



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

Enzimas que lisam a parede celular de leveduras:
clonagem e seqüenciamento do gene da β -1,3-glucanase lítica de
Cellulomonas cartae 191

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

Giselle Alessandra Martins Soares
Engenheira de Alimentos

Dra. Hélia Harumi Sato
Orientadora

PARECER

Este exemplar corresponde à
redação final da tese defendida por
**Giselle Alessandra Martins
Soares**, aprovada pela Comissão
Julgadora em 08 de outubro de
2002.

Campinas, 08 de outubro de 2002.

Hélia Harumi Sato
Profa. Dra. Hélia Harumi Sato
Presidente da Banca

Campinas – SP
2002.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

UNIDADE 80
Nº CHAMADA 1/UNICAMP
Solle
V _____ EX _____
TOMBO BCI 51541
PROC 16.837102
C _____ D X _____
PREÇO R\$ 11,00
DATA 14/11/02
Nº CPD _____

CM00176463-0

BIB ID 267002

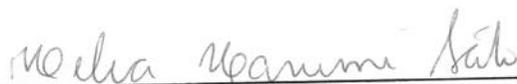
FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA F.E.A. – UNICAMP

Solle Soares, Giselle Alessandra Martins
Enzimas que lisam a parede celular de leveduras – Clonagem e seqüenciamento do gene da β -1,3-glucanase lítica de *Cellulomonas cartae* 191 / Giselle Alessandra Martins Soares. – Campinas, SP: [s.n.], 2002.

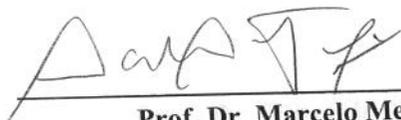
Orientador: Hélia Harumi Sato
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Engenharia de Alimentos

1.*Glucanase. 2.*Lise. 3.Levedura. I.Sato, Hélia Harumi.
II.Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos. III.Título.

BANCA EXAMINADORA



Profa. Dra. Hélia Harumi Sato
(Orientadora)

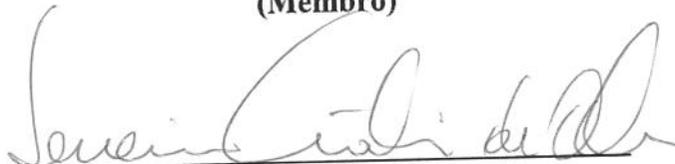


Prof. Dr. Marcelo Menossi Teixeira
(Membro)



Prof. Dr. Francisco Maugeri Filho
(Membro)

Profa. Dra. Lúcia Regina Durrant
(Membro)



Prof. Dr. Severino Matias de Alencar
(Membro)



Profa. Dra. Gláucia Maria Pastore
(Membro)

Profa. Dra. Carmen Veríssima Ferreira
(Membro)

Campinas, de de 2002.

69 8152007

Agradecimentos

Agradecemos a orientação do Dr. Patrick. A. Sullivan do Institute of Molecular BioSciences, Massey University, Palmerston North – Nova Zelândia na realização dos experimentos de clonagem e seqüenciamento do gene da β -1,3-glucanase de *Cellulomonas cartae* 191

AGRADECIMENTOS

À Professora Hélia H. Sato, pela orientação, amizade e paciência.

Ao Professor Pat Sullivan pelo ótimo acolhimento, orientação e essencial colaboração para esse trabalho.

À Carole Flyger e Peter Farley pelos valiosos conselhos, amizade e importante auxílio no desenvolvimento do trabalho.

Aos professores da banca examinadora pela colaboração e sugestões.

Aos colegas e funcionários do laboratório de bioquímica da FEA-UNICAMP pelas conversas e apoio diário.

A Carlos Aguilar-Vildoso pelo incentivo constante e compreensão.

À minha família e aos amigos da Nova Zelândia em especial a Matt Perlmutter pelo apoio em todas as horas.

À CAPES pela concessão da bolsa sandwich e ao CNPq que possibilitaram a materialização desse projeto.

Àqueles que cujos nomes não foram citados mas que de alguma forma contribuíram para a realização dessa tese.

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS.....	xiii
LISTA DE TABELAS.....	xv
RESUMO.....	xvii
ABSTRACT.....	xix
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	3
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	5
3.1. Enzimas líticas e microrganismos que lisam a parede de leveduras.....	5
3.2. Clonagem e expressão de β -1,3-glucanases microbianas.....	9
3.3. Aplicação das enzimas que lisam a parede celular de leveduras.....	17
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	23
4.1. Microrganismo.....	23
4.2. Plasmídeo e célula competente.....	23
4.3. Meios de cultivo dos microrganismos.....	25
4.3.1. Meio de isolamento.....	25
4.3.2. Meio TYM (meio de manutenção).....	25
4.3.3. Meio Scott & Schekman (meio de crescimento).....	25
4.3.4. Meio Scott & Schekman modificado.....	25
4.3.5. Meio YPD.....	26
4.3.6. Meio LB.....	26
4.3.7. Meio SOB.....	26
4.4. Preparação da parede celular de levedura obtida por rompimento mecânico.....	26
4.5. Métodos de determinação.....	27
4.5.1. Determinação da atividade da enzima β -1,3-glucanase.....	27
4.5.2. Determinação da atividade de liticase.....	27
4.5.3. Dosagem de proteína – Método BCA.....	28
4.5.4. Determinação do crescimento celular.....	28
4.6. Efeito inibitório da linhagem <i>C. cartae</i> 191 sobre fungos.....	28
4.7. Produção da enzima β -1,3-glucanase pela linhagem <i>C. cartae</i> 191.....	29

4.7.1. Produção da enzima β -1,3-glucanase utilizando-se diferentes indutores.....	29
4.7.2. Produção da β -1,3-glucanase em frascos agitados.....	29
4.7.3. Modificação do meio de cultivo descrito por Scott & Schekman para a produção da β -1,3-glucanase.....	30
4.7.4. Efeito da concentração de indutor, pH e agitação na produção da β -1,3-glucanase.....	31
4.8. Purificação da β -1,3-glucanase lítica.....	32
4.8.1. Escolha da resina para a purificação da β -1,3-glucanase.....	32
4.8.2. Produção e purificação da β -1,3-glucanase em coluna DEAE-Sepharose Fast Flow.....	33
4.8.3. Eletroforese de proteínas - SDS-PAGE.....	33
4.9. Análise da seqüência de aminoácidos N-terminal da β -1,3-glucanase.....	34
4.10. Clonagem do gene da β -1,3-glucanase de <i>Cellulomonas cartae</i> 191.....	35
4.10.1. Estratégia de clonagem do gene da β -1,3-glucanase lítica.....	35
4.10.2. Extração do DNA genômico de <i>Cellulomonas cartae</i> 191.....	37
4.10.3. Reação de amplificação do gene.....	38
4.10.4. Preparo do Clone A e Clone B.....	39
4.10.5. Construção do plasmídeo recombinante (Clone C).....	40
4.11. Transformação de <i>E. coli</i> DH5 α	41
4.11.1. Seleção dos transformantes.....	42
4.12. Mapa de restrição do inserto.....	43
4.13. Seqüenciamento do gene da β -1,3-glucanase lítica de <i>C. cartae</i> 191.....	43
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	45
5.1. Efeito inibitório da linhagem <i>C. cartae</i> 191 sobre fungos.....	45
5.2. Produção da enzima β -1,3-glucanase pela linhagem <i>C. cartae</i> 191.....	47
5.2.1. Produção da enzima β -1,3-glucanase utilizando-se diferentes indutores.....	47
5.2.2. Produção da β -1,3-glucanase em frascos agitados.....	53
5.2.3. Modificação do meio de cultivo descrito por Scott & Schekman para a produção da β -1,3-glucanase.....	55

5.2.4. Efeito da concentração de indutor, pH e agitação na produção da β -1,3-glucanase.....	59
5.3. Purificação da β -1,3-glucanase lítica.....	69
5.3.1. Escolha da resina para a purificação da β -1,3-glucanase.....	69
5.3.2. Produção e purificação da β -1,3-glucanase	71
5.3.2.1. Produção da β -1,3-glucanase	71
5.3.2.2. Purificação da β -1,3-glucanase em coluna DEAE-Sepharose Fast Flow.....	71
5.3.2.3. Eletroforese de proteínas - SDS-PAGE.....	77
5.4. Análise da seqüência de aminoácidos N-terminal da β -1,3-glucanase.....	81
5.5. Clonagem do gene da β -1,3-glucanase de <i>Cellulomonas cartae</i> 191.....	82
5.5.1. Extração do DNA genômico de <i>Cellulomonas cartae</i> 191.....	82
5.5.2. Preparo do Clone A.....	85
5.5.3. Preparo do Clone B.....	93
5.6. Mapa de restrição do inserto-Clone A.....	99
5.7. Seqüenciamento do gene da β -1,3-glucanase lítica de <i>C. cartae</i> 191.....	102
5.8. Construção do plasmídeo recombinante (Clone C).....	126
6. CONCLUSÕES.....	137
7. SUGESTÕES PARA CONTINUIDADE DO TRABALHO.....	139
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	141

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Plasmídeo pBluescript II KS.....	23
FIGURA 2: Estratégia de clonagem.....	35
FIGURA 3: Halo de inibição do crescimento do fungo <i>P. digitatum</i> pela linhagem de <i>Cellulomonas cartae</i> 191.....	47
FIGURA 4: Estudo da produção da β -1,3-glucanase pela linhagem <i>C. cartae</i> 191, usando 1% de diferentes indutores.....	49
FIGURA 5: Produção da β -1,3-glucanase da linhagem <i>C. cartae</i> 191 em frascos agitados.....	55
FIGURA 6: Efeito das vitaminas, do sulfato férrico e do pH na produção da β -1,3-glucanase de <i>C. cartae</i> 191.....	57
FIGURA 7: Efeito da concentração de indutor e da agitação na produção da β -1,3-glucanase de <i>C. cartae</i> 191.....	63
FIGURA 8: Efeito da concentração de indutor e do pH na produção da β -1,3-glucanase de <i>C. cartae</i> 191.....	63
FIGURA 9: Efeito da agitação e do pH na produção da β -1,3-glucanase de <i>C. cartae</i> 191.....	65
FIGURA 10: Perfil da purificação da β -1,3-glucanase em coluna de DEAE-Sepharose Fast Flow.....	73
FIGURA 11: Eletroforese das proteínas SDS-PAGE.....	79
FIGURA 12: DNA genômico de <i>C. cartae</i> 191 em gel de agarose 1%.....	83
FIGURA 13: Reação de PCR do Clone A em gel de agarose 1%.....	85
FIGURA 14: Gel de quantificação do fragmento de 1,5 Kb e do pBS (agarose 1%).....	87
FIGURA 15: Eletroforese em gel de 1% de agarose para seleção do Clone A.....	89
FIGURA 16: Reação de PCR do Clone B em gel de agarose 1%.....	93
FIGURA 17: Eletroforese em gel de 1% de agarose para seleção do Clone B.....	97
FIGURA 18: Mapa de restrição do inserto em gel de agarose 1%.....	99
FIGURA 19: Esquema dos sítios de clivagem internas do inserto de 1,5 Kb.....	101

FIGURA 20: Seqüência nucleotídica do clone pGS7.....	105
FIGURA 21: Ilustração do plasmídeo recombinante pGS7.....	107
FIGURA 22: Ilustração do plasmídeo recombinante pGSB.....	109
FIGURA 23: Seqüência de nucleotídeos e de aminoácidos deduzidos do gene da β -1,3-glucanase lítica de <i>C. cartae</i> 191.....	115
FIGURA 24: Comparação entre as seqüências de aminoácidos deduzidas dos genes da β -1,3-glucanase lítica de <i>C. cartae</i> 191 e de <i>O. xanthineolytica</i>	119
FIGURA 25: Alinhamento da β -1,3-glucanase de <i>C. cartae</i> 191 com outras β -1,3-glucanases.....	124
FIGURA 26: Eletroforese em gel de 1% de agarose para seleção do Clone pGS7-.....	127
FIGURA 27: Ilustração dos sítios de clivagem do fragmento de 1,5 Kb inserido no plasmídeo recombinante pGS7 e pGS7-.....	129
FIGURA 28: Eletroforese em gel de 1% de agarose para seleção do Clone C.....	131
FIGURA 29: Ilustração dos sítios de clivagem do fragmento de DNA contendo o gene completo da β -1,3-glucanase lítica de <i>C. cartae</i> 191 inserido no plasmídeo recombinante pGSC e pGSC-.....	133
FIGURA 30: Ilustração do plasmídeo recombinante pGSC.....	135

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Variáveis independentes e seus níveis.....	31
TABELA 2: Oligonucleotídeos <i>primers</i> usados na reação de PCR.....	38
TABELA 3: Oligonucleotídeos <i>primers</i> usados no seqüenciamento total do gene da β -1,3-glucanase lítica de <i>C. cartae</i> 191.....	44
TABELA 4: Efeito das vitaminas, do sulfato férrico e do pH do meio de cultivo na produção da β -1,3-glucanase de <i>C. cartae</i> 191.....	57
TABELA 5: Planejamento fatorial: níveis das variáveis e resposta em atividade de β -1,3-glucanase.....	59
TABELA 6: Tabela de efeitos do planejamento fatorial.....	60
TABELA 7: Análise de variância (ANOVA).....	61
TABELA 8: Teste de adsorção da β -1,3-glucanase nas resinas de troca-iônica CM-Sepharose Fast Flow e DEAE-Sepharose Fast Flow equilibradas em diferentes soluções tampão.....	69
TABELA 9a: Teste de eluição da β -1,3-glucanase da resina de troca-iônica DEAE-Sepharose Fast Flow com NaCl 1M.....	70
TABELA 9b: Teste de eluição da liticase da resina de troca-iônica DEAE-Sepharose Fast Flow com NaCl 1M.....	70
TABELA 10: Purificação da β -1,3-glucanase lítica de <i>C. cartae</i> 191.....	75

RESUMO

A linhagem 191, isolada previamente no laboratório de Bioquímica da FEA-UNICAMP e identificada como *Cellulomonas cartae*, é uma boa produtora da enzima β -1,3-glucanase envolvida na lise da parede celular de levedura. O objetivo deste trabalho foi o estudo da β -1,3-glucanase lítica produzida pela linhagem *C. cartae* 191; sua produção em meio de cultura, purificação e a clonagem molecular do gene que codifica essa enzima. A linhagem 191 foi crescida em meio contendo diferentes indutores e as condições de cultivo foram otimizadas através de planejamento experimental para o aumento da produção dessa enzima. A β -1,3-glucanase lítica foi purificada do sobrenadante do meio de cultura através de ultrafiltração (membrana de exclusão de 10 kDa), cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-Sepharose equilibrada em tampão acetato de sódio 0,01M, pH 5,5 e eletroforese em SDS-PAGE. A região N-terminal dessa proteína foi seqüenciada e o gene da β -1,3-glucanase foi isolado do genoma de *C. cartae* 191. O gene que codifica essa enzima foi seqüenciado e clonado em células de *Escherichia coli* DH5 α . Resultados mostraram que o melhor indutor testado para a produção da β -1,3-glucanase de *C. cartae* 191 foi a parede celular de leveduras obtida por rompimento mecânico. As condições de cultivo foram otimizadas obtendo-se cerca de 75% a mais de atividade de β -1,3-glucanase em relação às condições originais, sendo que melhor produção foi obtida quando o microrganismo foi crescido após 24 horas em meio Scott & Schekman modificado, pH 7,5, em agitador rotatório a 200 rpm e a 30° C. A enzima β -1,3-glucanase lítica apresentou peso molecular de cerca de 57 kDa em gel de eletroforese SDS-PAGE. Os resíduos obtidos do seqüenciamento da região N-terminal dessa enzima foram idênticos aos obtidos da enzima β -1,3-glucanase lítica comercial Zymolyase. Um fragmento de DNA de *C. cartae* 191, com cerca de 1,9 Kilobases contendo o gene da β -1,3-glucanase lítica, foi isolado e sua seqüência nucleotídica completamente determinada. O gene contém um quadro aberto de leitura (ORF) de 1650 pares de bases, a qual prediz uma proteína de 549 aminoácidos. A proteína apresenta um sítio de clivagem do peptídeo sinal na posição Ala-36 e Val-37, codificando assim uma proteína madura de 513 aminoácidos. O gene da glucanase de *C. cartae* 191 apresentou alta identidade (92%) com o gene previamente clonado de uma

bactéria intimamente relacionada, a *Oerskovia xanthineolytica*, confirmando que o gene clonado neste estudo foi realmente o gene da β -1,3-glucanase lítica requerido.

