra C).



Kopecká et al. (1974) verificaram que a rede fibrilar, existente na parede celular de levedura de panificação - *S. cerevisiae*, foi resistente a hidrólise pelas preparações de enzimas líticas de *Bacillus circulans* contendo endo- $\beta$ -1,3-glucanase e endo- $\beta$ -1,6-glucanase. Para que ocorra a digestão completa da parede celular é necessário que haja a hidrólise da camada insolúvel de  $\beta$ -1,3-glucana. Os autores relataram que durante a purificação da  $\beta$ -1,3-glucanase, um fator responsável pela hidrólise da glucana insolúvel em álcali, pode ser removido da preparação enzimática, prejudicando a atividade lítica da mesma. Os autores relataram que as micrografias mostraram diferença no efeito de várias glucanases sobre a parede celular de leveduras de panificação. A exo- $\beta$ -glucanase de *Schizosaccharomyces versatilis* não mostrou efeito detectável sobre as paredes celulares de leveduras de panificação, pois ela não penetra na camada de manana da parede e sua ação fica limitada a glucana exposta pelos fragmentos periféricos em células quebradas. No entanto, a endo- $\beta$ -1,3-glucanase de *S. versatilis* teve uma ação pronunciada e contínua sobre as células de leveduras de panificação e foi capaz de causar uma completa digestão dos componentes fibrilares das paredes, bem como da glucana amorfa, dos fragmentos celulares não digeridos ou das cicatrizes de brotamento.

Shimoi & Tadenuma (1991) relataram que em alguns casos foram necessários a ação sinérgica de uma serina protease com a glucanase para a lise da parede celular de levedura.

Saeki et al. (1994) observaram que glucanases de alto peso molecular (maiores que 50 kDa) necessitavam de uma protease para degradar a parede celular de leveduras, enquanto, as glucanases de baixo peso molecular (entre 12 e 29 kDa) não mostraram um sítio de afinidade pela glucana, mas puderam lisar células de leveduras, por si mesmas. Apesar disso estas enzimas apresentaram fraca atividade lítica quando comparada as glucanases de alto peso molecular. Estes autores explicaram que as glucanases de baixo peso molecular alcançaram a camada de glucana através do complexo manana-proteína, sem a adição de uma protease enquanto que a camada de glucana é dificilmente acessível às  $\beta$ -

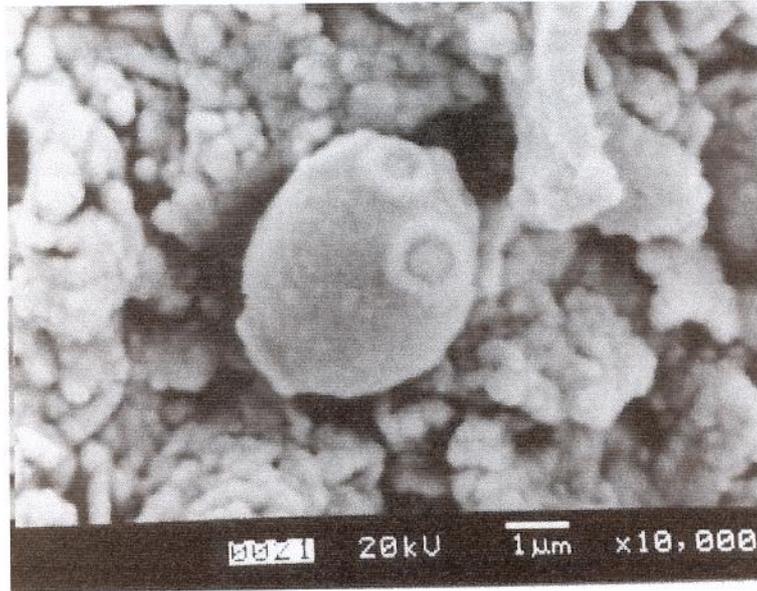
1,3-glucanases de alto peso molecular, a menos que o complexo manana-proteína que recobre a camada de glucana seja eliminado. A maioria das glucanases de baixo peso molecular não requer ação sinérgica com uma protease para lisar células de leveduras pois o tamanho da enzima ou sua forma hidrodinâmica - estrutura terciária, possivelmente, mais compacta da molécula, permite a sua passagem pela camada de manana-proteína.

A aplicação das enzimas que lisam a parede celular de leveduras é muito promissora, como por exemplo, na preservação de alimentos. Tem sido sugerido a avaliação da ação destas enzimas líticas sobre leveduras e bactérias para controle de microrganismos patogênicos e prevenção da deterioração dos alimentos (Andrews & Asenjo, 1987).

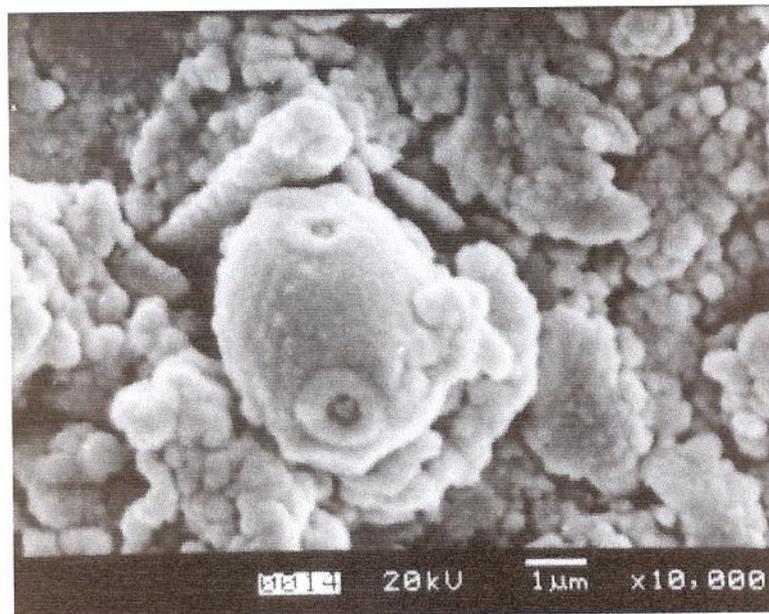
#### **4.6.2.4- Ação do microrganismo lítico *Cellulomonas cellulans* YLM-B191-1 sobre a parede celular de *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 26602 e observação em microscópio eletrônico**

As suspensões de células viáveis de *S. cerevisiae* ATCC 26602 foram submetidas a ação das células líticas de *C. cellulans* YLM-B191-1, e observadas por microscopia eletrônica de varredura, como descrito no item 3.6.2.5.

Após o período de incubação da suspensão de *S. cerevisiae* ATCC 26602 e de *C. cellulans* YLM-B191-1 (Amostra D e E), observou-se alterações significativas, como deformações na forma das células de leveduras e das suas cicatrizes de brotamento pelo microrganismo lítico, além de mostrar uma superfície celular áspera (Figuras 20 e 21), indicando a digestão enzimática dos componentes fibrilares da parede celular. Porém, foi observado que a parede de algumas células de leveduras não haviam sofrido alterações.



**Figura 20.** Superfície celular da *S. cerevisiae* ATCC 26602, na presença das células de *C. cellulans* YLM-B191-1 produtoras das enzimas líticas, por 20 horas à temperatura ambiente (Amostra D).



**Figura 21.** Superfície celular da *S. cerevisiae* ATCC 26602, na presença das células de *C. cellulans* YLM-B191-1 produtoras das enzimas líticas, por 20 horas à temperatura ambiente (Amostra E).



A mistura contendo células viáveis de *S. cerevisiae* ATCC 26602 e células líticas de *C. cellulans* YLM-B191-1 liberou 0,72  $\mu\text{mol}$  / mL de glicose, após 36 horas de incubação à 30°C. Na suspensão controle de *S. cerevisiae* ATCC 26602, mantida em geladeira a 5°C por 36 horas, não foi detectado a liberação de glicose.

## 5- CONCLUSÕES

A semeadura em placas de petri contendo meio de cultivo composto de sais, células viáveis de *Saccharomyces cerevisiae* e resíduos de lodo de fermentação de usina de açúcar e álcool foi eficiente para isolamento de microrganismos que lisam a parede celular de leveduras.

A linhagem YLM-B191-1 selecionada entre seis linhagens de microrganismos capazes de lisar a parede celular de levedura foi identificada como *Cellulomonas cellulans* através das características morfológicas, fisiológicas e quimiotaxonômicas.

O meio n<sup>o</sup> 4 descrito por SISTROM (1958) e modificado por SCOTT e SCHEKMAN (1980) foi selecionado para a produção de  $\beta$ -1,3-glucanase pela linhagem de *Cellulomonas cellulans* YLM-B191-1. A enzima foi produzida após 24 horas de incubação a 30<sup>o</sup> C sob agitação a 200 rpm sendo obtido 0,026 U / mL.

A  $\beta$ -1,3-glucanase de *Cellulomonas cellulans* YLM B191-1 foi purificada através de ultrafiltração em membrana de retenção de 30 kDa e cromatografia em coluna de CM-Sepharose CL-6B equilibrada com tampão acetato de sódio 0,01 M pH 4,5. A fração 2 de  $\beta$ -1,3-glucanase adsorvida na coluna e eluída com tampão 0,01 M acetato de sódio pH 4,5 com 0,4 M NaCl foi purificada cerca de 78 vezes e mostrou-se homogênea através de eletroforese em PAGE e SDS-PAGE.

O peso molecular da  $\beta$ -1,3-glucanase de *Cellulomonas cellulans* YLM-B191-1 foi estimado em 17,1 kDa através de eletroforese em SDS-PAGE.

A preparação bruta de  $\beta$ -1,3-glucanase de *Cellulomonas cellulans* YLM-B191-1 apresentou pH ótimo de atividade na faixa de pH 4,5 a 5,5 a 55<sup>o</sup> C e temperatura ótima na faixa de 55 a 57<sup>o</sup>C . A enzima mostrou-se estável em pH 4,5 após 4 horas de tratamento a 45<sup>o</sup>C e por 1 hora em pH 6,5 a 55<sup>o</sup> C. A

preparação bruta de  $\beta$ -1,3-glucanase perdeu completamente a atividade quando incubada por 1 hora em temperaturas superiores a 60°C.

A  $\beta$ -1,3 glucanase purificada de *Cellulomonas cellulans* YLM-B191-1 apresentou pH ótimo de atividade na faixa de pH 4,5 a 5,5 a 55°C e temperatura ótima de atividade na faixa de 50 a 60°C em pH 5,5. A enzima purificada mostrou-se completamente estável após 2 horas de tratamento térmico a 50°C ou após 15 minutos a 55°C. A enzima foi inativada após 1 hora de tratamento térmico a 60°C.

O valor de  $K_M$  aparente e  $V_{max}$  da  $\beta$ -1,3-glucanase purificada de *Cellulomonas cellulans* YLM-B191-1 para o substrato laminarina foi 0,24 % e 0,26  $\mu$ mol de glicose / mg de proteína, respectivamente.

A preparação bruta de  $\beta$ -1,3-glucanase foi fortemente inibida por  $HgCl_2$ ;  $AgNO_3$  e  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  e moderadamente inibida na presença de  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ ;  $ZnSO_4 \cdot H_2O$ ;  $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ ;  $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ ;  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  e  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , na concentração final 10 mM.

A  $\beta$ -1,3-glucanase purificada de *Cellulomonas cellulans* YLM-B191-1 foi completamente inibida por  $ZnSO_4$ ;  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ ;  $HgCl_2$ ; N-bromosuccinimida e laurilsulfato de sódio e moderadamente inibida por  $AgNO_3$  na concentração final 10 mM. Foi observado um aumento de cerca de 11 % na atividade de  $\beta$ -1,3 glucanase purificada na presença de  $CoCl_2 \cdot 6H_2O$  na concentração final  $10^{-2}$  M. A adição de 2-mecaptoetanol na concentração final 10 mM resultou em aumento de cerca de 2,7 vezes da atividade de  $\beta$ -1,3-glucanase.

A  $\beta$ -1,3-glucanase purificada de *Cellulomonas cellulans* YLM-B191-1 hidrolisa as ligações  $\beta$ -1,3-glicosídicas da laminarina atuando como uma endoenzima. A enzima mostrou maior atividade sobre a curdlana do que sobre a laminarina.

O tratamento das células de levedura *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 26602 com a preparação bruta e purificada de  $\beta$ -1,3-glucanase e com as células da bactéria *Cellulomonas cellulans* YLM-B191-1 provocaram alterações na superfície celular da levedura.

## 6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKITA, O.; SUZUKI, O.; TAKAMINE, K.; SETOGUCHI, S.; IWASHITA, Y.; IEFUJI, H.; OBATA, T. Solid-liquid separation in wastewater from a barley shoshu distillery using *Geotrichum* sp. M111 and treatment of the liquid component with *Hansenula anomala* and activated sludge. **Journal Fermentation and Bioengineering**, v. 80, n<sup>o</sup> 4, p. 397 – 404, 1995.
- AKIYAMA, T.; KAKU, H.; SHIBUYA, N. Purification and properties of a basic endo- $\beta$ -1,3-glucanase from rice (*Oryza sativa* L.). **Plant and Cell Physiology**, v. 37, n<sup>o</sup> 5, p. 702 – 705, 1996.
- ALFONSO, C.; AMO, F. Del; NUERO, O.M; REYES, F.; DEL-AMO, F. Physiology and biochemical studies on *Fusarium oxysporum* f.sp. *lysopersici* race 2 for its biocontrol by nonpathogenic fungi. **FEMS – Microbiology Letters**, v. 99, n<sup>o</sup> 2 - 3, p. 169 – 174, 1992.
- AMRANE, A; PRIGENT, Y. Behaviour of the yeast *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* during its autolysis. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 69, p. 267-272, 1996.
- ANDREWS, B.A.; ASENJO, J.A. Continuous-culture studies of synthesis and regulation of extracellular  $\beta$ -(1-3)-glucanase and protease enzymes from *Oerskovia xanthineolytica*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 30, p. 628 – 637, 1987a.
- ANDREWS, B.A.; ASENJO, J.A. Enzymatic lysis and disruption of microbial cells. **Trends in Biotechnology Reviews**, v. 5, n<sup>o</sup> 10, p. 273 – 277, 1987b.
- ASENJO, J.A.; ANDREWS, B.A.; HUNTER, J.B.; LECORRE S. Microbial Cell Lytic Enzyme Systems: Production and Reaction Kinetics. **Process Biochemistry**, p. 158 – 164, 1985.
- BACON, J.S.D.; DAVIDSON, E.D.; JONES D.; TAYLOR, I.F. The location of chitin in the yeast cell wall. **Biochemical Journal**, v. 101, n<sup>o</sup> 2, p. 36c – 38c, 1966.
- BACON, J.S.D.; FARMER, B.C.; JONES, D.; TAYLOR, I.F. The glucan components of the cell wall of baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) considered in relation to its ultra-structure. **Biochemical Journal**, v. 114, p. 557 – 567, 1969.