ABSTRACT

The strain *Cellulomonas cartae* 191, which was previously isolated by the Biochemistry laboratory at FEA-UNICAMP, shows a good β -1,3-glucanase production. The β -1,3-glucanase enzyme has an important role in yeast cell lysis. The aim of this work was to study the lytic β -1,3-glucanase from *C. cartae* 191; its production, purification and molecular cloning of this gene. The strain 191 was grown on a medium containing different carbon sources and the β -1,3-glucanase production was studied by experimental design. The lytic enzyme was purified from the crude supernatant by ultrafiltration (10 kDa cut off membrane), ion exchange chromatography with a DEAE-Sepharose column, equilibrated in 0.01 M sodium acetate buffer at pH 5.5 and SDS-PAGE electrophoresis. The N-terminal sequence of the lytic enzyme was obtained and the β -1,3-glucanase gene was isolated from *C. cartae* 191 genome and subsequently cloned in *Escherichia coli* DH5 α cells. The yeast cell wall was found to be the best carbon source tested. It was obtained 75% more β -1,3-glucanase activity using the optimized culture conditions than the original one, where the best result was obtained when the microorganism *C. cartae* 191 was grown in a Scott & Schekman modified medium at pH 7.5, 200 rpm, 30 °C for 24 hours. The lytic enzyme showed a molecular mass of 57 kDa in SDS-PAGE electrophoresis. The amino acid residues obtained from the N-terminal sequence of this protein were identical to those obtained from the commercial lytic enzyme Zymolyase. A 1.9 Kb fragment of DNA from *C. cartae* 191 containing the gene for β -1,3-glucanase was successfully isolated and its complete nucleotide sequence determined. The sequence was found to contain an Open Reading Frame with 1650 bp that potentially encodes a protein of 549 amino acids. A predicted cleavage site for the signal peptide showed a mature enzyme containing 513 amino acids. The high sequence identity (92%) with the gene previously cloned from a closely related bacterium *Oerskovia xanthineolytica* essentially confirms that it was indeed the required gene.

1. INTRODUÇÃO

A parede celular de levedura *Saccharomyces cerevisiae* é composta principalmente de glucanas, mananaproteína e pequena quantidade de quitina. As enzimas β -1,3-glucanases líticas entre outras enzimas que apresentam afinidade pela parede celular de leveduras, são responsáveis pela lise destas células.

A lise enzimática da parede celular de leveduras vem sendo um processo atrativo, por ser um método suave de ruptura das células. As enzimas líticas são amplamente utilizadas em biotecnologia e engenharia genética para obtenção de protoplastos de leveduras e fungos para melhoramento genético de linhagens industriais. A lise enzimática também pode ser utilizada no aproveitamento de massa celular de levedura para extração de compostos intracelulares biologicamente ativos; como na extração de enzimas intracelulares de leveduras de interesse industrial como invertase e β -galactosidase.

Em muitos países, as leveduras são reconhecidamente consideradas um produto de alto valor agregado, matéria prima para a extração de proteínas, vitaminas e ácidos nucléicos para serem aplicados em alimentos. Na área de alimentos, muitos polissacarídeos de parede de origem microbiana têm sido utilizados largamente como espessantes, devido às suas propriedades de apresentar alta viscosidade em sistemas aquosos (Assis, 1996). As indústrias de álcool e cervejarias brasileiras produzem grande quantidade de massa celular de leveduras como resíduos de fermentação, que são usados principalmente para ração animal e produção de autolisado de levedura. A indigestibilidade da parede celular de levedura é uma importante limitação para o uso deste microrganismo como fonte de proteína unicelular. Enzimas líticas poderiam ser úteis para auxiliar o aproveitamento destes resíduos industriais, tendo em vista que o processo de autólise celular não é totalmente eficaz.

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

No Laboratório de Bioquímica da Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP foram isoladas seis linhagens de bactérias denominadas nº 4, 191, B1, B22, B26 e FXX, que lisam células viáveis de *Saccharomyces cerevisiae*, a partir de amostras de solo e resíduos de usina de fermentação alcoólica. Dentre estas, a linhagem nº 191 (*Cellulomonas cartae*) apresentou boa atividade de lise da parede celular de levedura. Essa linhagem *C. cartae* 191 apresenta boa produção de β -1,3-glucanase. Esse trabalho visou aprofundar o estudo da β -1,3-glucanase lítica de *Cellulomonas cartae* 191: sua produção em meio de cultura e estudo do gene que codifica essa enzima.

2. OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivos: 1) Estudar a produção da enzima lítica β -1,3-glucanase pela linhagem de *Cellulomonas cartae* 191 em meio de cultura contendo diferentes substratos indutores e aumentar a produção desta enzima em processo em batelada usando-se planejamento experimental; 2) Purificar a enzima lítica β -1,3-glucanase do sobrenadante do meio de cultura fermentado de *C. cartae* 191 e seqüenciar a região de aminoácidos N-terminal desta proteína; 3) Clonar e seqüenciar o gene que codifica a β -1,3-glucanase lítica de *C. cartae* 191 e comparar a sua seqüência de nucleotídeos e de aminoácidos deduzida com seqüências de β -1,3-glucanases de outros microrganismos já descritos.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Enzimas líticas e microrganismos que lisam a parede de leveduras

Segundo Hunter & Asenjo (1987), a parede celular de leveduras é descrita como uma das paredes mais resistentes e rígidas de todos microrganismos. A parede celular de leveduras não é quimicamente uniforme, ela é composta por uma complexa estrutura dos biopolímeros: manana, proteína, glucana e pequena quantidade de quitina. A manana e as proteínas estão sempre juntas na forma do complexo mananaproteína. Cerca de 50-60% da parede corresponde a glucana de ligações β -1,3 e β -1,6 e o restante corresponde ao complexo mananaproteína e algumas glicoproteínas ligadas a parede e ao periplasma (Hunter & Ansejo, 1988). A estrutura mananaproteína é responsável pela proteção da célula contra injúrias externas e pela porosidade da parede celular. A camada de glucana é responsável pela integridade estrutural da parede celular perante choques mecânicos e desequilíbrio osmótico (Zlotnil et al., 1984). Entretanto, a parede celular de leveduras não é uma estrutura rígida, pois pode sofrer interferências do meio exterior. Kapteyn et al. (2001), verificaram que o baixo pH do meio, afeta de forma intensa a organização da parede celular da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, podendo resultar numa rápida indução de resistência à enzima lítica β -1,3-glucanase.

Enzimas capazes de degradar a parede celular de leveduras têm sido isoladas do sobrenadante do meio de cultura de diferentes microrganismos. Em geral a atividade lítica sobre as leveduras pode ser atribuída a β -1,3-glucanase embora a β -1,6-glucanase lítica de *Bacillus circulans* WL-127 tenha sido caracterizada (Rombouts & Phaff, 1976).

Kitamura & Yamamoto (1972), relataram que a bactéria *Arthrobacter luteus*, isolada de resíduos de cervejarias, cresceu em meio contendo células de leveduras ou β -1,3 glucana e produziu enzimas com atividade lítica em leveduras. O conjunto destas enzimas é

denominado Zymolyase e requer polímeros lineares de glicose com ligações β -1,3 como substrato específico.

A Zymolyase-5000 comercial (Kirin Brewery Co., LTD.), é uma preparação obtida do sobrenadante do meio de cultura de *Arthrobacter luteus*, precipitado com sulfato de amônio e liofilizado. A enzima responsável pela lise de células viáveis de leveduras, quando purificada, é capaz de lisar cerca de 700 mg (peso seco) de células de leveduras viáveis da fermentação alcoólica em 2 horas a 25 °C. Essa enzima hidrolisa polímeros de β -1,3-glucana especificamente liberando laminaripentaose como produto, ou seja é uma endo β -1,3-glucanase. Na preparação comercial podem ser encontradas outras β -1,3-glucanases e também mananase, protease, fosfatase ácida, etc.

Em 1972, Yamamoto & Nagasaki (citados por Yamamoto & Nagasaki, 1975) isolaram a bactéria *Flavobacterium dormitator var. glucanolyticae* a partir de amostras de solo, que produzia α -1,2-mananase com atividade para manana de diferentes espécies de *Saccharomyces*. A enzima hidrolisa as ligações α -1,2 a partir da extremidade não redutora liberando manose, manotriose e manotetraose. A enzima requer ligações α -1,2-manosídicas para sua ação, diferente da α -1,2-manosidase do *Arthrobacter* que hidrolisa ligações α -1,2 e α -1,3 de manana. A bactéria *F. dominator var glucanolyticae* também produz uma endo β -1,3-glucanase capaz de lisar células de leveduras aleatoriamente liberando pequenos oligossacarídeos como substrato para sua ação (Nagasaki et al.; 1976).

Em 1976, Doi et al. descreveram a presença de dois tipos de glucanases no sobrenadante do meio de cultura de *Arthrobacter* sp.: um tipo apresentava alta atividade lítica sobre a parede celular de levedura e outro baixa atividade lítica. Nesse trabalho foi mostrado o comportamento dos dois tipos de β -1,3-glucanases bacterianas em coluna cromatográfica Avicel. A β -1,3-glucanase com maior atividade lítica foi adsorvida na coluna enquanto que a β -1,3-glucanase com baixa atividade não foi adsorvida. Os autores

relataram que a adsorção diferencial das β -1,3-glucanases em coluna Avicel foi também verificado para o sistema de glucanases da enzima comercial Zymolyase-5000.

Obata et al. (1976) verificaram que o sobrenadante do meio de cultura da linhagem CK, pertencente ao gênero *Oerskovia*, exibia alta atividade lítica sobre células de várias espécies de leveduras na fase exponencial ou estacionária de crescimento, quando a linhagem CK foi cultivada em meio contendo células de leveduras. Ao analisar o fracionamento cromatográfico do meio de cultura contendo as enzimas líticas, verificou-se a presença três tipos de β -1,3-glucanase designadas F-L, F-0 e F-2. A enzima F-L mostrou alta atividade lítica em células viáveis de leveduras mas fraca atividade para a glucana da levedura. As enzimas F-0 e F-2 mostraram baixa ou nenhuma atividade lítica, mas alta atividade de β -1,3-glucanase. Os resultados evidenciaram que as enzimas F-0 e F-2 não são eficientes na lise de leveduras devido a inacessibilidade espacial à camada de glucana. No entanto, o tratamento com a enzima F-L, com solução alcalina ou com reagentes redutores modificaram a célula, permitindo o acesso das enzimas F-0 e F-2 à camada de glucana possibilitando a lise da célula. Foi observado efeito sinérgico entre as β -1,3-glucanases F-L e F-0 ou F-L e F-2 (Obata et al.; 1977).

Scott & Schekman (1980) estudaram as enzimas líticas de *Oerskovia xanthineolytica*. Esta linhagem foi originariamente descrita como *Arthrobacter luteus* 73-14 e obtida do Dr. Yashishi Yamamoto da Companhia Kirin Brewery produtora da enzima comercial Zymolyase. O microrganismo foi cultivado a 30 °C em meio mínimo suplementado com tiamina e biotina e contendo levedura autoclavada ou glucana de levedura purificada como fonte de carbono. Foram detectadas atividade de β -1,3-glucanase, protease e quitinase no sobrenadante do meio de cultura. A síntese da enzima lítica é induzida tanto com levedura autoclavada como com glucana, mas a indução com a glucana ocorreu 12 a 24 horas mais tarde. Segundo os autores, o sistema de enzimas líticas de leveduras produzido por *O. xanthineolytica* consiste de uma β -1,3-glucanase e de uma protease alcalina. O sobrenadante do meio de cultura foi concentrado por diálise contra

polietilenoglicol sólido. O concentrado foi adsorvido em CM-celulose e purificado em coluna de Bio-Gel P-150. Foram obtidas duas frações, uma contendo atividade lítica e de glucanase e a outra contendo somente atividade de protease alcalina. Quando as duas frações foram misturadas, foi observado efeito sinérgico (2-5 vezes) na atividade lítica. A preparação da protease obtida comportou-se como uma única proteína em cromatografia em coluna de Bio-Gel P-30, sendo também observado uma única banda em gel de SDS-poliacrilamida com massa molecular de 30 kDa. A glucanase lítica apresentou atividade ótima em pH 6,0 com substrato laminarina, contudo foi observada a atividade ótima de lise de leveduras em pH 8,0. Esta glucanase mostrou-se ativa em laminarina e glucana insolúvel de levedura, que são predominantemente polímeros de glicose unidas por ligações β -1,3. A massa molecular da enzima glucanase lítica purificada foi estimada em 55 kDa e mostrou-se bastante estável sendo que reteve 50% da atividade após 3 semanas a temperatura ambiente. Segundo os autores, a protease alcalina tem afinidade específica por manana. A enzima se associa à manana e ataca a porção protéica da camada de mananaproteína. A manana liberada atua como inibidora da ação da protease. A camada de glucana, que é responsável pela integridade e rigidez estrutural da célula, é coberta por uma camada de mananaproteína que deve ser degradada anteriormente pela protease para permitir a ação da β -1,3-glucanase.

Em 1987, Andrews & Ansejo, estudaram a síntese e a regulação das enzimas β -1,3-glucanase e protease produzidas por *Oerskovia xanthineolytica* em cultura contínua. A linhagem foi cultivada em fermentador Bioflo C em meio contendo de 2,0 a 8,0 g/L de glicose como fonte de carbono e 2,0 a 0,5 g/L de glucana como indutor; controlando-se o pH em 6,8 a 29 °C. Os autores observaram que a síntese de enzimas é sujeita a repressão catabólica pela glicose e induzida pela glucana de levedura. Maiores atividades de β -1,3-glucanase e protease foram obtidas na taxa de diluição de 0,05 e 0,15 h⁻¹. Nas taxas de diluição acima de 0,15 h⁻¹ ambas as atividades foram similares às obtidas em cultura de batelada. Em fermentação contínua, tanto a produtividade quanto a concentração das enzimas foram aumentadas quando comparadas por fermentação em batelada, 11 e 4,4 vezes respectivamente.

Microrganismos que lisam leveduras (YLM) foram isolados a partir de lodo ativado de tanques de sistemas de tratamento de água de indústrias de alimentos e de bebidas alcoólicas. Dez linhagens de YLM que puderam crescer em meio ágar nutriente pertenciam aos gêneros: *Streptomyces* sp., *Oerskovia* sp. e *Bacillus* sp. (Yamamoto et al.; 1984).

Em 1988, Yamamoto et al., isolaram a bactéria *Rarobacter faecitabidus* sp. nov. (YLM-1) capaz de lisar células de leveduras do gênero *Saccharomyces* e *Hansenula*. A linhagem foi cultivada sob agitação em meio contendo células de leveduras viáveis. Os autores observaram a necessidade da adição de composto heme, catalase, como fator para o crescimento aeróbio no meio de cultivo.

Em 1993, Yamamoto et al., reportaram o isolamento de 50 linhagens de bactérias capazes de lisar leveduras (Yeast Lysing Bacteria). As linhagens foram isoladas de solo, flores e frutos no Brasil. Quarenta e seis isolados foram relacionados como pertencentes ao gênero *Rarobacter*. As outras quatro linhagens, não requeriam composto heme como fator de crescimento, sendo que duas destas foram identificadas como *Oerskovia* e uma como *Arthrobacter*, a outra não foi possível ser identificada. Os autores verificaram que a taxa de isolamento de *R. incanus* no Brasil é bem maior do que no Japão. Entretanto, não foram encontradas nenhuma relação entre as espécies isoladas e as fontes de isolamento.

3.2. Clonagem e expressão de β -1,3-gluconases microbianas

Segundo Doi & Doi (1986), a linhagem de *Arthrobacter* sp. produz dois tipos de β -1,3-gluconase extracelulares. A gluconase do tipo I hidrolisa a cadeia de glucana liberando laminaripentaose; já a gluconase II pode atacar cadeias curtas de laminaridextrinas e converte-las a laminaribiose e glucose. Segundos os autores, o estudo comparativo das seqüências nucleotídicas dos genes dessas gluconases deve render informações sobre a

relação estrutural entre as duas espécies de endo β -1,3-glucanases e levar à elucidação da organização dos genes no genoma de *Arthrobacter* sp. Com esta finalidade, eles descrevem a clonagem e expressão do gene da β -1,3-glucanase de *Arthrobacter* em *Escherichia coli*. O fragmento de DNA contendo 8,6 Kb foi inserido no sítio de *Bam*HI do plasmídeo YRp7. Células de *E. coli* HB101 transformadas com o plasmídeo recombinante, foram capazes de produzir a endo β -1,3-glucanase com o mesmo padrão de atividade da glucanase do tipo I de *Arthrobacter* sp. A proteína purificada apresentou peso molecular de 55 kDa através de eletroforese de SDS-PAGE. Estudos de subclonagens deste gene, fizeram com que as células hospedeiras produzissem moléculas defectivas de glucanase, resultando na produção de uma glucanase alterada. Essas colônias quando crescidas em ágar contendo parede celular de levedura, produziram halos de lise, mas bem menores do que aqueles desenvolvidos pelas colônias de *E. coli* do clone inicial.

Em 1991, Shen et al. discutiram sobre a presença de mais de uma forma de β -1,3-glucanase no sobrenadante de *Arthrobacter* sp. Os autores citam que enquanto todas as formas moleculares da enzima possuem atividade sobre β -1,3-glucana (atividade de glucanase), apenas algumas são capazes de induzir a lise de células viáveis de leveduras (atividade lítica). Segundo os autores, não é claro se todas as glucanases são enzimas nativas diferentes com diferentes especificidades ou se as glucanases deficientes em atividade lítica são produtos de degradação proteolítica de uma única enzima nativa contendo ambas atividades lítica e de glucanase. Os autores anteriores (Doi & Doi, 1986) haviam clonado uma única forma de β -1,3-glucanase contendo ambas as atividades, atividade de glucanase e atividade lítica. Entretanto, a seqüência primária deste gene ainda não estava elucidada. Desta forma, Shen et al. (1991) descreveram a seqüência primária do gene da β -1,3-glucanase de *Oerskovia xanthineolytica*, sua expressão em *Escherichia coli* e a purificação. Um fragmento de DNA contendo 2,7 Kb proveniente de *Oerskovia xanthineolytica* contendo o gene da endo β -1,3-glucanase foi isolado e sua seqüência nucleotídica foi completamente determinada. A purificação da enzima nativa madura e o subsequente seqüenciamento da sua região N-terminal, definiram o gene dentro de um quadro aberto de leitura (ORF) que potencialmente codifica uma proteína de 548

aminoácidos. Os autores expressaram a enzima em *E. coli* sobre o controle do promotor *LacUV5* e mostraram que o produto foi excretado no periplasma como uma enzima madura com o mesmo peso molecular da proteína nativa, que é de cerca de 57 kDa em gel de eletroforese SDS-PAGE. Sua atividade lítica e de glucanase foram idênticas a da original. Entretanto, a deleção da região que codifica 117 aminoácidos da enzima e que contém a parte rica em cisteína do carboxil terminal da proteína, aboliu a atividade lítica mas não interferiu significativamente na atividade de glucanase da proteína. A ausência da atividade lítica nas proteínas truncadas serviram de suporte indireto para a hipótese prévia sugerida pelos autores, que espécies de glucanases obtidas do sobrenadante da cultura de *Arthrobacter* contendo pouca ou nenhuma atividade lítica foram derivadas das enzimas nativas submetidas a clivagem proteolítica.

Em 1994, Saeki et al. descreveram a purificação e caracterização da β -1,3-glucanase lítica de *Oerskovia xanthineolytica* TK-1. A linhagem foi cultivada em meio mínimo contendo glucana de levedura como fonte de carbono. O sobrenadante do meio de cultura foi purificado através de cromatografia em resina de DEAE-Sephacel, DEAE-Toyopearl 650M e Bio Gel P-2. O peso molecular da β -1,3-glucanase lítica foi estimado em cerca de 40 kDa e a enzima pura apresentou atividade de glucanase e atividade lítica, não precisando de um segundo componente lítico, ou seja da protease alcalina. Entretanto, a seqüência de aminoácidos N-terminal desta enzima não mostra nenhuma homologia com a β -1,3-glucanase relatada do mesmo gênero.

Ferrer et al. (1996a), descreveram a clonagem molecular do gene de β -1,3-glucanase lítica de *Oerskovia xanthineolytica* LLG109. Essa endo β -1,3-glucanase do tipo II (β glII) foi purificada e caracterizada por Parrado et al. (1996) como estável à temperaturas elevadas, apresentando temperatura ótima de atividade, em substrato laminarina, a 65 °C. Seu peso molecular foi estimado em 31.000 Da em gel de eletroforese de SDS-PAGE e em $27.195,6 \pm 1,3$ Da através de espectrofotometria de massa. Essa enzima é uma glucanase com baixa atividade lítica sobre células de leveduras. A seqüência nucleotídica deste gene

foi elucidado e o gene clonado e expressado em *Bacillus subtilis* (Ferrer et al., 1996b). A enzima β glIII não apresentou o domínio de ligação para manana ou glucana como o encontrado em β -1,3-glucanase com alta atividade lítica sobre células de leveduras. Os autores descrevem que o alinhamento da seqüência deste gene com o da β -1,3-glucanase com alta atividade lítica, ou seja do tipo I de *Oerskovia xanthineolytica* ATCC21606 com cerca de 57 kDa, revelou apenas 21,9% de identidade. Também a região N-terminal da β glIII e da enzima de 40 kDa da linhagem TK-1 (descrita por Saeki et al. em 1994) não mostraram nenhuma similaridade significativa com nenhuma região desta β -1,3-glucanase de cerca de 57 kDa de *Oerskovia xanthineolytica* ATCC21606.

Shene et al. (1999), estudaram a produção da β -1,3-glucanase recombinante, clonada e expressada anteriormente em *Bacillus subtilis* por Ferrer et al. em 1996, em fermentação em batelada e em batelada alimentada. Os autores estudaram o efeito de diferentes nutrientes na síntese da endo β -1,3-glucanase. O *Bacillus subtilis* ToC46 havia sido selecionado para a construção do sistema de expressão de glucanase por ser uma linhagem de *B. subtilis* que apresenta menor atividade de protease quando comparado com as outras já estudadas. Como havia descrito anteriormente, a protease pode causar perdas na atividade da glucanase devido à clivagem proteolítica da glucanase madura ativa no meio de cultura. Os dados experimentais foram usados para encontrar um modelo matemático para o sistema. O resultado mostrou que, pela expressão matemática, a taxa de síntese da enzima recombinante é inversamente proporcional à concentração de glicose, a qual é a fonte de carbono limitante ao crescimento. Os autores demonstram que a atividade final da enzima recombinante obtida em batelada alimentada pode ser aumentada em até 10 vezes comparando-se com a atividade obtida ao final da fermentação em batelada. A atividade de protease não mostrou nenhuma mudança significativa dentro das condições testadas.

Salazar et al. (1999), estudaram a clonagem e expressão de uma β -1,3-glucanase de *Oerskovia xanthineolytica* em *Escherichia coli*. Essa endo β -1,3-glucanase do tipo II (β glII) já havia sido caracterizada e purificada por Parrado et al. em 1996 e o seu gene sequenciado

por Ferrer et al. (1996b). Entretanto, Salazar et al. citam que os autores anteriores não conseguiram a expressão dessa enzima em *E. coli*. Desta forma, neste trabalho, os autores reportam a clonagem do gene β glIII de *O. xanthineolytica* em *E. coli* usando um vetor de expressão e secreção, o pET20b(+) da Novagen. O plasmídeo recombinante, contendo a seqüência que codifica para a proteína madura, foi inserido em células competentes de *E. coli* BL21 e a indução da expressão da enzima foi feita em meio suplementado com 1mM de isopropil β -D-tiogalactopiranosídeo (IPTG). Os resultados mostraram que a enzima foi expressa, entretanto, ficou retida principalmente na fração periplasmática da célula de *E. coli*.

Posteriormente, em 2001, os mesmo autores descreveram um sistema de expressão mais eficiente. O sistema foi projetado para produzir a enzima β glIII recombinante com 6 peptídeos de histidina fundidos à região carboxi terminal da proteína. Com isto, o nível de expressão foi otimizado, obtendo-se 30% do total de proteína produzida pela *E. coli* como sendo a endo β -1,3-glucanase. Cerca de 75% dessa enzima foi excretada no meio de cultura. A proteína recombinante de 43 kDa foi purificada e suas características moleculares e bioquímicas foram estudadas, mostrando que não houve nenhuma diferença funcional importante em relação a enzima β glIII de *O. xanthineolytica* (Salazar et al., 2001).

Zverlov & Velikodvorskaya (1990), descreveram a clonagem do gene de laminarinase termoestável de *Clostridium thermocellum* em *Escherichia coli*. Os autores clonaram um fragmento de DNA com 1,9 Kb o qual codifica a laminarinase (EC 3.2.1.39). Essa enzima é capaz de hidrolisar ligações β -1,3-glucana. A enzima apresenta atividade ótima em pH 8,5 e a 70 °C. O peso molecular dessa enzima foi estimado através de eletroforese de SDS-PAGE em 32 kDa.

Nagata et al. (1990), descreveram a clonagem e expressão do gene da endo- β -1,3-glucanase de *Flavobacterium dormitator* em *Escherichia coli*. O gene desta enzima foi clonado em *E. coli* C600 usando como vetor o plasmídeo pBR322. As células de *E. coli*

contendo o plasmídeo recombinante pKU β G1 (8,2 Kb), mostraram alta atividade de β -1,3-glucanase e atividade lítica sobre células viáveis de leveduras. Estas atividades foram encontradas no espaço periplasmático das células clonadas.

Aono et al. (1992), clonaram e expressaram o gene que codifica a β -1,3-glucanase de *Bacillus circulans* IAM1165, a qual possui peso molecular de 87 kDa, em *Escherichia coli* K-12. O gene da β -1,3-glucanase estava em um fragmento de 2,6 Kb entre os sítios das enzimas de restrição *EcoRI-SmaI*. A atividade enzimática foi encontrada principalmente na fração periplasmática das células de *E. coli* que continham o gene.

Nakabayashi et al. (1998), estudaram a estrutura do gene que codifica a β -1,3-glucanase de *Streptomyces matensis* DIC-108. Essa enzima extracelular, designada como LPHase, é capaz de hidrolisar o polímero de β -1,3-glucana produzindo laminaripentaose como produto. Essa enzima foi parcialmente purificada e sua seqüência N-terminal determinada. O gene para LPHase (*lph*) foi seqüenciado. O gene contém um quadro aberto de leitura (ORF) de 1203 pb o qual codifica um polipeptídeo de 401 aminoácidos. A porção da proteína matura apresenta similaridade significativa com a seqüência dos domínios catalíticos das β -1,3-glucanase de *Oerskovia xanthineolytica* e *Arthrobacter* sp. linhagem YCWD3. Como *lph* não foi expresso inicialmente em *E. coli*, a região codificadora foi amplificada por PCR (polimerase em cadeia) e ligados em um plasmídeo de expressão pKK233-2. Células de *E. coli* JM109 contendo o plasmídeo recombinante pKK-*lph* produziram a β -1,3-glucanase idêntica à glucanase produzida pela *S. matensis* DIC-108.

Sullivan e colaboradores, têm estudado a clonagem e o seqüenciamento do gene que codifica a exo β -1,3-glucanase de *Candida albicans* ATCC10261, bem como estudos de expressão genética. Nesses estudos, a enzima purificada até a homogeneidade, foi seqüenciada e os *primers* utilizados no seqüenciamento do gene foram sintetizados a partir da seqüência deduzida da região N-terminal da proteína. Foi produzido anti-soro para

exoglucanase e através da técnica de Western blot comparou-se essa enzima com glucanases de outros microrganismos. No estudo da estrutura da proteína, não foi encontrado nenhum sítio de N-glicosilação na seqüência. Também foi monitorado a expressão do mRNA transcrito detectado através de Northern blot (Chambers et al., 1993 a). Prosseguindo os estudos, o possível sítio ativo da exo β -1,3-glucanase foi identificado. Através da mutação sítio dirigida da região do gene correspondente ao resíduo de ácido glutâmico (E 230), a atividade enzimática decresceu cerca de 15000 vezes, sugerindo que o ácido glutâmico da seqüência conservada NEP (asparagina, ácido glutâmico e prolina), é um importante sítio catalítico em várias celulasas (Chambers et al., 1993 b; Mackenzi et al., 1997).

Em 1998, Haapalainen et al., estudaram a construção de um vetor integrativo para possibilitar uma transformação estável e a expressão do gene da β -1,3-glucanase em *Clavibacter xyli* subsp. *cynodontis*. Essa bactéria gram negativa é capaz de colonizar o tecido, xilema, de várias plantas causando apenas um sintoma mínimo de doença nas mesmas. Os autores decidiram clonar o gene da endo β -1,3-glucanase com a finalidade dessa bactéria recombinante ser usada como proteção biológica das plantas contra fungos patogênicos. Para isto, foi construído um vetor integrativo capaz de carrear genes externos para um elemento repetitivo no cromossoma de *C. xyli* subsp. *cynodontis*. Usando esse vetor, os autores transformaram *C. xyli* subsp. *cynodontis* com o gene da enzima endoglucanase termoestável de *Clostridium thermocellum*, proveniente da *E. coli* recombinante obtida por Zverlov & Velikodvorskaya em 1990. O gene desta glucanase foi introduzido sob o controle de um promotor forte, previamente isolado do genoma de *C. xyli* subsp. *cynodontis*. A bactéria transformante expressou eficientemente a glucanase ativa, secretando-a no meio de cultura. Os autores concluíram que este vetor integrativo tem a vantagem de se manter de forma estável no cromossomo e que as transformações podem ser mantidas sem o uso de seleção por antibióticos.

Bang et al. (1999), descreveram a clonagem e a caracterização de uma endo β -1,3(4)-glucanase de *Phaffia rhodozyma* CBS 6938. Os autores construíram uma biblioteca de cDNA, a partir do mRNAs isolados da levedura crescida em meio complexo após 2 dias (tempo no qual houve maior produção de glucanase, monitorando-se o sobrenadante do meio de cultura). Aliquotas da biblioteca de cDNA foram transformadas em células de *Saccharomyces cerevisiae*. Dentre 3500 colônias obtidas, apenas 4 transformantes apresentaram atividade de β -glucanase. A análise da seqüência de nucleotídeos revelaram que todas as 4 transformantes continham o mesmo inserto de cDNA de 1,7 kb. Os clones foram identificados em placas contendo AZCL- β -glucana (contendo ligações β -1,3 e β -1,4). Pela análise do gene, verificou-se um quadro aberto de leitura (ORF) de 1275 pares de bases, começando com o codon de iniciação, ATG, na posição 239 e terminando com o codon de terminação, TAG, na posição 1513 predizendo desta forma um polipeptídeo de 424 resíduos e massa molecular calculada em 45 kDa. Os autores também verificaram um aparente peptídeo sinal de 22 aminoácidos, devido ao sinal típico de clivagem entre a Ala-22 e Gly-23, mostrando uma proteína madura de massa molecular estimada em 43 kDa. Através da análise da seqüência de aminoácidos dessa enzima, feita em banco de dados, verificou-se que essa não apresenta nenhuma homologia com outras β -glucanases, exceto com a endo β -1,3(4)-glucanase de *Cochiobolus carbonum*. Esta homologia foi de apenas 36% de identidade e foi encontrada apenas na região C-terminal da enzima.

Giczey et al. (2001), descreveram a clonagem e a caracterização do gene *cmg1*, o qual codifica a exo β -1,3-glucanase de *Coniothyrium minitans*. Este microrganismo é um micoparasita, capaz de penetrar através da parede celular de *Sclerotia sclerotiorum*, a qual contém β -1,3-glucana como seu principal constituinte. Os autores usaram uma estratégia de clonagem baseada no produto da reação de PCR (reação de polimerase em cadeia), marcado, para identificar o gene de interesse a partir da biblioteca de cDNA do fungo. O gene, *cmg1*, foi inserido em células competentes de *Saccharomyces cerevisiae* INVSc1. Resultados da análise do gene sequenciado mostraram que a massa molecular calculada para a proteína madura deduzida foi de 83.346 Da. A análise da proteína deduzida CMG1, produto do gene *cmg1*, revelou 61, 42 e 41% de similaridade com as enzimas EXGA (de *A.*

quisqualis), LAM1.3 (de *T. harzianum*) e EXG1 (de *C. carbonum*) respectivamente. Todas essas três enzimas são exo β -1,3-glucanases fúngicas. A comparação da seqüência da CMG1 com a seqüência da BGN13.1 (de *T. harzianum*), a única endo β -1,3-glucanase clonada de fungo, mostrou baixa homologia (apenas 27%). Indicando, desta forma, que a CMG1 está mais intimamente relacionada com glucanases que atuam como exoenzimas.

3.3. Aplicação das enzimas que lisam a parede celular de leveduras

A lise enzimática da parede celular de leveduras é um processo atrativo. Esse é um método suave de ruptura das células, o qual pode ser usado para a liberação de compostos intracelulares biologicamente ativos como enzimas e proteínas clonadas (Asenjo et al., 1985), também como uma ferramenta essencial para a fusão de células, transformação e engenharia genética de leveduras (Kitamura, 1982).

Segundo descrito por Liu et al. (1988), a ruptura enzimática de células microbianas é um processo interessante pois possui várias aplicações: a) recuperação de proteínas recombinantes como enzimas e hormônios; b) preparação de biopolímeros funcionais da parede celular de leveduras como carboidratos para serem usados como espessantes. Segundo os autores, o sistema lítico apresenta vantagens sobre o processo de ruptura mecânica, pois minimiza o superaquecimento localizado e o estresse causado pelo processo mecânico nas células de leveduras. O tratamento enzimático é um processo mais brando, onde as enzimas atacam os produtos sem danificá-los.

Théodore & Panda (1999), citam que a β -1,3-glucanase é uma enzima lítica importante, a qual tem sido usada para diferenciar taxonomicamente as espécies de leveduras e também para a elucidação da parede celular de fungos e da estrutura da β -1,3-glucana. Essa enzima também tem sido usada como agente de biocontrole contra fungos fitopatogênicos.