- BACON, J.S.D.; GORDON, A.H.; JONES, D.; TAYLOR, I.F.; WEBLEY, D.M. The separation of  $\beta$ -glucanase produced by *Cytophaga johnsonii* and their role in the lysis of yeast cell walls. **Biochemical Journal**, v. 120, p. 67 – 78, 1970.
- BAGGA, P.S.; SANDHU, D.K.; SHAMA, S. Purifications and characterizations of cellulolytic enzymes produced by *Aspergillus nidulans*. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 68, n<sup>o</sup> 1, p. 6 – 68, 1990.
- BALLANCE, G.M.; MANNERS, D.J. Partial purification and properties of an endo-1,3- $\beta$ -D-glucanase from germinated rye. **Phytochemistry**, v. 17, n<sup>o</sup> 9, p. 1539 – 1543, 1978.
- BIELECKI, S.; WNUK, M.; SZCZESNA, M.; BOLOWICZ-LASSOCINSKA, T.; ANTCZAK, T.; GALAS, E. 1,3- $\beta$ -glucanase from *Streptomyces* sp. 1228 Lytic Enzyme System. **Biotechnology Letters**, v. 11, n<sup>o</sup> 4, p. 281 – 286, 1989.
- BOHME, H. Effect of enzyme supplements for growing pigs. **Landbauforschung-Volkenrode**, v. 40, n<sup>o</sup> 3, p. 213 – 217, 1990.
- BURTSEVA, Y.V.; SOVA, V.V.; PIVKIN, M.V.; ZVYAGINTSEVA, T.N. Enzymes of carbohydrate metabolism of mycelial fungi from marine environments.  $\beta$ -1,3-glucanase of the marine fungus *Chaetomium indicum*. **Biochemistry**, v. 65 n<sup>o</sup> 10, p. 1175 – 1183, 2000.
- CHAMBERS, R.S.; BROUGHTON, M.J.; CANNON, R.D.; CARNE, A.; EMERSON, G.W.; SULLIVAN, P.A. An exo- $\beta$ -(1,3)-glucanase of *Candida albicans*: purification of the enzyme and molecular cloning of the gene. **Journal of General Microbiology**, v. 139, p. 325 – 334, 1993.
- CHATELAIN & SECOND (1966). Genus *Oerskovia* Prauser, LECHEVALIER & LECHEVALIER (1970). In: WILLIAMS, S.T.; SHARPE, M.E.; HOLT, J.G. **Bergey Manual of Systematic Bacteriology**, (P.H.A. Sneath, N.S. Mair, M.E. Sharp & J.G. Holt, eds.) vol. 2, Baltimore, Ed. Williams & Wilkins, pp 1489 – 1491, 1989).
- COLLINS, C.H. & LYNE, P.M. Counting micro-organisms. In: **Microbiological methods**, IX Chapter, Ed. ISBN 0 408, Been, Sevenoaks, Kent TN15 8PH, England, pp 129 - 141, 1989.
- COLLINS, M.D.; CUMMINS, C.S. Genus *Corynebacterium* Lehmann and Neumann 1896, In: WILLIAMS, S.T.; SHARPE, M.E.; HOLT, J.G. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, pp 1266 – 1283. (P.H.A. Sneath, N.S.

- Mair, M.E. Sharpe & J.G. Holt, eds.) vol. 2, Baltimore, Ed. Williams & Wilkins, 1989.
- COLLINS, M.D.; GOODFELLOW, M.; MINNIKIN, D.E. Isoprenoid quinone composition in the classification of coryneform and related bacteria. **Journal of General Microbiology**, v. 110, n<sup>o</sup> 1, p. 127 – 136, 1979.
- COPA-PALATIÑO, J.L.; REYES, F.; PÉREZ-LEBLIC, M.I. Purification and properties of a 1,3- $\beta$ -glucanase from *Penicillium oxalicum* autolysates. **FEMS Microbiology Letters**, v. 65, p. 285 – 292, 1989.
- CRUZ, J.; PINTOR-TORO, J.A.; BENITEZ, T.; LLOBELL, A. Purification and characterization of an endo- $\beta$ -1,6-glucanase from *Trichoderma harzianum* that is related to its mycoparasitism. **Journal of Bacteriology**, v. 177, n<sup>o</sup> 7, p. 1864 – 1871, 1995.
- DAVIS, B.J. Disc electrophoresis. 2. Method and application to human serum proteins. **Annals of New York Academy Science**, USA, v. 121, p. 404 – 427, 1964.
- DOI, K.; DOI, A. Cloning and expression in *Escherichia coli* of the gene for an *Arthrobacter*  $\beta$ -(1,3)-glucanase. **Journal Bacteriology**, v. 168, n<sup>o</sup> 3, p. 1272 – 1276, 1986.
- DOI, K.; DOI, A.; FUKUI, T. Purification and properties of lytic  $\beta$ -glucanase from an *Arthrobacter* bacterium. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 37, p. 1619 – 1627, 1973.
- DUCROO, P.; DELECOURT, R. Enzymatic hydrolysis of barley  $\beta$ -glucans. **Wallerstein Laboratories Communications**, v. 35, n<sup>o</sup> 118, 1972.
- EL-KATATNY, M.H.; GUDELJ, M.; ROBRA, K.H.; ELNAGHY, M.A.; GUBITZ, G.M. Characterization of a chitinase and an endo- $\beta$ -1,3-glucanase from *Trichoderma harzianum* Rifai T24 involved in control of the phytopathogen *Sclerotium rolfsii*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 56, n<sup>o</sup> 1-2, p. 137 – 143, 2001.
- FERRER, P.; HALKIER, T.; HEDEGARD, L.; SAUVA, D.; DIERS, I.; ASENJO, J.A. Nucleotide sequence of a  $\beta$ -1,3-glucanase isoenzyme IIA gene of *Oerskovia xanthineolytica* LLG 109 (*Cellulomonas cellulans*) and initial characterization

- of the recombinant enzyme expressed in *Bacillus subtilis*. **Journal of Bacteriology**, v. 178, n<sup>o</sup> 15, p. 4751 – 4757, 1996.
- FLEET, G.H.; MANNERS, D.J. Isolation and composition of an alkali-soluble glucan from the cell walls of *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of General Microbiology**, v. 94, p. 180 – 192, 1976.
- FUJINO, S.; KITAMURA, K.; KANEKO, T.; YAMAMOTO, Y. Preparation of yeast extract by cell wall lytic enzyme. **Journal of Fermentation Technology**, v. 52, n<sup>o</sup> 11, p. 828 – 836, 1974.
- FUNATSU, M.O.H.; AIZONO, Y.; SHIMODA, T. Protease of *Arthrobacter luteus*, properties and function on lysis of viable yeast cell. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 42, p. 1975 – 1977, 1978.
- GACTO, M; VICENTE-SOLER, J; CANSADO, J; VILLA, T.G. Characterization of an extracellular enzyme system produced by *Micromonospora chalcea* with lytic activity on yeast cells. **Journal of Applied Microbiology**, v. 88 n<sup>o</sup> 6, p. 961-7, 2000.
- GALAN, B; GARCIA – MENDOZA, C; CALONJE, M; NOVAES – LEDIEU, M. News & notes: production, purification, and properties of an endo-1, 3-beta-glucanase from the basidiomycete *Agaricus bisporus*. **Current Microbiology**, v. 38 n<sup>o</sup> 3, p. 190 – 193, 1999.
- GLANDORF, D.C.M.; BAKKER, P.A.H.M.; LOON, L.C-van; VAN-LOON, L.C. Influence of the production of antibacterial and antifungal proteins by transgenic plants on the saprophytic soil microflora. **Acta Botanica Neerlandica**, v. 46, n<sup>o</sup> 1, p. 85 – 104, 1997.
- GOMI, K.; OKAZAKI, N.; TANAKA, T.; KUMAGAI, C.; INOUE, H.; IIMURA, Y.; HARA, S. Applications of a fungal cell wall lytic enzyme produced by *Oerskovia* sp. Ck. II. Estimation of mycelial weight in rice koji. **Journal of the Brewing Society of Japan Nippon Jozo Kyokai Zasshi**, v. 82, n<sup>o</sup> 2, p. 130 – 133, 1987.
- GOTO-YAMAMOTO, N.; SATO, S.; MIKI, H.; PARK, Y.; TADENUMA M. Taxonomic studies on yeast-lysing bacteria, and a new species *Rarobacter incanus*. **Journal General Applied Microbiology**, v. 39, p. 261 – 272, 1993 a.