Kaneko et al. (1973) estudaram a susceptibilidade de diferentes leveduras às enzimas líticas de *Arthrobacter luteus*. Os autores relataram que o estágio de crescimento, condições de cultivo e tratamento da levedura influenciam a susceptibilidade das células à lise enzimática. A susceptibilidade de células viáveis de *S. carlsbergensis* KI 4055 de cultura estacionária em meio extrato de malte permaneceu alta durante todo o período de cultivo enquanto que a susceptibilidade de células de culturas agitadas diminuiu consideravelmente. A susceptibilidade das células de *S. carlsbergensis* KI 4055 e *Candida lipolytica* KI0048 foi baixa após tratamento térmico em banho-maria por 10 minutos em ebulição. Foi observado que agentes redutores como 2-mercaptoetanol, cisteína-HCl, tioglicolato de sódio, ditiotreitól e sulfito de sódio, aumentaram ligeiramente a susceptibilidade de células viáveis e células tratadas termicamente à lise enzimática.

Fujino et al. (1974) descreveram a preparação de extrato de levedura utilizando enzimas líticas de *Arthrobacter luteus*. A levedura prensada foi tratada com as enzimas líticas por 4,5 horas a 30 °C. Em seguida a amostra foi incubada a 45 °C por 11,5 horas para a autólise final. O extrato de levedura obtido mostrou bom balanço de aminoácidos exceto aminoácidos sulfurados. O extrato de levedura obtido como descrito acima apresentou melhores resultados para cultivo de *Lactobacillus arabinosus* e *Streptococcus faecalis*.

A aplicação de enzimas líticas do *Basidiomycete aphyllorphoroles* na produção de extrato de levedura foi descrita por Ryan & Ward (1988). O extrato de levedura é um agente flavorizante usado na indústria de alimentos e também como fonte de vitaminas e outros nutrientes em alimentos funcionais e meios de cultivo de microrganismos. O processo mais usado para a produção de extrato de levedura envolve plasmólise preliminar ou estágio de rompimento seguido por autólise da levedura, um processo de digestão que envolve as enzimas da própria levedura. Entretanto, a aplicação de β -1,3-glucanase líticas na produção de extrato de levedura tem sido estudada visando o aumento do rendimento do extrato uma vez que grande quantidade de produto residual é produzido.

Outra possível aplicação das enzimas líticas está na extração de pigmentos da levedura *Phaffia rhodozyma*. Esse pigmento vermelho é uma fonte potencial de dieta de astaxantina usado em ração de aves domésticas e salmão. Okagbue & Lewis (1983) estudaram a produção de enzimas líticas de *Bacillus circulans* WL-12 e a produção de pigmento astaxantina pela levedura *Phaffia* em cultura mista.

Vários estudos utilizam enzimas líticas para a obtenção de protoplastos. Gunge & Sakaguchi (1981) estudaram a transferência intergenérica do plasmídeo responsável pelo fenótipo “killer” de *Kluyveromyces lactis* em células de *Saccharomyces cerevisiae* através de fusão. Os autores utilizaram a enzima Zymolyase (Kirin Brewery Co) na suspensão de células para formar protoplastos. Assim a célula de *S. cerevisiae* que recebeu o plasmídeo expressou o mesmo fenótipo “killer” do doador *K. lactis* e se tornou resistente a esta toxina “killer”.

Crumplen et al. (1990), utilizaram a técnica de fusão de protoplastos para aumentar a osmotolerância de leveduras. Os protoplastos de várias espécies de leveduras do gênero *Saccharomyces* foram obtidos utilizando-se enzima lítica 0,01% glusulase (Dupont Pharmaceuticals). Os produtos de fusão foram comparados quanto a sua osmotolerância com os parentais. Os produtos de fusão apresentaram maior rendimento fermentativo em meios contendo maior porcentagem de açúcares. De forma que a fusão de esferoplastos mostra ser uma ferramenta disponível para a obtenção de novas linhagens de leveduras com maiores características fermentativas.

Sulo et al. (1992), construíram através de fusão de protoplastos, uma linhagem industrial de levedura para vinho com características “killer”. Os autores utilizaram as enzimas líticas de *Helix pomatia* para a obtenção dos protoplastos. A linhagem de *S. cerevisiae* com característica “killer” mostrou maior competitividade do que a parental. Em 1995, Javadekar et al., estudaram a construção de leveduras industriais altamente

floculantes e com característica “killer” por meio de fusão de protoplastos utilizando as enzimas líticas da Novozyme 234.

Huang et al. (1991) descreveram um método para a separação diferencial de bioprodutos de células de leveduras. O método utiliza uma combinação de agentes físicos, químicos e biológicos com enzimas líticas de *Oerskovia xanthineolytica*, suportes osmóticos e estabilizantes de esferoplastos. Usando esta técnica produtos como enzimas e outras proteínas podem ser liberadas de locais específicos das células em diferentes estágios do processo. As proteínas associadas com a parede são liberadas primeiro e a enzima lítica é removida junto com as proteínas da parede neste estágio. Em segundo lugar, os produtos do citosol são liberados por um tratamento suave durante o qual as organelas permanecem intactas. Finalmente as proteínas específicas são liberadas enquanto outras são mantidas no interior de diferentes compartimentos celulares. Os autores relataram que o método pode ser utilizado com concentrações relativamente altas de leveduras (até 145 g de peso seco/L). Esse método possibilita maior recuperação de produtos e bem maior seletividade comparando-se ao método de ruptura mecânica.

Nobel et al. (2000), utilizaram a enzima lítica comercial Zymolyase como agente de enfraquecimento da parede celular de leveduras. Este trabalho teve como intuito desvendar a via metabólica, de leveduras, essencial para a manutenção da integridade da célula. Os resultados indicaram que o enfraquecimento da parede celular, ativa a via Slt2/Mpk1 MAP quinase a qual resulta em mudanças compensatórias na estrutura da parede de levedura. Essa alteração da parede celular, demonstra um aumento na termotolerância e resistência à glucanases pelas células, e reflete como as células dependem do mecanismo compensatório frente ao estresse do meio. Pavia et al. (2001), usaram a enzima Zymolyase para a digestão da parede celular da levedura *Candida albicans* no estudo de secreção, interação e do mecanismo de incorporação de dois antígenos O-glicosilados da parede celular de levedura.

Becerra et al. (2001), estudaram novas estratégias de secreção da enzima β -galactosidase de *Kluyveromyces lactis*. Essa enzima, também denominada como lactase, hidrolisa a lactose em glicose e galactose e tem importante utilização na indústria de alimentos prevenindo a cristalização da lactose e aumentando o poder adoçante. Essa enzima, entretanto, não é normalmente excretada no meio de cultura, o que dificulta o processo de sua recuperação. Os autores examinaram várias estratégias para conseguir excretar essa enzima no meio de cultura. Para este estudo, os autores construíram plasmídeos recombinantes contendo o gene que codifica para a enzima β -galactosidase fundido com sinal de secreção de toxina “killer” de *K. lactis* ou com o sinal de secreção do fator α de *Saccharomyces cerevisiae*. Para avaliar o local de secreção da enzima β -galactosidase, os autores utilizaram a enzima lítica comercial Lyticase (de *Arthrobacter luteus*; Sigma Chemical) no fracionamento celular. Células de *K. lactis* foram tratadas com a enzima lítica e a atividade de β -galactosidase pôde assim ser medida nas frações periplasmática, citoplasmática e nos resíduos de parede celular.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Microrganismo

A linhagem *Cellulomonas cartae* 191, selecionada previamente (Ferro et al., 1997) como melhor produtora de β -1,3-glucanase entre seis linhagens de bactérias que lisam a parede celular de leveduras viáveis, foi escolhida para este estudo.

4.2. Plasmídeo e célula competente

Na clonagem do gene de β -1,3-glucanase de *C. cartae* 191, foi usado o plasmídeo pBluescript II KS (Stratagene, EUA) (Figura 2). As células da bactéria *Escherichia coli* DH5 α foram utilizadas como células competentes.

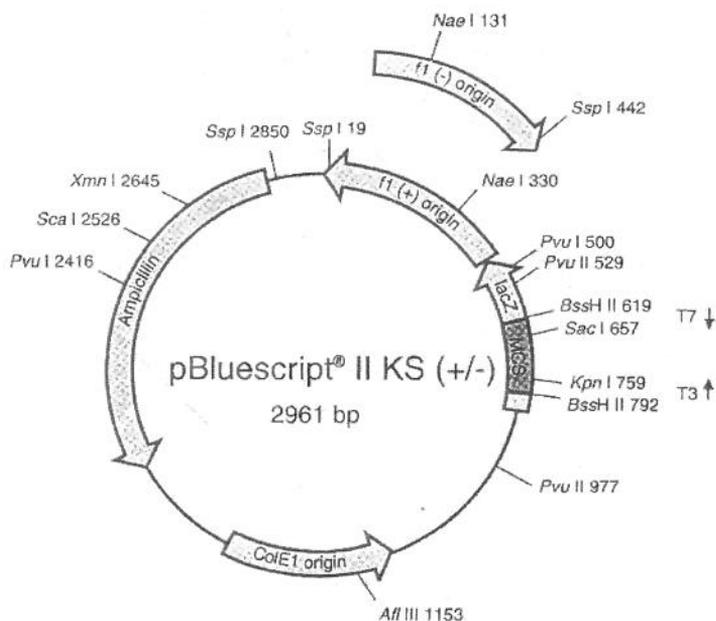


Figura 1 – Plasmídeo pBluescript II KS.

4.3. Meios de cultivo dos microrganismos

4.3.1. Meio de isolamento

K_2HPO_4	0,57 g
$NH_4H_2PO_4$	0,12 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,02 g
Ágar	1,50 g
Água deionizada qsp	100 mL

4.3.2. Meio TYM (meio de manutenção)

Triptona	0,50 g
Extrato de malte	0,30 g
Extrato de levedura	0,30 g
K_2HPO_4	0,60 g
$NH_4H_2PO_4$	0,12 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,03 g
Ágar	2,00 g
Parede celular de levedura	1,00 g
Água deionizada qsp	100 mL

4.3.3. Meio Scott, S.H. & Schekman, R. (1980) (meio de crescimento)

KH_2PO_4	1,36 g
$(NH_4)_2SO_4$	0,20 g
KOH	0,42 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,02 g
$Fe_2(SO_4)_3 \cdot 6H_2O$	0,0001 g
Tiamina	0,0001 g
Biotina	0,0001 g
Fonte de carbono	1,00 g
Água deionizada qsp	100 mL

4.3.4. Meio Scott & Schekman modificado

$(NH_4)_2SO_4$	0,20 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,02 g
Parede celular de levedura	1,00 g
Tampão fosfato de sódio, 0,2M pH 7,5 qsp	100 mL

4.3.5. Meio YPD

Extrato de levedura	1,00 g
Peptona	2,00 g
Glicose	2,00 g
Água deionizada qsp	100 mL

4.3.6. Meio LB

Triptona	1,2 g
Extrato de levedura	2,4 g
Glicerol	0,4 mL
Tampão fosfato*	10 mL
Água deionizada qsp	100 mL

* T. fosfato de potássio, 1M, pH 7,5

4.3.7. Meio SOB

Ágar	1,5 g
Triptona	2,0 g
Extrato de levedura	0,5 g
NaCl	0,05 g
KCl 250mM	1 mL
MgSO ₄ 2M	1 mL
Água deionizada qsp	100 mL

Adicionou-se ampicilina ao meio após autoclavado, na concentração de 100 µg/mL.

4.4. Preparação da parede celular de levedura obtida por rompimento mecânico

A parede celular de levedura foi usada como indutor da produção da enzima lítica. A preparação da parede celular de levedura foi obtida por rompimento mecânico por Dyno Mill como descrito por Córdoba, 1996.

Uma amostra de 2 Kg de levedura comercial Fleischman foi suspensa em 8 L de água destilada resfriada a 5 °C. A suspensão de levedura foi submetida a tratamento em

Dyno Mill com fluxo de 80 mL/minuto a 2.500 rpm e pérolas de vidro de 0,02-0,05 mm. Após o tratamento, a suspensão de massa celular lisada mecanicamente foi centrifugada a 10.000 rpm a 5 °C por 15 minutos. O precipitado foi lavado com água destilada a 5 °C e liofilizado.

4.5. Métodos de determinação

4.5.1. Determinação da atividade da enzima β -1,3-glucanase

A atividade de β -1,3-glucanase foi determinada utilizando laminarina como substrato como descrito por Saeki et al. (1994). A mistura de 0,25 mL de solução 1% de laminarina de *Laminaria digitata* em tampão acetato de sódio 0,1M, pH 5,5 e 0,25 mL de solução de enzima foi incubada a 55 °C por 30 min. A reação foi paralisada por aquecimento a 100 °C por 3 min. Os açúcares redutores foram determinados pelo Método de Somogyi-Nelson utilizando-se glicose como padrão. Uma unidade de atividade enzimática foi expressa como a quantidade de enzima capaz de liberar um μ mol de açúcar redutor, equivalente a glicose, por minuto.

4.5.2. Determinação da atividade de liticase

A atividade lítica foi determinada utilizando-se células de *Saccharomyces cerevisiae* 2180a. As células de *S. cerevisiae* foram crescidas em agitador rotatório a 200 rpm, 28 °C por 24 horas em 10 mL de meio YPD líquido (descrito no item 4.3.5.). As células foram centrifugadas a 10.000 rpm durante 10 minutos a 5 °C e ressuspensas em tampão fosfato 0,05 M, pH 7,5 até obter-se DO a 600 nm em torno de 1,2. A mistura de 1,5 mL de suspensão celular, 5 μ l de β -mercaptoetanol para concentração final de 0,04 M e 0,5 mL da solução enzimática (sobrenadante do meio de cultura) foi incubada a 30 °C por 30 minutos. Após incubação, a mistura de reação foi agitada e a densidade ótica determinada a 600 nm. Preparou-se tubo Branco substituindo-se 0,5 mL da solução enzimática por 0,5 mL de

tampão fosfato 0,05 M, pH 7,5 na mistura de reação. Uma unidade de atividade lítica foi expressa como a quantidade de enzima capaz de produzir 10 % de diminuição da DO inicial em 30 minutos.

4.5.3. Dosagem de proteína – Método de BCA

A concentração de proteína foi determinada pelo método de BCA utilizando-se solução 1mg/mL de soro albumina bovina como padrão conforme descrito por Smith et al. (1985). O reagente de BCA foi preparado pela mistura de reagente A e B na proporção de 50:1 (v/v). O reagente A foi constituído de 1% de BCA (bicinchoninic acid), 2% de $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0,16% de tartarato de sódio, 0,4% de hidróxido de sódio e 0,95% de bicarbonato de sódio. O reagente B foi constituído de 4% de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$. A mistura de 10 μl de amostra e 200 μl de reagente de BCA foi incubada a 37 °C por 30 minutos. As amostras foram resfriadas até temperatura ambiente e a medida de absorbância determinada a 540 nm em “Microtitre Plate Easyreader”.

4.5.4. Determinação do crescimento celular

O crescimento do microrganismo foi determinado pela medida da absorbância da suspensão celular a 660 nm como descrito por Ueda & Nanri, 1967 e Ferro, 2002.

4.6. Efeito inibitório da linhagem *Cellulomonas cartae* 191 sobre fungos

Inicialmente, foi avaliada a ação da linhagem 191 em fungos superiores. Alguns fungos causadores de doenças em citros foram testados. Os fungos testados foram *Penicillium italicum*, *Penicillium digitatum* e *Geotrichum* sp. Cada placa, contendo o meio de isolamento, foi submetida a uma aspersão de um dos três tipos de esporos fúngicos (10^4

esporos por mL) através de nebulizador asséptico. A linhagem *C. cartae* 191 foi estriada em cada placa com uma alça e as placas foram incubadas em estufa a 30° C.

4.7. Produção da enzima β -1,3-glucanase pela linhagem *Cellulomonas cartae* 191

4.7.1. Produção da enzima β -1,3-glucanase utilizando-se diferentes indutores

A produção da β -1,3-glucanase pela linhagem *C. cartae* 191 foi testada utilizando-se 1% de parede celular de leveduras obtida por rompimento mecânico com Dyno Mill (Córdoba, 1996), 1% de glucana de levedura insolúvel em meio alcalino (Manners et al., 1973), 1% de levedura autoclavada (Scott & Schekman, 1980) ou 1% de levedura seca (Instant yeast) e 0,5% de glicose.

Fermentação em frascos Erlenmeyer

A cultura de 24 horas da linhagem 191 em tubo inclinado de ágar TYM, foi inoculada em frascos Erlenmeyer de 50 mL em duplicatas contendo 10 mL do meio de cultivo descrito por Scott & Schekman (1980) contendo diferentes indutores de enzimas líticas já citados. Os frascos foram incubados com agitação de 150 rpm a 30°C. Após incubação por 48 horas, o sobrenadante foi separado por centrifugação a 10.000 rpm durante 10 minutos a 5 °C, e a atividade de β -1,3-glucanase foi determinada como descrito anteriormente.