- GOTO-YAMAMOTO, N.; SATO, S.; MIKI, H.; PARK, Y.; TADENUMA, M. Isolation of yeast-lysing bacteria in Brazil. **Report of Research Institute of Brewing**, v. 165, p. 37 – 43, 1993 b.
- GURR, S.J.; McPHERSON, M.J.; BOWLES, D.J. Molecular plant pathology. A practical approach. Ed. D. Rickwood & B.D. Hames, vol. II, p. 27 – 30, 1992.
- HAHN, M.; OLSEN, O; POLITZ, O.; BORRISS, R.; HEINEMANN, U. Crystal Structure and site-directed mutagenesis of *Bacillus macerans* endo-1,3-1,4- $\beta$ -glucanase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n<sup>o</sup> 7, 3081 – 3088, 1995.
- HAN, Y.W.; SRINIVASAN, V.R. Genus *Cellulomonas*, Bergey et al., (1923). pp 1325 – 1329. In: In: WILLIAMS, S.T.; SHARPE, M.E.; HOLT, J.G. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, (P.H.A. Sneath, N.S. Mair, M.E. Sharpe & J.G. Holt, eds.) vol. 2, Baltimore, Ed. Williams & Wilkins, 1989.
- HASUO, T.; YAMAMOTO, N.; SAITO, K.; TADENUMA, M. Studies on yeast-lysing microorganism (1). Isolation of a yeast-lysing microorganism from activated sludge and its characteristics. **Journal of the Brewing Society of Japan Nippon Jozo Kyokai Zasshi**, v. 79, p. 510 – 516, 1984.
- HAYASHI, K.; SEINO, A.; KASUMI, T.; KUBO, N; TSUMURA, N. Bacteriolytic enzyme produced by *Streptomyces* sp. **Journal of Fermentation Technology**, v. 59, n<sup>o</sup> 4, p. 319 – 323, 1981a.
- HAYASHI, K.; SEINO, A.; KASUMI, T.; KUBO, N; TSUMURA, N. Purification and characterization on the lytic enzyme produced by *Streptomyces rutgeersensis* H-46. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 45, n<sup>o</sup> 10, p. 2289 – 2300, 1981b.
- HINTON, D.M.; PRESSEY, R. Glucanases in Fruits and vegetables. **Journal of American Society for Horticultural Science**, v. 105, n<sup>o</sup> 4, p. 499 – 502, 1980.
- HUANG, R.B.; ANDREWS, B.A.; ASENJO, J.A. Differential Product Release (DPR) of Proteins from Yeast: A New Technique for Selective Product Recovery from Microbial Cell. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 38, p. 977 – 985, 1991.

- HUBER, D.J.; NEVINS, D.J. Partial purification of endo and exo- $\beta$ -D-glucanase enzymes from *Zea mays* L. seedlings and their involvement in cell-wall autohydrolysis. **Planta**, v. 151, n<sup>o</sup> 3, p. 206 – 214, 1981.
- HUNTER, J.B.; ASENJO, J.A. Kinetics of enzymatic and disruption of yeast cells: II. A simple model of Lysis kinetics. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 30, p. 481 – 490, 1987.
- HUNTER, J.B.; ASENJO, J.A. A structured mechanistic model of the kinetics of enzymatic lysis and disruption of yeast cell. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 31, p. 929 – 943, 1988.
- JEROCH, H. Enzymes improve suitability of rye for broilers. **Krafftutter**, v. 8, p. 354 – 356, 1991.
- JI, C.; KUC, J. Purification and characterization of and acidic  $\beta$ -1,3-glucanase from *Cucumber* and its relationship to systemic disease resistance induced by *Colletotrichum lagenarium* and *Tobacco* necrosis virus. **Molecular Plant Microbe Interactions**, v. 8, n<sup>o</sup> 6, 899 – 905, 1995.
- KANEKO et al., (1969). Genus *Oerskovia* Prauser, LECHEVALIER & LECHEVALIER (1970). In: WILLIAMS, S.T.; SHARPE, M.E.; HOLT, J.G. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, (P.H.A. Sneath, N.S. Mair, M.E. Sharpe & J.G. Holt, eds.) vol. 2, Baltimore, Ed. Williams & Wilkins, pp 1489 – 1491, 1989).
- KANEKO, T.; KITAMURA, K.; YAMAMOTO, Y. Susceptibilities of Yeasts Cell Wall Lytic Enzyme of *Arthrobacter luteus*. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 37, n<sup>o</sup> 10, p. 2295 – 2302, 1973.
- KANZAWA, Y.; KURASAWA, T.; KANEGAE, Y. Purification and properties of a new exo-(1-3)- $\beta$ -D-glucanase from *Bacillus circulans* YK9 capable of hydrolysing resistant curdlan with formation of only laminaribiose. **Microbiology- UK.**, v. 140, p. 637 – 642, 1994.
- KAPTEYN, J. C., VAN DEN ENDE, H. KLIS, F.M. The contribution of cell wall proteins to the organization of the yeast cell wall. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1426, pp. 373 – 383, 1999.
- KAPTEYN, J. C., et al. The cell wall architecture of *Candida albicans* wild-type cells and cell wall- defective mutants. **Molecular Microbiology**, v. 35, pp. 601 – 611, 2000.