4.7.2. Produção da β -1,3-glucanase em frascos agitados

A cinética de produção de β -1,3-glucanase pela linhagem *C. cartae* 191 foi testada em meio de cultivo descrito por Scott & Schekman (1980) contendo 1% de parede celular de levedura em frascos agitados.

Preparação do pré inóculo

A cultura de 24 horas da linhagem de *C. cartae* 191, em tubo inclinado de ágar TYM, foi inoculada em frasco de Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio de cultivo contendo 1% de parede celular de levedura. O frasco foi incubado a 150 rpm por 24 horas a 30 °C.

Crescimento e produção da enzima lítica em agitador rotatório

A fermentação foi realizada em frascos de 50 mL contendo 10 mL de meio de cultivo. Em cada frasco foi adicionado 1 mL do pré-inóculo preparado como descrito acima. Os frascos foram incubados a 150 rpm, 30 °C e duplicatas foram analisadas após 3, 6, 9, 12, 18, 24, 30, 36, 48, 72 e 96 horas de crescimento. A atividade de β -1,3-glucanase e a massa celular foram determinadas de acordo com os itens 4.5.1. e 4.5.4. O pH do meio de cultura fermentado também foi monitorado em todos os tempos.

4.7.3. Modificação do meio de cultivo descrito por Scott & Schekman para a produção da β -1,3-glucanase

O efeito das vitaminas biotina e tiamina e do sulfato férrico no meio de cultivo descrito por Scott & Schekman (1980) citado no item 4.3.3., foi avaliado na produção da enzima β -1,3-glucanase de *Cellulomonas cartae* 191. Testou-se 1) meio de cultivo descrito por Scott & Schekman contendo todos os componentes exceto as vitaminas biotina e tiamina; 2) meio de cultivo descrito por Scott & Schekman contendo todos os componentes exceto o sulfato férrico e 3) meio de cultivo descrito por Scott & Schekman contendo todos os componentes mas trocando-se os compostos KH_2PO_4 e KOH por tampão fosfato de sódio 0,2M pH 7,5.

A fermentação foi realizada em frascos de 50 mL contendo 10 mL de cada meio de cultivo (1 ou 2 ou 3), usando-se o meio de cultivo descrito por Scott & Schekman completo

como controle (4). Os frascos foram incubados a 150 rpm, 30 °C e duplicatas analisadas após 24 horas de crescimento.

4.7.4. Efeito da concentração de indutor, pH e agitação na produção da β -1,3-glucanase

A produção da enzima lítica β -1,3-glucanase em agitador rotatório foi testada utilizando-se planejamento experimental. O tipo de planejamento escolhido foi o planejamento fatorial de dois níveis (Box et al., 1978 citado por Neto et al., 1995). Este planejamento consiste na seleção de dois níveis para cada variável de entrada (variável independente) e na execução de experimentos para todas as possíveis combinações. Este tipo de planejamento é de grande utilidade em investigações preliminares, quando se deseja saber se certos fatores têm ou não influência sobre a resposta. O planejamento consistiu de 2^3 ensaios diferentes. Este é o número mínimo para se ter um planejamento fatorial completo. Foram acrescentados mais ensaios, que são as repetições para o cálculo do erro experimental. As variáveis independentes e seus níveis neste estudo foram: concentração de indutor (0,15-1,85%); pH (2,6-9,4) e agitação (60-240 rpm) (Tabela 1).

Tabela 1 - Variáveis independentes e seus níveis:

Variáveis independentes	- α	- 1	0	+ 1	+ α
% de indutor					
(parede celular de levedura)	0,15	0,5	1,0	1,5	1,85
Agitação (rpm)	60	100	150	200	240
pH inicial	2,6	4,0	6,0	8,0	9,4

onde $\alpha = 1,68$

Foram utilizados frascos de Erlenmeyer de 50 mL contendo 10 mL de meio de cultivo Scott & Schekman modificado descrito no item 4.3.4., usando-se, entretanto, soluções tampão de diferentes valores de pH. Foram usados tampão citrato-fosfato pH 2,6 e

pH 4,0, tampão fosfato pH 6,0 e pH 8,0 e tampão borato de sódio pH 9,4. A resposta a ser estudada (variável dependente) foi a produção da β -1,3-glucanase após 24 horas de fermentação a 30°C. A atividade de β -1,3-glucanase foi determinada como descrito no item 4.5.1. Os dados foram analisados através do programa STATISTICA (versão 5.0) usando-se a opção Planejamento experimental.

4.8. Purificação da β -1,3-glucanase lítica

4.8.1. Escolha da resina para a purificação da β -1,3-glucanase

Inicialmente, foram desenvolvidos testes para selecionar o pH e o tipo de resina de troca iônica a serem utilizados na purificação da β -1,3-glucanase lítica de *C. cartae* 191. Testaram-se as resinas DEAE-Sepharose e CM-Sepharose equilibradas em diferentes valores de pH, usando-se o teste em tubo como descrito a seguir.

Teste em tubo: foram preparados soluções tampão acetato na concentração 0,01M nos seguintes valores de pH 4,5; 5,0; 5,5; 6,0; 6,5. Foram adicionados 0,5 mL de resina Sepharose, CM ou DEAE, em tubos eppendorfs e cada gel foi lavado 10 vezes com um dos tampões para equilibrar a resina. Amostras de 0,2 mL de solução de β -1,3-glucanase, já pré ajustadas no pH da resina, foram adicionadas aos tubos. Misturou-se, invertendo os tubos por 10 minutos, centrifugou-se e analisou-se a atividade de β -1,3-glucanase residual do sobrenadante como descrito no item 4.5.1.

Em seguida foi verificado se a enzima β -1,3-glucanase lítica podia ser eluída da resina de troca iônica DEAE-Sepharose com NaCl. As amostras, de resina nos valores de pH 5,0 a 6,5, foram estocadas a 8 °C por cerca de 60 horas e posteriormente adicionou-se NaCl para a concentração final de 1 M. As amostras foram misturadas, invertendo-se os tubos. Em seguida as amostras foram centrifugadas e a atividade de β -1,3-glucanase residual dos sobrenadantes foram analisadas, como descrito no item 4.5.1. Determinou-se a

atividade de β -1,3-glucanase da solução de enzima ajustada para pH 6,5, sem ser introduzida na resina, como controle. A atividade de liticase ou de lise de leveduras também foi avaliada no sobrenadante da amostra ajustada no pH 6,0 antes (controle) e depois de ser aderida à resina DEAE-Sepharose. A atividade residual de liticase foi medida após 30 e 60 minutos de reação, através da redução da absorbância a 600 nm como descrito no item 4.5.2.

4.8.2. Produção e purificação da β -1,3-glucanase em coluna de DEAE-Sepharose Fast Flow

A enzima extracelular, β -1,3-glucanase, foi produzida em frascos de 2L contendo 400mL de meio de Scott & Schekman modificado contendo 1% de parede celular de levedura. O microrganismo foi crescido por 24 horas a 200 rpm, 30 °C. Foram obtidos 2L de sobrenadante bruto. O sobrenadante bruto foi concentrado 10 vezes por ultrafiltração usando-se o sistema VIVA FLOW de membranas de exclusão de 10 kDa. O sobrenadante retido (>10 kDa) foi então dialisado contra o tampão acetato de sódio 0,01 M, pH 5,5 e denominado preparação bruta de β -1,3-glucanase. A purificação foi desenvolvida na resina escolhida, em coluna de DEAE-Sepharose Fast Flow de 22 cm X 1,5 cm, usando-se gradiente linear de sal (0 a 1 M NaCl) e vazão de 1 mL/minuto. Cada pico de proteína (monitorados a 280 nm) eluído da coluna, foi concentrado em tubo de centrífuga contendo membrana de exclusão de 10 kDa, e dialisado separadamente contra tampão acetato 0,01M, pH 5,5. A atividade de β -1,3-glucanase, a atividade lítica sobre células de *Saccharomyces cerevisiae* e a quantidade de proteína foram dosadas, como descrito respectivamente nos itens 4.5.1., 4.5.2. e 4.5.3., durante todas as etapas da purificação.

4.8.3. Eletroforese de proteínas –SDS-PAGE

As frações de cada pico de absorbância a 280 nm eluídos da coluna de purificação de DEAE-Sepharose Fast Flow foram reunidas e concentradas por speed vac. As quatro

amostras (Pico 1, Pico 2, Pico 3 e Pico 4) foram aplicadas no gel de Dodecil sulfato de sódio-poliacrilamida (SDS-PAGE) como descrito no método de Laemmli (1970), usando-se gel de separação a 12,5%.

A amostra do sobrenadante bruto e o do sobrenadante concentrado e dialisado (aplicado na coluna de purificação) também foram monitorados quanto ao seu perfil eletroforético no gel, bem como a enzima lítica comercial Zymolyase 100T usada como padrão. A eletroforese foi desenvolvida a 130 V por cerca de 2 horas e o gel foi corado com Coomassie Blue R250. Como padrão de peso molecular, foi usado o padrão HMW da BioRad, composto das proteínas de peso molecular Miosina (PM 200.000), β -galactosidase (PM 116.250), Fosforilase b (PM 97.400), Soro albumina (PM 66.200), Ovalbumina (PM 45.000), Anidrase carbônica (PM 31.000), Inibidor de tripsina (PM 21.000). As frações do Pico 2, contendo a β -1,3-glucanase lítica de *C. cartae* 191 purificada através da eletroforese SDS-PAGE, foi utilizada para a determinação da seqüência de aminoácidos N-terminal como descrito a seguir.

4.9. Análise da seqüência de aminoácidos N-terminal da β -1,3-glucanase

A proteína purificada, após eletroforese de SDS-PAGE foi transferida para membrana de PVDF (“polyvinylidene difluoride”) por “electroblotting” a 60 mA durante 60 minutos. A membrana foi rapidamente corada com Coomassie Blue R250 e a banda recortada para seqüenciamento.

A região N-terminal da proteína foi sequenciada em sequenciador de fase gasosa, por degradação de Edman automatizada como descrito por Toida et al. (1998). A banda da enzima lítica comercial Zymolyase 100T também foi transferida e seqüenciada, para ser usada como padrão comparativo. Os resíduos de aminoácidos foram comparados em banco de dados.

4.10. Clonagem do gene da β -1,3-glicanase de *Cellulomonas cartae* 191

4.10.1. Estratégia de clonagem do gene da β -1,3-glicanase lítica

A estratégia de clonagem do gene da β -1,3-glicanase lítica de *C. cartae* em bactéria *Escherichia coli* abrangeu três etapas. Essa estratégia facilitou as subclonagens posteriores para o seqüenciamento do gene inteiro. A primeira etapa correspondeu à clonagem do fragmento correspondente a região do gene que codifica a proteína nativa após ser processada, o que foi designado como Clone A. Onde o plasmídeo obtido contendo esse fragmento foi denominado de pGS7. A segunda etapa, o qual foi referido como Clone B, correspondeu à clonagem do fragmento do gene contendo parte da região antes do ATG, início do quadro aberto de leitura (ORF) do gene e a região que codifica o peptídeo sinal. O plasmídeo obtido contendo este fragmento foi denominado de pGSB. Na terceira etapa foi feita a construção do plasmídeo recombinante onde os dois fragmentos Clone A e Clone B foram inseridos dentro de um único vetor pBluescript II KS e usado na transformação tendo a *E. coli* DH5 α como célula competente, o qual foi designado como Clone C. O plasmídeo obtido contendo este fragmento foi denominado de pGSC.

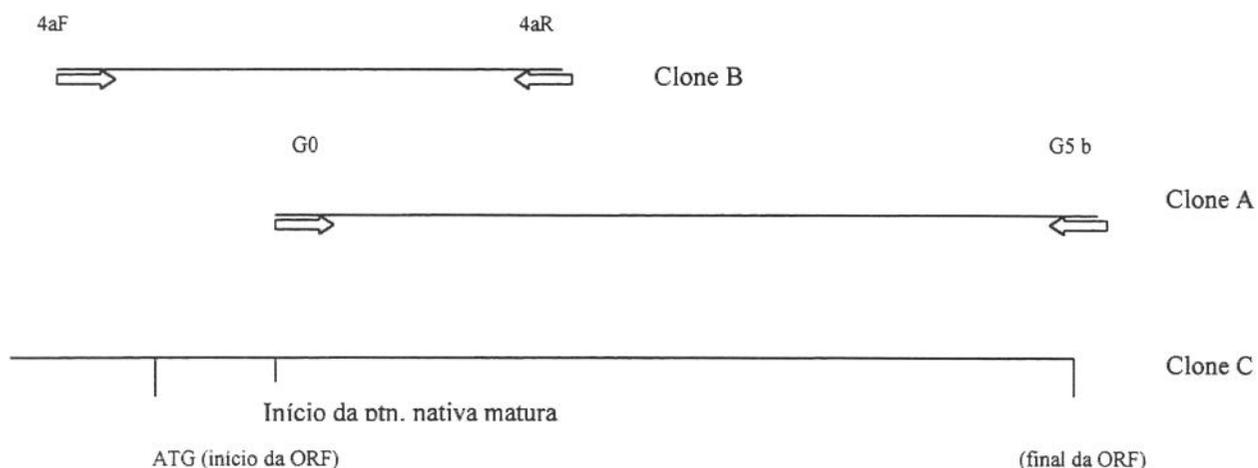


Figura 2 - Estratégia de clonagem: As setas indicam os *primers* usados na reação de PCR para clonagem do gene.

4.10.2. Extração do DNA genômico de *Cellulomonas cartae* 191

O DNA bacteriano foi extraído para ser utilizado como molde na amplificação do gene através da reação de PCR.

O microrganismo *C. cartae* 191 foi crescido em 10 mL de caldo nutriente por 24 horas em agitador rotatório a 180 rpm, 30°C. Após centrifugação a 10.000 rpm durante 10 minutos a 5°C, as células foram ressuspensas em 25 mL de cloreto de sódio 1M e agitadas por 1 hora a 4°C. As células foram centrifugadas novamente a 10.000 rpm durante 10 minutos a 5°C, e ressuspensas em 25 mL de tampão TES gelado (Tris 0,01M pH 8,0- EDTA 0,025M- NaCl 0,15M). As células foram mais uma vez centrifugadas nas mesmas condições anteriores e ressuspensas em 5 mL de tampão TE gelado (= tampão TES sem o NaCl). Foi adicionado 0,5 mL de solução de lisozima (2 mg/mL em tampão TE) e a suspensão celular foi incubada por 15 minutos a 37°C. Após incubação, foi adicionado 0,6 mL de solução de Sarkosyl-proteinase K (10% de Sarkosyl e proteinase K a 5 mg/mL em tampão TE) e a amostra foi incubada a 37°C por 1 hora. O DNA foi extraído três vezes com 5 mL de fenol (saturado com Tris 0,01M pH 8,0). O sobrenadante coletado foi extraído uma vez com 5 mL de clorofórmio. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo e precipitada com 0,54 volumes de isopropanol (temperatura ambiente). A solução foi estocada em freezer por 24 horas e centrifugada 12.000 rpm por 15 minutos. O DNA precipitado foi então suspenso em 0,2 mL de tampão Tris (0,01M pH 8,0- EDTA 0,001M).

O DNA genômico foi testado quanto a sua integridade em gel de agarose 1% em tampão TAE 1X (onde tampão TAE 50X = 242 g de Tris, 57,1 mL de ácido acético glacial e 100 mL de EDTA 0,5M pH 8,0 para 1L). As amostras foram desenvolvidas a 100 V durante 1 hora e 30 minutos. O gel foi corado com solução de brometo de etídio por 15 minutos e visualizados em luz UV. O DNA genômico foi quantificado em espectrofotômetro na absorvância de 260 nm, onde Abs=1 é igual a 50 µg/mL de DNA.

4.10.3. Reação de amplificação do gene

Na reação de PCR (reação de polimerase em cadeia), foram utilizados o DNA genômico preparado como descrito no item 4.10.2. e os oligonucleotídeos *primers* sintetizados obtidos pela SIGMA GENOSYS. Os *primers* obtidos, estão mostrados na Tabela 2.

Para o preparo do Clone A, os oligonucleotídeos *primers* degenerados utilizados foram baseados na seqüência de aminoácidos N-terminal da β -1,3-glucanase lítica purificada do meio de cultura (*primer* sense, G0) e na região de consenso de glucanases obtida de banco de dados utilizando-se o website BioNavigator (*primer* antisense, G5a e G5b). Na extremidade dos oligonucleotídeos *primers*, foram inseridas seqüências para reconhecimento da enzima de restrição *Bam*HI.

Para o preparo do Clone B, foram usados *primers* baseados na seqüência acima do início da ORF do gene da β -1,3-glucanase de *Oerskovia xanthineolytca* (*primer* sense, 4aF) e na seqüência interna, após o sítio de reconhecimento para a enzima de restrição *Xho*I, do Clone A já seqüenciado (*primer* antisense, 4aR).

Tabela 2 - Oligonucleotídeos *primers* usados na reação de PCR

<i>Primer</i>	Seqüência	Posição *
G0	GGGGATCCGTICCGIACIATHCCIIYTIACIATHACIAAYGA	334 - 368
G5a	GGGGATCCTGIGCIKYIGTIYSRTTRCAIGTCCA	1859 - 1835
G5b	GGGGATCCTALARIGTCCAICKYTIGICYTCIGTYTGRITRCAIGTCC	1880 - 1835
4aF	ACCGGCCGGCGTCGTAGTG	1 - 15
4aR	GCGCGTGCGGTAGGAGTTC	990 - 972

Onde: A= adenina; C= citosina; T= timina; G=guanina; I= inosina; R= A+G; Y= C+T; K= G+T; S= G+C; H= A+T+C.

* Na seqüência completa ilustrada na Figura 23.

Para a reação de amplificação, foram utilizadas algumas condições recomendadas: solução de 10 pmol/ μ L de cada *primer*, REDTaq DNA polimerase (SIGMA) e solução de 10 mM de dNTPs. Entretanto, as condições ótimas para a amplificação do gene de β -1,3-glucanase lítica por PCR foram testadas.

- Tempo e temperatura de hibridação (annealing)

As temperaturas usadas foram 37, 45, 50 e 65°C por 20 segundos ou 60 segundos

- Número de ciclos

Foram testados 30 ou 40 ciclos

- DMSO (Dimethyl sulphoxide)

DMSO é utilizado em DNA com alto conteúdo de G+C como auxiliar na desnaturação. Tendo em vista que o conteúdo de G+C no gene de β -1,3-glucanase de *Oerskovia xanthineolytica* é acima de 72%, resolveu-se testar o uso de DMSO a 10% na reação.

- Concentração de Magnésio ($MgCl_2$)

Testou-se as concentrações de $MgCl_2$ variando de 1,5 mM a 4 mM nas reações.

- Temperatura de alongamento (elongation)

Visto que os *primers* apresentavam alto T_m , testou-se as temperaturas de 72 e 75°C.

- Diferentes concentrações de DNA genômico (template)

Variou-se a concentração de DNA genômico na faixa de 0,04 a 1,5 μ g.

4.10.4. Preparo do Clone A e Clone B

Após a amplificação, os fragmentos de DNA (para o Clone A ou Clone B) foram purificados através de QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN). Os fragmentos foram dissolvidos em 30 μ l de tampão Tris-HCl 10mM, pH 8,5 e clivados com as enzimas de restrição específicas para cada clone. Para o preparo do Clone A, foi usada a digestão com enzima *Bam*HI de acordo com as condições ótimas de digestão descritas pelo fabricante (BIOLABS), ou seja, incubando-se a 37 °C por 1 hora e a reação foi paralisada por aquecimento a 80 °C por 20 minutos. E para o Clone B, as enzimas de restrição usadas

foram *XhoI* e *SmaI*. Onde o fragmento de DNA purificado, foi primeiramente clivado com *XhoI* incubando-se a 37 °C por 1 hora e a reação foi interrompida por aquecimento a 65 °C por 20 minutos. Em seguida o fragmento foi precipitado da solução com etanol e posteriormente clivado com *SmaI*, incubando-se a 25 °C por 1 hora e a reação foi paralisada por tratamento térmico a 65 °C por 20 minutos.

O vetor pBluescript II KS, também foi clivado no seu sítio múltiplo de clonagem (MCS) com a mesma enzima de restrição usada para o fragmento (inserto) de cada clone. O vetor após clivagem foi então defosfatado usando-se a enzima fosfatase alcalina TsAP nas condições padrões de incubação a 65 °C por 15 minutos e a reação foi paralisada por aquecimento a 65 °C por mais 15 minutos.

O vetor e o inserto foram isolados e extraídos do gel de agarose 1% usando QIAEX II Agarose Gel Extraction Kit (QIAGEN). O vetor e o inserto, clivados, foram quantificados através de gel de agarose a 1% usando-se padrões de 2,5 a 100 ng de DNA. Ambos foram ligados usando-se a enzima T4 DNA Ligase (na proporção de no mínimo 1:3 fmol vetor:inserto) e incubados a 16 °C por 16 horas. O plasmídeo contendo o inserto foi inserido em células competentes de *E. coli* DH5 α .

4.10.5. Construção do plasmídeo recombinante (Clone C)

Os dois fragmentos do gene, inseridos nos plasmídeos pGS7 e pGSB foram inseridos juntos em um só plasmídeo. Este clone contendo o plasmídeo recombinante com a seqüência do gene completa, foi designado de pGSC.

Para a estratégia de construção do plasmídeo pGSC, foi levado em consideração os sítios de restrição possíveis dentro do MCS dos vetores. A estratégia escolhida constituiu, primeiramente, da inversão de sentido do pGS7, o qual foi designado como pGS7-. O

pGS7-, contém o mesmo fragmento do clone pGS7, mas apresenta-se no sentido contrário em relação aos promotores T3 (sense) e T7 (antisense). Isto foi facilitado pela presença dos dois sítios para a enzima de restrição *Bam*HI. Portanto para o preparo deste clone, o pGS7 foi clivado com a enzima *Bam*HI e religado com a enzima T4 ligase, e incubados a 16 °C por 16 horas. O plasmídeo contendo o inserto foi inserido em células competentes de *E. coli* DH5 α .

Continuando a estratégia escolhida para construção do plasmídeo recombinante contendo o gene de β -1,3-glucanase completo, os plasmídeos pGS7- e pGSB foram clivados com a enzima de restrição *Xho*I. O pGSB clivado foi defosfatado usando a enzima fosfatase alcalina TsAP.

O vetor (pGSB, clivado e defosfatado) e o fragmento obtido de pGS7-, foram extraídos do gel de agarose, purificados usando QIAEX II Agarose Gel Extraction Kit (QIAGEN) e quantificados através de gel de 1% de agarose como descrito anteriormente. O vetor e o fragmento foram ligados usando-se a enzima T4 DNA Ligase e incubados a 16°C por 16 horas (reação de ligação). O plasmídeo recombinante foi inserido em células competentes de *E. coli* DH5 α , usando-se o método de transformação descrito a seguir.

4.11. Transformação de *E. coli* DH5 α

Para a transformação das células, adicionou-se 10 μ l de reação de ligação, contendo cerca de 100ng de DNA, em 100 μ l de células competentes *E. coli* DH5 α . Após 5 minutos em banho de gelo, a suspensão de células foi inoculada em placas de ágar SOB contendo ampicilina (meio descrito no item 4.3.7.) e incubadas a 37 °C por 16 horas. Os transformantes foram selecionados usando-se IPTG/X-Gal e resistência a ampicilina como descrito a seguir.

4.11.1. Seleção dos transformantes

A seleção dos transformantes contendo o inserto desejado foi desenvolvido da seguinte forma: Cada colônia branca (translúcida), obtida das placas de meio SOB como descrito acima, foi transferida para cada tubo contendo 2 mL de meio LB com ampicilina na concentração de 100µg/mL (descrito no item 4.3.6.). Os tubos foram incubados a 37 °C por 16 horas em agitador rotatório a 200 rpm. Após crescimento, centrifugou-se 1,5 mL de cada amostra em tubos de microcentrífuga a 12.000 rpm por 2 minutos. Os sobrenadantes foram descartados. As células foram ressuspensas em 350 µl de STET (8% de sacarose; 50 mM de Tris pH 8,0; 50 mM de EDTA; 5% de Triton X-100), adicionou-se 25 µl de solução de 10 mg/mL de lisozima (preparado fresco) e misturou-se usando o vortex. As soluções foram colocadas em banho em ebulição por 40 segundos e centrifugadas imediatamente por 10 minutos a 12.000 rpm. Os materiais gelatinosos foram removidos com palitos de dente esterilizados, e ao sobrenadantes foram adicionados o mesmo volume de isopropanol. Incubou-se a -20°C por 5 horas, e centrifugou-se durante 15 minutos a 12.000 rpm. Os precipitados, contendo o DNA plasmidial, foram lavados com 500 µl de etanol 95% a -20°C e centrifugados por mais 2 minutos. Os precipitados foram secos e então, ressuspensos em tampão TE (Tris 0,01M pH 8,0- EDTA 0,025M).

Os plasmídeos recombinantes obtidos das diferentes colônias, foram submetidos a clivagem com a mesma enzima de restrição usada para a preparo do clone, nas mesmas condições de digestão. As amostras de plasmídeos recombinantes intactos e plasmídeos clivados foram analisados em gel de agarose a 1% em tampão TAE 1X (onde tampão TAE 50X = 242 g de Tris, 57,1 mL de ácido acético glacial e 100 mL de EDTA 0,5M pH 8,0 para 1L). As amostras foram submetidas a eletroforese a 80 V durante 1 hora e 30 minutos. Os géis foram corados com solução de brometo de etídio por 15 minutos e visualizados em luz UV.

Após ter sido selecionado o plasmídeo recombinante desejado, este foi produzido em quantidade suficiente para as análises posteriores, usando-se o protocolo da QIAGEN-tip 500 (Maxi) e quantificado através da medida da absorbância a 260 nm.

4.12. Mapa de restrição do inserto – Clone A

O plasmídeo recombinante, pGS7 foi clivado individualmente com as enzimas de restrição: *Bam*HI, *Xba*I, *Hind*III, *Xho*I, *Kpn*I, *Sal*I, *Eco*RI, *Pst*I, *Sac*I, *Sma*I, *Not*I, *Bst*XI e *Eco*RV nas condições ótimas de cada enzima. O mapa de clivagem teve como finalidade mostrar os sítios de clivagens internos do inserto. Foram desenvolvidos subclones, baseando-se nestes sítios internos, para o seqüenciamento do DNA do gene completo. Os subclones foram desenvolvidos da mesma forma descrita para os clones usando-se as enzimas de restrição específicas.

4.13. Seqüenciamento do gene da β -1,3-glucanase lítica de *C. cartae* 191

Os clones e subclones foram seqüenciados em Sequenciador automático ABI PRISM Model 377 segundo metodologia padrão e a análise do DNA do gene foi feita em Banco de dados (NCBI website- National Center for Biotechnology Information), comparando-se com a seqüência da β -1,3-glucanase lítica de *Oerskovia xanthineolytica* (GenBank M38734). O gene foi seqüenciado em ambos os sentidos (5'→3' e 3 →5'). Foram desenvolvidos *primers* para completar o seqüenciamento total do gene de β -1,3-glucanase lítica de *Cellulomonas cartae* 191 (Tabela 3)

Tabela 3- Oligonucleotídeos *primers* usados no seqüenciamento total do gene da β -1,3-glucanase lítica de *C.cartae* 191.

<i>Primer</i>	<i>Seqüência</i>
AR	GCGAGGACCGCCGCGCAC
BF	CCGAGGTGTGGAACCTCCTAC
IF	AAGCTCGCGCACCCAGCAGATGG
JR	GAAGGGTCCAGCTTGATGAAG
KF	CGGCCTTCACGAAGCCCG

A= adenina; C= citosina; T= timina; G=guanina

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Efeito inibitório da linhagem *Cellulomonas cartae* 191 sobre fungos

O efeito inibitório da linhagem *Cellulomonas cartae* 191 no crescimento dos fungos *Penicillium italicum*, *Penicillium digitatum* e *Geotrichum* sp. foi realizado como descrito no item 4.6.

A Figura 3 ilustra o halo de inibição de crescimento do fungo fitopatogênico *P. digitatum*, causador do mofo verde em frutas cítricas, pela linhagem *C. cartae* 191 produtora das enzimas β -1,3-glucanase, protease lítica e quitinase. A linhagem 191 não inibiu o crescimento de *Geotrichum* sp. O *Penicillium italicum* não cresceu o suficiente no meio de isolamento, descrito no item 4.3.1., para ser avaliado.

Vários trabalhos citam o uso da β -1,3-glucanase como importante enzima lítica não só usada para a lise da parede celular de leveduras mas também como agente de biocontrole contra fungos fitopatogênicos (Théodore & Panda, 1994). A β -1,3-glucana é o principal componente da parede celular da maioria dos fungos e é degradada por β -1,3-glucanases (Giczey et al., 2001).

Esse resultado mostra, portanto, que a linhagem *C. cartae* 191 não só é capaz de lisar células de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* (como descrito por Ferro et al., 1997) mas também fungos superiores (Figura 3).



Figura 3 - Halo de inibição do crescimento do fungo *Penicillium digitatum* pela linhagem de *Cellulomonas cartae* 191.

5.2. Produção da enzima β -1,3-glucanase pela linhagem *Cellulomonas cartae* 191

5.2.1. Produção da enzima β -1,3-glucanase utilizando-se diferentes indutores

O efeito da glicose e dos indutores parede celular de levedura obtida por rompimento mecânico com Dyno Mill, glucana de levedura insolúvel em meio alcalino, levedura autoclavada e levedura instantânea foram testados como descrito no item 4.7.1. na produção da β -1,3-glucanase de *Cellulomonas cartae* 191.

Os resultados mostraram que a β -1,3-glucanase de *C. cartae* 191, é uma enzima cuja síntese é induzível, pois não foi produzida na presença de glicose como única fonte de carbono (Figura 4).

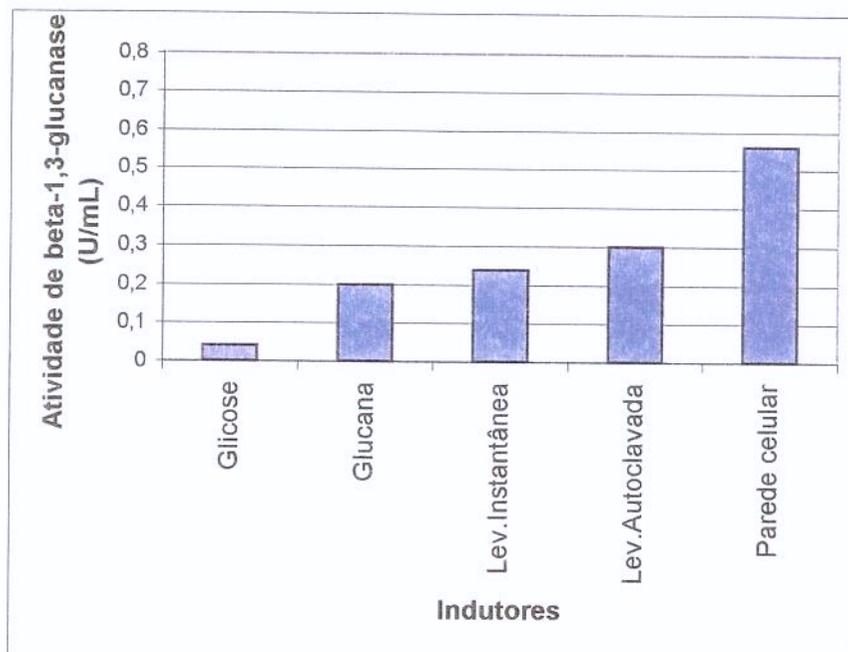


Figura 4 – Estudo da produção de β -1,3-glucanase pela linhagem *C. cartae* 191 usando 1% de diferentes indutores: meio de cultura contendo glicose, glucana insolúvel em meio alcalino, levedura instantânea, levedura autoclavada e parede celular de levedura extraída mecanicamente.

A Figura 4 ilustra que a síntese da enzima glucanase da linhagem 191 foi induzida pela glucana de levedura insolúvel em meio alcalino, pela levedura instantânea, pela levedura autoclavada e pela parede celular de levedura extraída mecanicamente em Dyno Mill. Os resultados mostraram, entretanto, que a glucana de levedura insolúvel em meio alcalino foi o pior indutor testado na produção desta enzima, apresentando atividade de β -1,3-glucanase de cerca de 0,20 U/mL após 48 horas de crescimento do microrganismo. Dentre os indutores testados, o que apresentou melhor resultado foi a parede celular de levedura Fleischmann obtida por rompimento com Dyno Mill. Na presença deste indutor foi obtido cerca do dobro de atividade de β -1,3-glucanase (0,56 U/mL) quando comparado com a atividade obtida pela levedura instantânea e pela autoclavada (0,23 e 0,30 U/mL respectivamente).

Andrews & Asenjo (1987), observaram que a síntese da β -1,3-glucanase de *Oerskovia xanthineolytica* está sujeita a repressão catabólica pela glicose e é induzida pela glucana de levedura insolúvel.

No meio descrito por Scott & Schekman (1980) para a produção de enzimas líticas pela linhagem de *O. xanthineolytica*, os autores utilizaram 1,5% de levedura autoclavada como indutor no meio de cultura ou 0,4% de glucana de levedura insolúvel. Os autores verificaram que a atividade de β -1,3-glucanase é induzida com ambos os indutores. Foi obtida produção máxima de β -1,3-glucanase com levedura autoclavada após 20 horas enquanto que na presença do indutor glucana de levedura insolúvel só foi obtida produção máxima da enzima após 45 horas.