- KATOHDA, S., ABE, N., MATSUI, M.; HAYASHIBE, M. Polysaccharide composition of the cell wall of baker's yeast with special reference to cell walls obtained from large- and small-sized cells. **Plant Cell Physiology**, v.17, p. 909 – 919, 1976.
- KEDDIE, R.M.; Genus *Cellulomonas*. In: WILLIAMS, S.T.; SHARPE, M.E.; HOLT, J.G. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, (P.H.A. Sneath, N.S. Mair, M.E. Sharpe & J.G. Holt, eds.) Baltimore: Williams & Wilkins, 1989, vol. 4, pp 1326.
- KEDDIE, R.M.; COLLINS, M.D.; JONES, D. Genus *Arthrobacter* CONN & DIMMICK (1947). In: WILLIAMS, S.T.; SHARPE, M.E.; HOLT, J.G. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, (P.H.A. Sneath, N.S. Mair, M.E. Sharpe & J.G. Holt, eds.), Baltimore: Williams & Wilkins, 1989, vol. 4, p 1288 – 1301.
- KEITEL, T.; SIMON, O.; BORRIS, R.; HEINEMANN, U. Molecular and active-site structure of a *Bacillus* 1,3- 1,4-  $\beta$ -glucanase. **Proceedings of National Academy of Sciences of USA**, **90**: 5287 – 5291, 1993.
- KÉRY, V.; KOGAN, G.; ZAJACOVÁ, K.; MASLER, L.; ALFOLDI, J. Hydrolysis of yeast cell-wall glucan by extracellular (1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -glucanases from *Aspergillus niger*. **Enzyme Microbiology and Technology**, v. 13, p. 87 – 90, 1991.
- KITAJIMA, E. W. **Microscopia eletrônica de varredura**. Instituto de Biologia- UNICAMP. Laboratório de Microscopia Eletrônica, 68p, 1999.
- KITAMURA, K. A high yeast wall lytic enzyme-producing mutant of *Arthrobacter luteus*. **Journal of Fermentation Technology**, v. 60, n<sup>o</sup> 3, p. 253 – 256, 1982a.
- KITAMURA, K. A protease that participates in yeast cell wall lysis during zymolyase digestion. **Agricultural and Biology Chemistry**, v. 46, n<sup>o</sup> 8, 2093 – 2099, 1982b.
- KITAMURA, K. Preparation of yeast cell wall lytic enzyme from *Arthrobacter luteus* by its adsorption on  $\beta$ -glucan. **Journal of Fermentation Technology**, v. 60, n<sup>o</sup> 3, p. 257 – 260, 1982c.
- KITAMURA, K. Re-examination of zymolyase purification. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 46, n<sup>o</sup> 4, p. 963 – 969, 1982d.

- KITAMURA, K.; KANEKO, T.; YAMAMOTO, Y. Lysis of viable yeast cells by enzymes of *Arthrobacter luteus*. II. Purification and properties of an enzyme, zymolyase, which lyses viable yeast cells. **Journal General Applied Microbiology**, v. 20, p. 323 – 344, 1974.
- KITAMURA, K.; YAMAMOTO, Y. Purification and properties of an enzyme, zymolyase, which lyses viable yeast cells. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 153, p. 403 – 406, 1972.
- KLIS, F.M. Review: Cell wall assembly in yeast. **Yeast**, v.10, p. 851 – 869, 1994.
- KOMURA, I.; KANO, H.; YAMADA, K.; KUMAGAI, C.; YAMASHITA, K.; NUNOKAWA, Y. Taxonomic study of a strain producing yeast cell wall lytic enzymes. **Journal of Fermentation Technology**, v. 53, n<sup>o</sup> 5, p. 249 – 255, 1975.
- KOPECKÁ, M.; PHAFF, H.J.; FLEET, G.H. Demonstration of a fibrillar component in the cell wall of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* and its chemical nature. **The Journal of Cell Biology**, v. 62, p. 66 – 76, 1974.
- KOTAKE, T.; NAKAGAWA, N.; TAKEDA, D.; SAKURAI, N. Purification and characterization of wall-bound exo-1,3- $\beta$ -glucanase from barley (*Hordeum vulgare* L.) seedlings. **Plant and Cell Physiology**, v. 38 n<sup>o</sup> 2, p. 194 – 200, 1997.
- KREGER, D.R.; KOPECKA. On the nature and formation of the fibrillar nets produced by protoplasts of *Saccharomyces cerevisiae* in liquid media: An electronmicroscopic, X-Ray diffraction and chemical study. **Journal of General Microbiology**, v. 92, p. 207 – 220, 1976.
- LAMPEN, J.O. External enzymes of yeast: their nature and formation. **Antonie van Leeuwenhok**, v. 34, p. 1, 1968.
- LEAH, R.; TOMMERUP, H.; SVENDSEN, IB.; MUNDY, J. Biochemical and molecular characterization of three barley seed proteins with antifungal properties. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 266, n<sup>o</sup> 3, p. 1564–1573, 1991.
- LECHEVALIER, H.A; LECHEVALIER, M.P. Genus *Oerskovia* Prauser. In: WILLIAMS, S.T.; SHARPE, M.E.; HOLT, J.G. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, (P.H.A. Sneath, N.S. Mair, M.E. Sharpe & J.G. Holt, eds.). Baltimore: Williams & Wilkins, 1989, pp 1489 – 1491, vol. 2

- LEE, J.S.; CHUN, C.O.; HECTOR, M.; KIM, S.B.; KIM, H.J.; PARK, B.K.; JOO, Y.J.; LEE, H.J.; PARK, C.S.; AHN, J.S.; PARK, Y.H.; MHEEN, T.I. Identification of *Leuconostoc* strains isolated from kimchi using carbon-source utilization patterns. **The Journal of Microbiology**, v. 35, n<sup>o</sup> 1, p. 10 – 14, 1997.
- LEE, J.S.; CHUN, C.O.; HECTOR, M.; KIM, H.J.; JOO, Y.J.; LEE, H.J.; PARK, C.S.; AHN, J.S.; PARK, Y.H.; MHEEN, T.I. Analysis of cellular fatty acid methyl esters (FAMES) for the isolation of *Leuconostoc* strains isolated from kimchi. **The Journal of Microbiology**, v. 34, n<sup>o</sup> 3, p. 225 – 228, 1996.
- LINEWAVER, H.; BURK, D. The determination of enzyme dissociation constants. **Journal of the American Chemistry Society**, v. 56, p. 658 – 666, 1934.
- LIU, L.C.; PROKOPAKIS, G.J.; ASENJO, J.A. Optimizations of enzymatic lysis of yeast. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 32, p. 1113 – 1127, 1988.
- LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, L.A.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological and Chemistry**, v. 193, p. 265 – 275, 1951.
- MAC FADDIN, J.F. Biochemical tests for identification of medical bacterial. 2d ed, Baltimore: Willians & Wilkins Co, c1980, 527p.
- MacWILLIAM, I.C. The structure and functions of the yeast cell wall- a review. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 76, p. 525 – 535, 1970.
- MADA, M.; HIRAO, K.; KITAMURA, Y.; MACHIDA, K. Lytic enzyme of basidiomycetes acting on yeast cells. 3. Some properties of purified lytic enzyme. **Journal of the Agricultural Chemical Society of Japan**, v. 45 n<sup>o</sup> 6; p. 269, 1971.
- MANNERS, D.J.; MASSON, A.J.; PATTERSON, J.C. The structure of a  $\beta$ -(1,3)-D-glucan from yeast cell walls. **Biochemistry Journal**, v. 135, p. 19 – 30, 1973.
- MAUCH, F.; HADWIGER, L.A.; BOLLER, T. Antifungal hydrolases in pea tissue. **Plant Physiology**, v. 87, p. 325 – 333, 1988.
- McCOLLUM, T.G.; DOOSTDAR, H.; MAYER, R.T.; McDONALD, R.E. Characterization of chitinases and  $\beta$ -1,3-glucanases in grape fruit flavedo during fruit development. **Physiologia Plantarum**, v. 99, p. 486 – 494, 1997.
- METCALF & BROWN (1957). Genus *Cellulomonas*, Bergey et al., (1923). In: WILLIAMS, S.T.; SHARPE, M.E.; HOLT, J.G. **Bergey's Manual of**