Saeki et al. (1994), descreveram a produção da β -1,3-glucanase de *O. xanthineolytica* TK1 em meio de cultura contendo glucana de levedura (0,3%) como fonte indutora da enzima lítica. Os autores mediram a atividade enzimática após 24, 36, 48 e 60 horas de crescimento do microrganismo. A atividade enzimática do sobrenadante do meio de cultura fermentado, foi medida da mesma forma descrita neste trabalho, exceto que os autores determinaram a atividade de β -1,3-glucanase na temperatura de 30 °C ao invés de 55 °C (temperatura ótima de atividade da β -1,3-glucanase de *C. cartae* 191 descrita por Ferro & Sato (1997). A produção da enzima β -1,3-glucanase obtida por Saeki e colaboradores, foi de cerca de 0,09 U/mL durante todos os tempos analisados.

Nossos resultados demonstram que a linhagem de *C. cartae* 191 é boa produtora da enzima β -1,3-glucanase, principalmente usando a parede celular de levedura obtida por rompimento mecânico com Dyno Mill no meio de cultura como indutor. Portanto esse indutor foi escolhido para o estudo de produção da β -1,3-glucanase.

5.2.2. Produção da β -1,3-glucanase em frascos agitados

A produção da β -1,3-glucanase em frascos agitados a 30 °C pela linhagem *C. cartae* 191 foi realizada como descrito no item 4.7.2.

Foi obtido maior produção de β -1,3-glucanase (cerca de 0,70 U/mL) após 24 horas de fermentação a 30 °C (Figura 6). Após 48, 72 e 96 horas de fermentação foram obtidos respectivamente 0,56; 0,42 e 0,32 Unidades de β -1,3-glucanase/mL. O pH do meio de cultura não variou muito durante a fermentação, mantendo-se na faixa de 6,5 - 7,0. A determinação do crescimento celular pela medida do aumento da absorbância a 660 nm foi dificultada pela presença das partículas de parede celular de levedura no meio de cultivo.

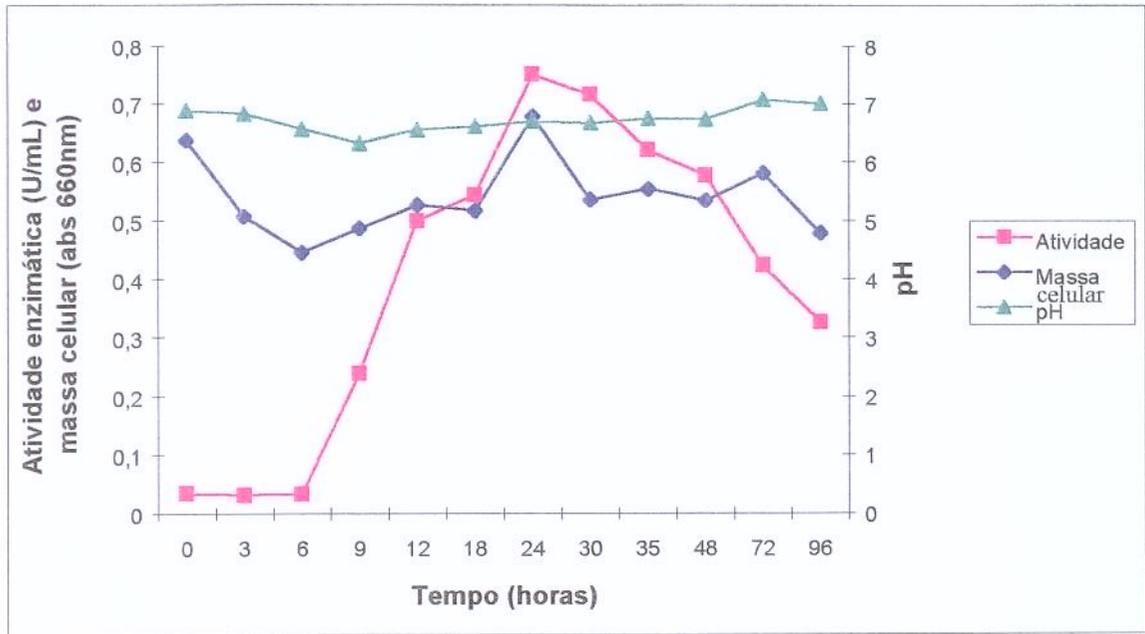


Figura 5 – Produção da β -1,3-glicanase da linhagem *C. cartae* 191 em frascos agitados.

5.2.3. Modificação do meio de cultivo descrito por Scott & Schekman para a produção da β -1,3-glicanase

O efeito das vitaminas biotina e tiamina, do sulfato férrico e da adição de tampão no pH 7,5 no meio de cultivo descrito por Scott & Schekman (1980), foi avaliado na produção da enzima β -1,3-glicanase de *Cellulomonas cartae* 191 como descrito no item 4.7.3.

A Tabela 4 e Figura 6 ilustram que o pH do meio de cultivo teve maior influência na produção de β -1,3-glicanase do que a presença das vitaminas e do sulfato férrico no meio de cultivo. Foi obtido maior atividade de β -1,3-glicanase (1,06 U/mL) no meio de cultivo número 3, o qual contém todos os componentes do meio descrito por Scott & Schekman exceto que os compostos KH_2PO_4 e KOH foram substituídos por tampão fosfato de sódio 0,2 M pH 7,5.

Tabela 4- Efeito das vitaminas, do sulfato férrico e do pH do meio de cultivo na produção de β -1,3-glucanase de *C. cartae* 191.

Meios de cultivo	pH final	Atividade (U/mL)
1	6,80	0,71
2	6,77	0,68
3	7,40	1,06
4	6,93	0,73

Onde os meios de cultivo são:

- 1 = Meio Scott & Schekman sem vitaminas
- 2 = Meio Scott & Schekman sem sulfato férrico
- 3 = Meio Scott & Schekman tamponado em pH 7,5
- 4 = Meio Scott & Schekman completo (controle)

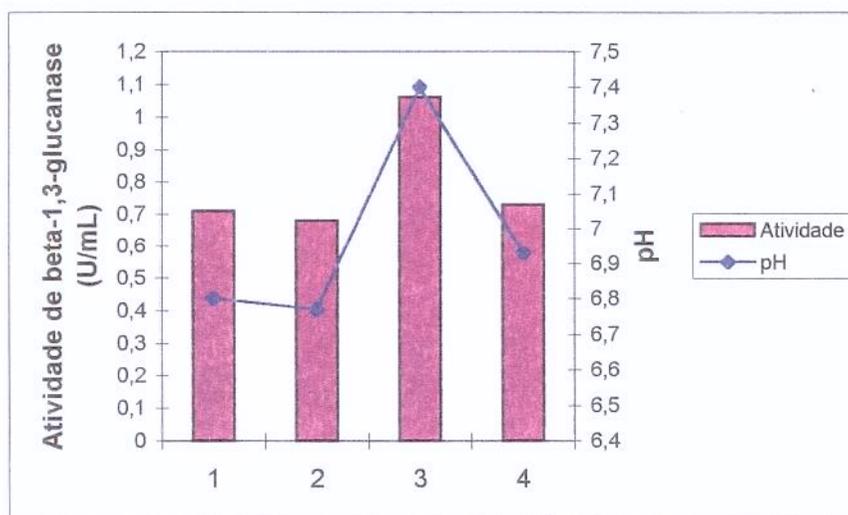


Figura 6 - Efeito das vitaminas, do sulfato férrico e do pH do meio de cultivo na produção de β -1,3-glucanase de *C. cartae* 191.

Como as vitaminas e o sulfato férrico do meio não tiveram efeito significativo na produção da enzima β -1,3-glucanase de *C. cartae* 191, foi possível a modificação do meio original de Scott & Schekman (1980) facilitando, assim, o seu uso para os estudos seguintes.

5.2.4. Efeito da concentração de indutor, pH e agitação na produção da β -1,3-glucanase

O efeito da concentração do indutor selecionado (parede celular de levedura), da agitação e do pH do meio de cultura na produção de β -1,3-glucanase pela linhagem de *Cellulomonas cartae* 191 foi estudado como descrito no item 4.7.4. Os resultados são mostrados na Tabela 5.

Tabela 5 - Planejamento fatorial: níveis das variáveis e resposta em atividade de β -1,3-glucanase

ENSAIOS	Variáveis independentes			Resposta ATIVIDADE ENZIMÁTICA (U/mL)
	% INDUTOR	AGITAÇÃO	pH	
1	-1,00	-1,00	-1,00	0,111
2	1,00	-1,00	-1,00	0,050
3	-1,00	1,00	-1,00	0,166
4	1,00	1,00	-1,00	0,151
5	-1,00	-1,00	1,00	0,429
6	1,00	-1,00	1,00	0,443
7	-1,00	1,00	1,00	0,717
8	1,00	1,00	1,00	1,026
9	-1,68	0,00	0,00	0,227
10	1,68	0,00	0,00	0,277
11	0,00	-1,68	0,00	0,146
12	0,00	1,68	0,00	0,400
13	0,00	0,00	-1,68	0
14	0,00	0,00	1,68	0,929
15 (C)	0,00	0,00	0,00	0,297
16 (C)	0,00	0,00	0,00	0,488
17 (C)	0,00	0,00	0,00	0,456

C = ensaio no ponto central

Pela análise estatística dos dados, foi obtida a seguinte tabela de efeitos:

Tabela 6 – Tabela de efeitos do planejamento fatorial (usando limite de confiança de 90%).

Fatores	Efeitos	Coefficientes	p
Interações significativas	0,371353 *	0,371353 *	0,004434 *
Indutor	0,048487	0,24243	0,473492
RPM	0,212959 *	0,106480 *	0,061421 *
pH	0,541762 *	0,270881 *	0,010282 *

Onde * significa significativo, pois, todo $p < 0,1$ é significativo no limite de confiança de 90%.

Analisando-se o efeito das três variáveis sob a produção da enzima β -1,3-glucanase, verificou-se que o pH e a agitação (rpm) dos frascos foram efeitos significativos (Tabela 6). A parede celular de levedura, usada como indutor, não influenciou a produção da enzima dentro das concentrações testadas. Porém, essa é uma enzima cuja síntese é induzida e não é produzida na ausência de indutor.

O pH foi a variável que mais influenciou na produção da β -1,3-glucanase, sendo que os melhores resultados foram obtidos em pH mais alcalino. Houve um aumento da produção da β -1,3-glucanase proporcional ao aumento da agitação. Estes resultados podem ser evidenciados pelos perfis obtidos nos gráficos (Figura 7, 8 e 9). O efeito da interação entre o pH e a agitação não foi significativo, considerando-se o nível de 90% de confiança, bem como os efeitos quadráticos.

A equação linear que pode explicar a produção da β -1,3-glucanase em função das variáveis significativas (usando-se os valores codificados para pH e rpm) é:

$$\text{Produção} = 0,27088 (\text{pH}) + 0,10648 (\text{rpm}) + 0,37135$$

Tabela 7 – Análise de variância (ANOVA)

Fonte de variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F calculado	F tabelado
Regressão	1,157	2	0,579	36	2,73
Resíduo	0,218	14	0,016		
Falta de Ajuste	0,197	12			
Erro Puro	0,021	2			
Total	1,375	16			

Adotando o nível de confiança de 90%, obtivemos os valores acima para a tabela ANOVA. Obteve-se um coeficiente de regressão (R^2) de 0,84.

Para o teste de F, o valor calculado através da tabela acima foi de 36 (= MQ regressão/ MQ resíduos). Enquanto que o valor tabelado para os graus de liberdade de 2 para a regressão e de 14 para os resíduos é de 2,73. Desta forma obtivemos um valor cerca de 13 vezes maior do que o tabelado para F. Isto indica que o modelo é estatisticamente significativo e preditivo.

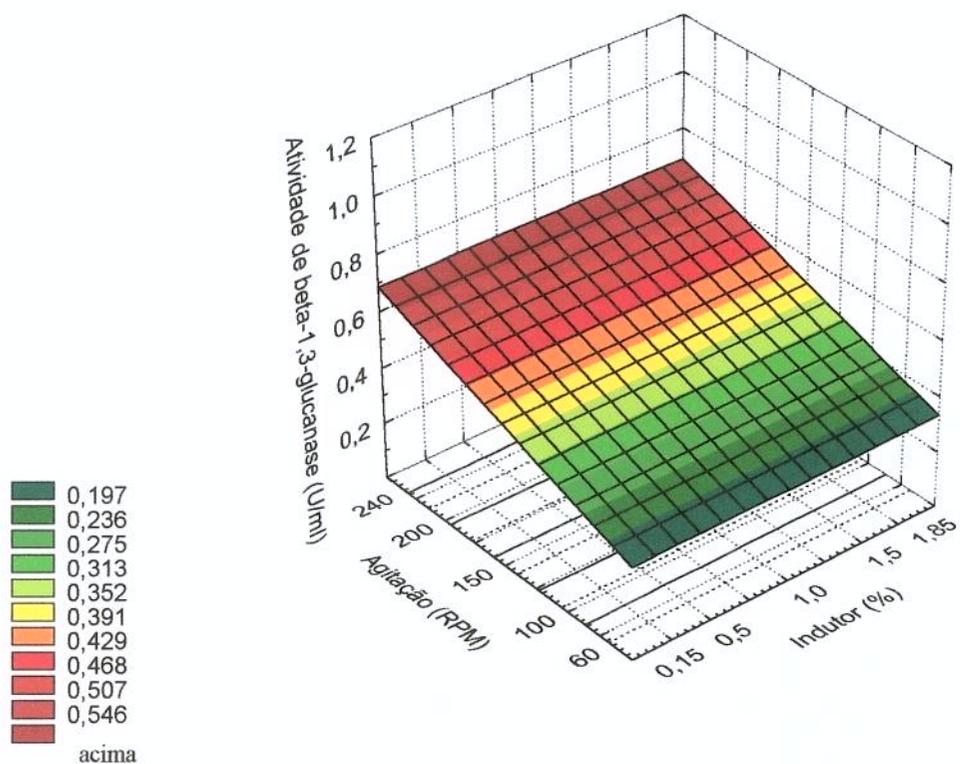


Figura 7 – Efeito da concentração de indutor e da agitação na produção da β -1,3-glicanase de *C. cartae* 191.

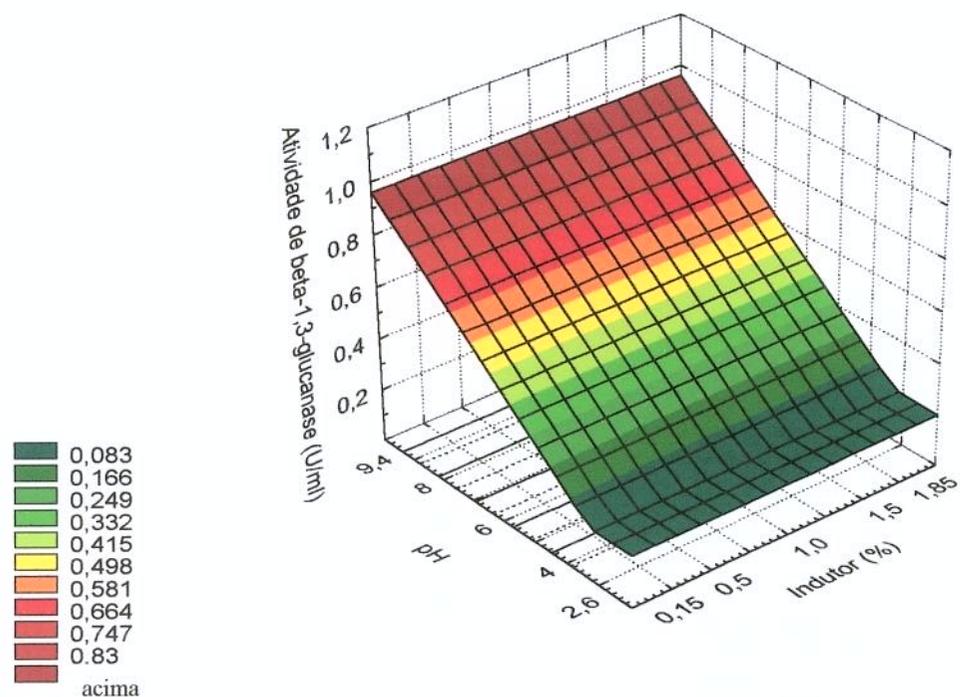


Figura 8 – Efeito da concentração de indutor e do pH na produção da β -1,3-glicanase de *C. cartae* 191.