- Systematic Bacteriology**, pp 1325 – 1329, (P.H.A. Sneath, N.S. Mair, M.E. Sharpe & J.G. Holt, eds.) vol. 2, Baltimore, Ed. Williams & Wilkins, 1989.
- MILLER, L.T. Single derivatization method for routine analysis of bacterial whole-cell fatty acid methyl esters, including hydroxy acid. **Journal Clinical Microbiology**, v. 18, p. 861 – 867, 1982.
- MINNIKIN, D.E.; COLLINS, M.D.; GOODFELLOW, M. Fatty acid and polar lipid composition in the classification of *Cellulomonas*, *Oerskovia* and related taxa. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 47, p. 87 – 95, 1979.
- MOLINA. M.; CENAMOR, R.; SANCHEZ, M.; NOMBELA, C. Purification and some properties of *Candida albicans* exo-1,3- $\beta$ -glucanase. **Journal of General Microbiology**, v. 135, p. 309 – 314. 1989.
- MORITA, T.; HARA, S.; MATSUSHIMA, Y. Purification and characterization of lysozyme produced by *Streptomyces erythraeus*. **Journal Biochemical**, v. 83, p. 893 – 903, 1978.
- MORRISSEY, J. Silver stain for protein in polyacrylamide gels: A modified procedure with enhanced uniform sensitivity. **Analytical Biochemistry**, v. 117, p. 307 – 310, 1981.
- MISHRA, C; SEMINO, C.E.; MCCREATH, K.J.; De La VEGA, H.; JONES, B.J.; SPECHT, C.A.; ROBBINS, P.W. Cloning and expression of two chitin deacetylase genes of *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, v. 13: 327 – 336, 1997.
- MRSA, V.; TANNER, W. Role of NaOH – extractable cell wall protein Ccw5p, Ccw6p, Ccw7p and Ccw8p (members of the Pir protein family) in stability of the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. **Yeast**, v. 15 n<sup>o</sup> 10A, p. 813 – 820, (1999).
- MRSA, V.; ECKER, M.; STRAHL-BOLSINGER, S.; NIMTZ, M.; LEHLE, L.; TANNER, W. Deletion of new covalently linked cell wall glycoproteins alters the electrophoretic mobility of phosphorylated wall components of *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Bacteriology**, v. 181, n<sup>o</sup> 10: 3076 – 3086, (1999).
- NAGASAKI, S.; NISHIOKA, T.; MORI, H.; YAMAMOTO, S. Purification and properties of lytic  $\beta$ -1,3-glucanase from *Flavobacterium dormitator* var.

- glucanolyticae*. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 40, p. 1059 – 1067, 1976.
- 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. **Journal of Fermentation Technology**, v. 66, n<sup>o</sup> 3, p. 245 – 250, 1988.
- NEUHOLFF, V.; AROLD, N.; TAUBE, D.; EHRHARDT, W. Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. **Electrophoresis**, v. 9, p. 255 – 262, 1988.
- NORONHA, E.F.; ULHOA, C.J. Purification and characterization of an endo- $\beta$ -1,3-glucanase from *Trichoderma harzianum*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 42, n<sup>o</sup> 10, p. 1039 – 1044, 1996.
- NORONHA, E.F.; KIPNIS, A.; JUNQUEIRA-KIPNIS, A.P.; ULHOA, C.J. Regulation of 36-kDa  $\beta$ -1,3-glucanase synthesis in *Trichoderma harzianum*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 188 n<sup>o</sup> 1, p. 19 – 22, 2000.
- NORONHA, E.F.; ULHOA, C.J. Characterization of a 29-kDa beta-1,3-glucanase from *Trichoderma harzianum*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 183 n<sup>o</sup> 1, p. 119 – 23, 2000.
- OBATA, T., FUJIOKA, K., HARA, S., NAMBA, Y. The synergistic effects among  $\beta$ -1,3-glucanases from *Oerskovia* sp. CK on lysis of viable yeast cell. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 41, p. 671 – 677, 1977a.
- OBATA, T.; YAMASHITA, K.; FUJIOKA, K.; HARA, S.; AKIYAMA, H. Purification of  $\beta$ -1,3-glucanases from highly lytic enzyme produced by *Oerskovia* sp and their properties. **Journal of Fermentation Technology**, v. 54, n<sup>o</sup> 9, p. 64 – 648, 1976.
- OBATA, T.; IWATA, H.; NAMBA, Y. Proteolytic enzyme from *Oerskovia* sp. CK lysing viable yeast cells. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 41, n<sup>o</sup> 12, p. 2387 – 2394, 1977b.
- OKADA, T.; AISAKA, M.; AINDA, K.; NIKAIDON, N.; TANAKA, H.; WATANABE, T. Structure of the gene encoding  $\beta$ -1,3-glucanase B of *Bacillus circulans* WL-12. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 3, p. 229 – 236, 1995.

- 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. **Biotechnology Letters**, v. 5, n<sup>o</sup> 11, p. 731 – 736, 1983.
- OSUMI, M. The ultrastructure of yeast: cell wall structure and formation. **Micron**, v. 29 n<sup>o</sup> 2 – 3, p. 207 – 33, 1998.
- PARASCANDOLA, P.; ALTERIIS, E.; ZUECO, J.; RICO, H.; SENTANDREU, R. Cell-wall alterations in gel-immobilized *Saccharomyces cerevisiae* cells. **Yeast**, 11: spec. Iss, s582, 1995.
- PARRADO, J.; ESCUREDO, P.R.; CONEJERO-LARA, F.; KOTIK, M.; PONTING, C. P.; ASENJO, J.A.; DOBSON, C.M. Molecular characterization of a thermoactive  $\beta$ -1,3-glucanase from *Oerskovia xanthineolytica*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1296, p. 145 – 151, 1996.
- PITSON, S.M.; SEVIOUR, R.J.; McDOUGALL, B.M. Production of  $\beta$ -glucanase degrading enzymes by *Acremonium* and *Cephalosporium* species. **Mycological Research**, v. 101, n<sup>o</sup> 2, p. 153 – 158, 1997 a.
- PITSON, S.M.; SEVIOUR, R.J.; McDOUGALL, B.M.; WOODCOPA, J.R.; STONE, B.A. Purification and characterization of three extracellular (1,3)- $\beta$ -D-glucan glucohydrolases from the filamentous fungus *Acremonium persicinum*. **Biochemistry**, v. 308, p. 733 – 741, 1995.
- PITSON, S.M.; SEVIOUR, R.J.; McDOUGALL, B.M. Purification and characterization of an extracellular  $\beta$ -1,3-glucosidase from the filamentous fungus *Acremonium persicinum* and its probable role in  $\beta$ -glucanase degradation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 21 (3), p. 182 – 190, 1997b.
- POPOLO, L.; VAI, M. The gas1 glycoprotein, a putative wall polymer cross-linker. **Biochimica et Biophysica Acta-General Subjects**, v. 1426 (2), p. 385 – 400, 1999.
- RICHTER, G.; STOLKEN, B.; HAFNER, B. Enzymes in broiler feeding. **Okologische Aspekte extensiver Landbewirtschaftung**, p. 419 – 422, 1992.
- ROGOSA, M.; CUMMINS, C.S.; LELLIOT, R.A.; KEDDIE, R.M. Coryneform group. WILLIAMS, S.T.; SHARPE, M.E.; HOLT, J.G. of bacteria. In: WILLIAMS,

- S.T.; SHARPE, M.E.; HOLT, J.G. **Bergey's Manual of determinative bacteriology**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1989, v.4, p 599 – 632.
- ROWLEY, B.I.; BULL, A.T. Isolation of a yeast-lysing *Arthrobacter* species and production of the lytic enzyme complex in batch and continuous-flow fermentors. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 19, p. 879 – 899, 1977.
- RUTTLOFF, H. Recent developments in the application of enzymes in food production. **GBF-Monographien**, v. 11, p. 107 – 121, 1989.
- RYAN, E.; WARD, O. The application of lytic enzymes from *Basidiomycete aphyllorphoroles* in production of yeast extract. **Process Biochemistry**, 12 – 16, 1988.
- SAEKI, K.; IWATA, J.; YAMAZAKI, S.; WATANABE, Y.; TAMAI, Y. Purification of a yeast lytic  $\beta$ -1,3-glucanase from *Oerskovia xanthineolytica* TK-1. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, 78 (6), p. 407 – 412, 1994.
- SAITO, K.; HASUO, T.; YAMAMOTO, N.; TADENUMA, M. Yeast-lytic enzymes of *Rarobacter faecitabidus* YLM-1. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 52, n<sup>o</sup> 7, p. 1849 – 1850, 1988.
- SALAZAR, O.; MOLITOR, J.; LIENQUEO, M.E.; ASENJO, J.A. Overproduction, purification and characterization of  $\beta$ -1,3-glucanase type II in *Escherichia coli*. **Protein Expression and Purification**, v. 23, n<sup>o</sup> 2, p. 219 – 225, 2001.
- SANCHEZ, A., NEBREDA, A.R.; VILLA, T.G. Self-associating properties of yeast exo- $\beta$ -1,3-glucanase are dependent on the ionic strength. **FEBS Letters**, v.145, p. 213 – 216, 1982.
- SANDHU, D.K.; WADHWA, V.; BAGGA, P.S. Use of lytic enzymes for protoplast production in *Trichoderma reesei* QM9414. **Enzyme Microbiology Technology**, v. 11, p. 21 – 25, 1989.
- SAWADA, H.; AZEGAMI, M.; ISHII, S. Lytic enzyme produced by *Pseudomonas aeruginosa* concomitantly with bacteriophage PS17. Purification, characterization and comparison with PR1-Lysozyme. **Journal Biochemical**, v. 89, p. 275 – 284, 1981.
- SCOTT, J.H.; SCHEKMAN, R. Lyticase: endoglucanase and protease activities that act together in yeast cell lysis. **Journal of Bacteriology**, v. 142, p. 414 – 423, 1980.

- SHIMOI, H.; MURANAKA, Y.; SATO, S.; SAITO, K.; TADENUMA, M. Purification of the enzymes responsible for the lysis of yeast cell by *Rarobacter faecitabidus*. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 55, p. 371 – 378, 1991.
- SHIMOI, H.; TADENUMA, M. Characterization of *Rarobacter faecitabidus* protease I, a yeast-lytic serine protease having mannose-binding activity. **Journal Biochemistry**, v. 110, p. 608 – 613, 1991.
- SINGH, A.; KUHAD, R.C.; SAHAI, V.; GHOSH, P. Evaluation of biomass. **Advances in Biochemical Engineering and Biotechnology**, v. 51, p. 47 – 70, 1994.
- SISTROM, W.R. On the physical state of the intracellularly accumulated substrates of  $\beta$ -galactosidase-permease in *Escherichia coli*. **Biochemistry and Biophysical Acta**, v. 29, p. 579 – 587, 1958.
- SOMOGYI, M. Notes on sugar determination. **Journal Biochemistry and Chemical**, v. 195, p. 19 - 23, 1952.
- SOROKOLETOVA, E.P.; LAVRENT' EV, G.I. Production of protoplasts of the fungus *Penicillium solitum* and variability of regenerants with respect to lipase formation. **Prikladnaya Biokhimiya I Mikrobiologiya**, v. 28, n<sup>o</sup> 5, p. 716 – 719, 1992.
- STACKEBRANDT & KANDLER (1980). Genus *Cellulomonas*, Bergey et al., (1923). In: WILLIAMS, S.T.; SHARPE, M.E.; HOLT, J.G. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, pp 1325 – 1329. (P.H.A. Sneath, N.S. Mair, M.E. Sharpe & J.G. Holt, eds.) vol. 2, Baltimore, Ed. Williams & Wilkins, 1989.
- STACKEBRANDT, E.; KEDDIE, R. M. Genus *Cellulomonas*, Bergey et al., (1923). In: WILLIAMS, S.T.; SHARPE, M.E.; HOLT, J.G. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, pp 1325 – 1329, (P.H.A. Sneath, N.S. Mair, M.E. Sharpe & J.G. Holt, eds.) vol. 2, Baltimore, Ed. Williams & Wilkins, 1989.
- STACKEBRANDT, E.; PRAUSER, H. Assignment of the Genera *Cellulomonas*, *Oerskovia*, *Promicromonospora* and *Jonesia* to *Cellulomonadaceae* fam. nov. **Systematic Applied Microbiology**, v. 14, p. 261 – 265, 1991.
- STACKEBRANDT, E.; SEILER, H.; SCHLEIFER, K.H. Union of the genera *Cellulomonas* Bergey et al. and *Oerskovia* Prauser et al., in a redefined

- genus *Cellulomonas*. **Zentralblatt fuer Bakteriologie Mikrobiologie und Hygiene, I Abteilung Originale C**, v. 3, p. 401 – 409, 1982.
- STACKEBRANDT, E.; WOESE, C.R. Towards a phylogeny of the actinomycetes and related organisms. **Current Microbiology**, v. 5, p.197 – 202, 1981.
- STOPPOK et al. (1982). Genus *Cellulomonas*, Bergey et al. (1923) - STACKEBRANDT, E.; KEDDIE, R. M. In: WILLIAMS, S.T.; SHARPE, M.E.; HOLT, J.G. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology** (P.H.A. Sneath, N.S. Mair, M.E. Sharpe & J.G. Holt, eds.), Baltimore: Williams & Wilkins, 1989, vol. 2, pp 1325 – 1329.
- STRATFORD, M. Another brick in the wall? Recent developments concerning the yeast cell envelope. **Yeast**, v. 10, p. 1741 – 1752, 1994.
- TANGARONE, B.; ROYER, J.C.; NAKAS, J.P. Purification and characterization of an endo- $\beta$ -1,3-D-glucanase from *Trichoderma longibrachiatum*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 55, n<sup>o</sup> 1, p. 177 – 184, 1989.
- TAVERNER, M.R.; CAMPBELL, R.G.; BURACZEWSKA, L.; BURACZEWSKA, S.; PASTUZEWSKA, B.; ZEBROWSKA, T. The effects of protected dietary enzymes on nutrient adsorption in pigs. **Proceedings of the 4<sup>th</sup> International Seminar held in Jablonna, Poland**, p. 377, 1988.
- THRANE, C.; TRONSMO, A.; JENSEN, D.F. Endo-1,3- $\beta$ -glucanase and cellulase from *Trichoderma harzianum*: purification and partial characterization, induction of and biological activity against plant pathogenic *Pythium* spp. **European Journal of Plant Pathology**, v. 103, p. 331 – 344, 1997.
- TREVELYAN, W.E, PROCTER, D.P.; HARISSON, J.G. Detection of sugars on paper chromatograms. **Nature**, v.166, p. 444 – 445, 1954.
- TOTSUKA, A.; USUI, T. Separation and characterization of the endo  $\beta$ -(1,3)-D-glucanase from *Rhizotonia solani*. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 50, n<sup>o</sup> 3, p. 543 – 550, 1986.
- UEDA, S.; NANRI, N. Production of isoamylase by *Escherichia intermedia*. **Applied Microbiology**, v. 15, n<sup>o</sup> 4, p. 492 – 496, 1967.
- USUI, T.; OGUCHI, M. Purification of a protease from *Rhizoctonia solani* lysing yeast cell walls. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 50, p. 535 – 537, 1986.

- VALENTIN, E.; HERRERO, E.; RICO, H.; MIRAGALL, F.; SENTANDREU, R. Cell wall mannoproteins during the population grown phases in *Saccharomyces cerevisiae*. **Archives Microbiology**, v. 148, p. 88 – 94, 1987.
- VAN DER VAART, J.M.; CARO H.L.P.; CHAPMAN, J.W.; KLIS, F.M.; VERRIPS, T. Identification of three mannoproteins in the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Bacteriology**, v. 177, n<sup>o</sup> 11, p. 3104 – 3110, 1995.
- VENTOM, A., M.; ASENJO, J., A. Characterization of yeast lytic enzymes from *Oerskovia xanthineolytica* LL-G109. **Enzymes Microbial Technology**, v. 13, p. 71 – 75, 1991.
- VENTOM, A., M.; ASENJO, J., A. Purification of the major glucanase of *Oerskovia xanthineolytica* LL-G109. **Biotechnology Techniques**, v. 4, n<sup>o</sup> 3, p. 165 – 170, 1990 a.
- VENTOM, A., M.; ASENJO, J., A. Two extracellular proteases from *Oerskovia xanthineolytica* LL-G109. **Biotechnology Techniques**, v. 4, n<sup>o</sup> 3, 171 – 176, 1990 b.
- VOGELSANG, R.; WOLFGANG, B. Purification, characterization and differential hormonal regulation of a  $\beta$ -1,3-glucanase and two chitinases from chickpea (*Cicer arietinum* L.). **Plant**, v. 189, p. 60 – 69, 1993.
- WARD, J.B.; PERKINS, H.R. The purification and properties of two staphylolytic enzymes from *Streptomyces griseus*. **Biochemistry Journal**, v. 106, p. 69 – 75, 1968.
- WATANABE, R.; OGASAWARA, N. The role of mannan-degrading enzymes in the lysis of some plant pathogenic filamentous fungi, *Glomerella* species. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 54, n<sup>o</sup> 2, p. 541 – 542, 1990.
- WEBLEY, D.M.; DUFF, R. B.; BACON, J.S.D.; FAMER, V.C. (1965). A study of polisaccharide-producing organisms occurring in root region of certain pasture grasses. **Journal Soil Science**, v. 16, n<sup>o</sup> 1, p. 149, 1965.
- WENK, C; LYONS, T.P. Biotechnology in the feed industry. **Proceedings of Altech's Sixth Annual Symposium**, p. 315 – 330, 1990a.
- WENK, C; LYONS, T.P. Yeast cultures, lactobacilli and a mixture of enzymes in diets for growing pigs and chickens under Swiss condiction: influence on the utilization of the nutrients and energy. Biotechnology in the feed industry. **Proceedings of Altech's Sixth Annual Syposium**, p. 315 – 330, 1990b.

- WERNER, L.; LATZOKO, F.; HAMPEL, W. S. Spraydrying of yeast lytic enzymes from *Arthrobacter* sp. **Biotechnology Techniques**, v. 7, n<sup>o</sup> 9, p. 663 – 666, 1993.
- YAMADA, K.; KOMAGATA, K. Taxonomic studies on coryneform bacteria. III. DNA base composition of coryneform bacteria. **Journal Genetical Applied Microbiology**, v. 16, p. 215 – 224, 1970a.
- YAMADA, K.; KOMAGATA, K. Taxonomic studies on coryneform bacteria. IV. Morphological, cultural, biochemical and physiological characteristics. **Journal Genetical Applied Microbiology**, v. 18, p. 399 – 416, 1970b.
- YAMAMOTO, N.; HASUO, T.; SAITO, K.; TADENUMA, M. Heme requirement of a novel yeast-lysing bacterium. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 51, p. 1541 – 1545, 1987.
- YAMAMOTO, N.; HASUO, T.; TERAUCHI, T.; SAITO, K.; TADENUMA, M. Habitats of yeast-lysing microorganisms in waste water treatment process of food factory. Studies on yeast-lysing microorganisms (Part III). **Journal of the Brewing Society of Japan**, v. 79, n<sup>o</sup> 11, p. 828 – 833, 1984.
- YAMAMOTO, S.; NAGASAKI, S. Purification and characterization of exo  $\alpha$ -1,2-mannanase from *Flavobacterium dormitator* var. *glucanolyticae*. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 39, p. 1981 – 1989, 1975a.
- YAMAMOTO, S.; NAGASAKI, S. Purification, Crystallization, and properties of an endo- $\beta$ -1,3-glucanase from *Rhizopus chinensis* R-69. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 39, n<sup>o</sup> 11, p. 2163 – 2169, 1975b.
- YAMAMOTO, N.; SATO, S.; SAITO, K.; HASUO, T.; TADENUMA, M.; SUZUKI, K.; TAMAOKA, J.; KOMAGATA, K. *Rarobacter faecitabidus* gen. nov., sp. nov., a yeast-lysing coryneform bacterium. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 38, p. 7 – 11, 1988.
- YAMAMURA, M.; TAKEO, K.; KAMIHARA, T. *Saccharomyces cerevisiae* yeast cells grown at elevated temperatures are susceptible to autolysis. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 55, n<sup>o</sup> 11, 2861 – 2864, 1991.
- YANG, P.; VAUTERIN, L.; VANCANEYT, M.; SWINGS, J.; KERSTERS, K. Application of fatty acid methyl esters for the taxonomic analysis of the genus *Xanthomonas*. **Systematic Applied Microbiology**, v. 16, p. 47 – 71, 1993.

- YEO, I.H.; HAN, S.K.; YU, J.H.; BAI, D.H. Isolation of novel alkalophilic *Bacillus alcalophilus* subsp. YB380 and the characteristics of its yeast cell wall hydrolase. **Journal Microbiology and Biotechnology**, v. 8 (5), p. 501 – 508, 1998.
- YOKOGAWA, K.; KAWATA, S.; TAKEMURA, T.; YOSHIMURA, Y. Purification and properties of lytic enzymes from *Streptomyces globisporus* 1829. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 39, n<sup>o</sup> 8, 1533 – 1543, 1975.
- YOSHIMOTO, T.; HAYASHIDA, S.; YAMASAKI, H. *Pseudomonas* lytic enzyme from *Streptomyces*. **Journal of Fermentation Technology**, v. 53, n<sup>o</sup> 10, p. 703 – 712, 1975.
- YOSHIMOTO, T.; TSURU, D. Studies on bacteriolytic enzymes. **Journal Biochemistry**, v. 72, p. 379 – 390, 1972.
- YUUKI, T.; TEZUKA, H.; YABUUCHI, S. Purification and some properties of two enzymes from a  $\beta$ -glucanase hiperproducing strain, *Bacillus subtilis* HL-25. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 53, n<sup>o</sup> 9, p. 2341 – 2346, 1989.
- ZHANG, Z.; YUEN, G.Y. Effects of culture fluids and preinduction of chitinase production on biocontrol of *Bipolaris* leaf spot by *Stenotrophomonas maltophilia* C3. Department of plant pathology, University of Nebraska, Lincoln, Nebraska, **Published Electronically**, 2000.
- ZLOTNIK, H.; FERNANDEZ, M.P.; BOWERS, B.; CABIB, E. *Saccharomyces cerevisiae* mannoproteins form an external cell wall layer that determines wall porosity. **Journal Bacteriology Biotechnology Bioengineering**, v. 159, p. 1018 – 1026, 1984.