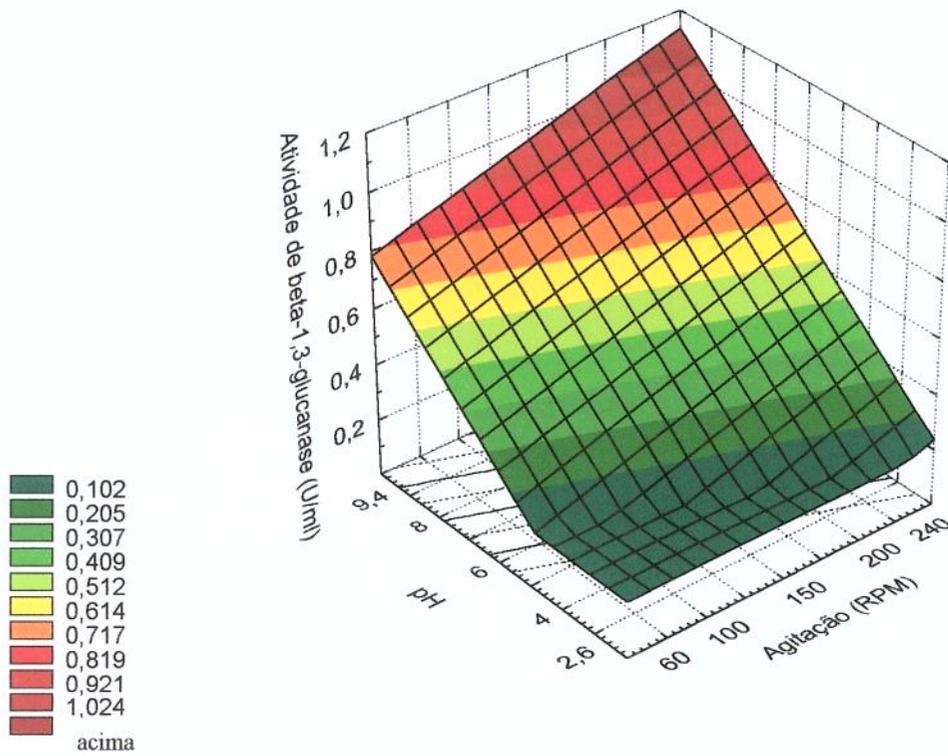


Figura 9 – Efeito da agitação e do pH na produção da β -1,3-glucanase de *C. cartae*

191.

Pelos resultados obtidos dos gráficos de superfície de resposta, verificou-se que para obter melhor produção da enzima β -1,3-glucanase deve ser utilizado o meio de cultura em pH acima de 6,0 e agitação acima de 150 rpm. Escolheu-se pH 7,5 levando-se em consideração que em pH muito elevado pode se diminuir a estabilidade da enzima e, também, para facilitar a etapa posterior de purificação da enzima, na qual a enzima foi dialisada em tampão pH 5,5. Para a produção dessa enzima, foi escolhido a agitação dos frascos a 200 rpm (ponto +1 do experimento, ensaio 8). Como a concentração de indutor não foi um fator relevante, a concentração de 1% de parede celular foi mantida como anteriormente no meio original.

Em 1994, Théodore & Panda, usaram o método de superfície de resposta para determinar as concentrações ótimas dos nutrientes do meio para a produção da β -1,3-glucanase de *Trichoderma harzianum*. Os autores usaram o planejamento de Plackett-Burman para selecionar as variáveis significativas. Dos 13 diferentes componentes do meio, 5 foram significativos ao nível de 80% de confiança, os quais foram agrupados em fonte de nitrogênio, fonte de carbono e fonte de fosfato. Estes componentes foram novamente analisados, utilizando desta vez, o planejamento experimental fatorial de dois níveis. O planejamento consistiu de 2^3 ensaios diferentes, com dois pontos axiais ($\alpha=2$) e 6 repetições no ponto central, obtendo-se um total de 20 ensaios. Os autores mostraram que o uso de métodos estatísticos e técnicas de otimização foi uma ferramenta válida para a formulação do meio de cultura apropriado para a produção da β -1,3-glucanase de *Trichoderma harzianum*. Pois no meio original os autores conseguiam obter 0,375 U/mL da enzima e no meio otimizado, foi possível obter 0,652 U/mL, ou seja, quase o dobro de atividade.

Seguindo-se as condições otimizadas de pH, rpm e concentração de indutor, neste estudo, foi obtido uma produção da β -1,3-glucanase de *Cellulomonas cartae* 191 igual a 1,28 U/mL (dados obtidos no item 5.3.2.). Quando comparamos a produção dessa enzima em experimento anterior (dados obtidos no item 5.2.3.), o qual foi igual a 0,73 U/mL, verificamos também que o planejamento experimental foi uma ferramenta válida.

5.3. Purificação da β -1,3-glucanase lítica

5.3.1. Escolha da resina para a purificação da β -1,3-glucanase

A escolha da resina de troca iônica e do pH do tampão para a purificação da β -1,3-glucanase foi realizada como descrito no item 4.8.1. A Tabela 8 ilustra a atividade residual de β -1,3-glucanase no sobrenadante das amostras de resinas CM-Sepharose Fast Flow e DEAE-Sepharose Fast Flow equilibradas em soluções tampão com diferentes valores de pH. Verificou-se alta atividade de β -1,3-glucanase nos sobrenadantes das amostras de resina CM-Sepharose Fast Flow equilibradas em soluções tampão na faixa de pH 4,5 a 6,5. A β -1,3-glucanase foi adsorvida na resina DEAE-Sepharose Fast Flow equilibradas nos valores de pH 5,0 a 6,5, sendo totalmente adsorvida nos valores de pH 5,5 a 6,0.

Tabela 8- Teste de adsorção da β -1,3-glucanase nas resinas de troca-iônica CM-Sepharose Fast Flow e DEAE-Sepharose Fast Flow equilibradas em soluções tampão em diferentes valores de pH.

Resina	Atividade de β -1,3-glucanase (U/mL)
CM Sepharose	
pH 4,5	>0,53
pH 5,0	>0,53
pH 5,5	>0,53
pH 6,0	>0,53
pH 6,5	>0,53
DEAE Sepharose	
pH 4,5	0,48
pH 5,0	0,01
pH 5,5	0
pH 6,0	0
pH 6,5	0,12

A Tabela 9a ilustra que a β -1,3-glucanase adsorvida nas amostras de resina DEAE-Sephrose Fast Flow equilibrada em soluções tampão pH 5,0; 5,5; 6,0 e 6,5 foi eluída com NaCl 1M. Verificou-se que a liticase ou seja a enzima β -1,3-glucanase com atividade de lise da parede celular de levedura adsorvida na resina DEAE-Sephrose Fast Flow equilibrada em soluções tampão 6,0 foi eluída com NaCl 1M (Tabela 9b).

Tabela 9a- Teste de eluição da β -1,3-glucanase da resina de troca-iônica DEAE-Sephrose Fast Flow com NaCl 1M.

Resina	Atividade de β -1,3-glucanase (U/mL)
DEAE Sepharose	
pH 5,0	0,52
pH 5,5	0,53
pH 6,0	0,39
pH 6,5	0,45
pH 6,5 controle	>0,53

Tabela 9b- Teste de eluição da liticase da resina de troca-iônica DEAE-Sephrose Fast Flow com NaCl 1M.

	Atividade lítica (U/mL)	
	após 30min	após 60min
DEAE Sepharose		
pH 6,0	3,6	4,1
pH 6,0 controle	5,1	8,6

A resina DEAE-Sepharose equilibrada em tampão pH 5,5 foi escolhida para a purificação da β -1,3-glucanase lítica de *Cellulomonas cartae* 191 porque a enzima foi completamente adsorvida neste pH e pode ser melhor eluída com NaCl 1M neste pH do que em pH 6,0.

5.3.2. Produção e purificação da β -1,3-glucanase

5.3.2.1. Produção da β -1,3-glucanase

A enzima β -1,3-glucanase lítica de *Cellulomonas cartae* 191 foi produzida em frascos Erlenmeyer de 2L como descrito no item no item 4.8.2. Foram obtidos 2L de sobrenadante bruto contendo alta atividade de β -1,3-glucanase (2.560 U totais) e atividade lítica sobre células de *Saccharomyces cerevisiae* (36.200 U totais). Obteve-se 200 mL finais de sobrenadante bruto concentrado por ultrafiltração (> 10 kDa) e dialisado contra tampão acetato de sódio 0,01 M, pH 5,5.

5.3.2.2. Purificação da β -1,3-glucanase em coluna de DEAE-Sepharose Fast Flow

A purificação foi desenvolvida na resina aniônica DEAE-Sepharose, equilibrada em pH 5,5; como descrito no item 4.8.2. A Figura 10 ilustra o fracionamento do sobrenadante do meio de cultura concentrado e dialisado em coluna de DEAE-Sepharose Fast Flow. Foram obtidos 4 picos de proteínas eluídos com 0,03 a 0,10 M; 0,10 a 0,45 M; 0,45 a 0,56 M e 0,56 a 0,93 M de NaCl. As frações do segundo pico, contendo 5 mg/mL de proteína, eluídas com NaCl na concentração entre 0,1-0,45 M apresentaram maior atividade de β -1,3-glucanase e liticase. Considerando-se a atividade de β -1,3-glucanase a preparação enzimática foi purificada somente 1,18 vezes enquanto que considerando a atividade de liticase, a preparação enzimática foi purificada cerca de 5,1 vezes (Tabela 10).

Abs. a 280 nm

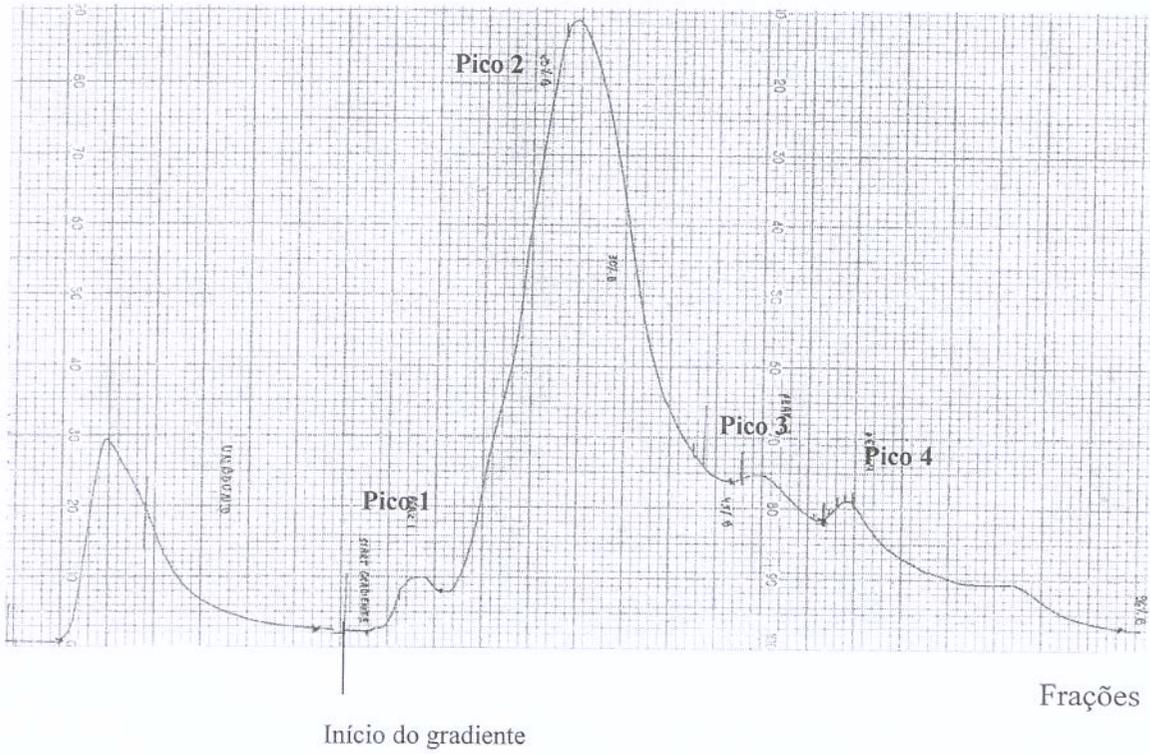


Figura 10 – Perfil da purificação da β -1,3-glucanase em coluna de DEAE-Sepharose Fast Flow.

Tabela 10- Purificação da β -1,3-glucanase lítica de *C. cartae* 191.

Etapa de procedimento	Ativ. de β -1,3-glucanase (U total)	Ativ. de liticase (U total)	Proteína (mg)	Ativ específica de glucanase (U total/mg)	Ativ. específica de liticase (U total/mg)	Purificação	
						glucanase	liticase
Prep. bruta	40	493	469	0,080	1,1	1	1
Pico 2	9,4	560	100	0,094	5,6	1,18	5,1

Onde :

Preparação bruta = sobrenadante do meio de cultura concentrado e dialisado aplicado na coluna

Pico 2 = Frações do segundo pico

A β -1,3-glucanase foi purificada somente 1,18 vezes considerando-se a atividade da enzima sobre laminarina de *Laminaria digitata*, porém avaliando-se a atividade de liticase utilizando-se células viáveis de levedura, a preparação enzimática foi purificada cerca de 5,1 vezes (Tabela 10).

Em diferentes trabalhos descritos na literatura, foram usadas diferentes resinas e métodos de purificação da enzima β -1,3-glucanase lítica. Doi et al. (1973), purificaram a β -glucanase lítica de *Arthrobacter* sp. O sobrenadante do meio de cultura foi concentrado em rotavapor usando temperatura abaixo de 40 °C. O concentrado foi tratado com uma solução de sulfato de protamina e em seguida centrifugado para a remoção de ácidos nucleicos. O concentrado foi aplicado em coluna CM-celulose equilibrada em pH 4,5. Os autores verificaram que o concentrado continha grande quantidade de polissacarídeos, principalmente manana de levedura, os quais foram removidos através da cromatografia em CM-celulose. O pico eluído contendo atividade de glucanase foi novamente aplicado em coluna DEAE-Sephadex, onde foi possível separar diferentes glucanases. Os autores citam que o pico da glucanase lítica foi eluído primeiro e que o outro pico contendo o outro tipo de glucanase, denominado como glucanase do tipo II, foi eluído em seguida.

Em 1976, Doi et al., estudaram o comportamento diferencial das espécies moleculares de β -1,3-glucanases de *Arthrobacter* sp. em coluna cromatográfica Avicel. A resina foi equilibrada no tampão fosfato 0,01M, pH 6,8. Os autores descreveram que a fração de β -1,3-glucanase com maior atividade lítica ficou adsorvida à coluna enquanto que a fração de β -1,3-glucanase com baixa atividade não foi adsorvida.

Scott & Schekman, 1980, utilizaram cromatografia em resina de CM-celulose e Bio-Gel P-150 para purificar a enzima β -1,3-glucanase lítica de *Oerskovia xanthineolytica*. Os autores citaram que, quando este microrganismo era crescido em meio contendo levedura autoclavada ou glucana como indutores, este produzia e secretava uma série de enzimas hidrolíticas como β -1,3-glucanase, quitinase e protease. O sobrenadante do meio de cultura, foi concentrado com polietileno glicol e adsorvido em coluna CM-celulose equilibrada em pH 5,0. O pico eluído em 0,25M de NaCl, foi recromatografado em coluna de filtração em gel Bio-Gel P-150, o qual rendeu dois picos de proteínas. O primeiro pico continha atividade de β -1,3-glucanase lítica, e o segundo de protease.

Saeki et al. (1994), purificaram a β -1,3-glucanase lítica de *Oerskovia xanthineolytica* TK-1. Este microrganismo foi crescido em meio contendo glucana de levedura como indutor. O sobrenadante do meio de cultura foi concentrado 10 vezes em relação ao volume inicial, através de ultrafiltração usando membrana Diaflo YM-10 (limite de exclusão de 10 kDa). O concentrado retido (>10 kDa) foi então aplicado em coluna cromatográfica aniônica DEAE-Sephacel equilibrada em pH 7,0 e a enzima glucanase foi eluída em 1M de NaCl. As frações contendo atividade de β -1,3-glucanase foram reunidas e aplicadas em coluna de DEAE-Toyopearl 650M, equilibrada em pH 8,0. Novamente, as frações contendo atividade desta enzima, foram liofilizadas juntas e a amostra, diluída em 1 mL de água, foi aplicada em coluna de filtração em gel Bio-Gel P-2. Desta forma, os autores obtiveram uma purificação de 21 vezes, considerando apenas a atividade de glucanase, pois a atividade de liticase não foi medida.

Em 1996, Parrado et al., purificaram e caracterizaram uma β -1,3-glucanase de *Oerskovia xanthineolytica* LL-G109. Esta enzima foi caracterizada como termoativa, entretanto contendo baixa atividade lítica e descrita posteriormente como do tipo II (β glII) por Ferrer et al. (1996a). Este microrganismo foi crescido em meio contendo glucana de levedura como indutor. O sobrenadante do meio de cultura foi concentrado cerca de 23 vezes por ultrafiltração. O concentrado foi aplicado em coluna cromatográfica aniônica HR 16/10 Q-Sepharose FF em duas etapas, sob condições similares, modificando apenas o tampão usado (na primeira coluna, foi equilibrada em pH 8,5 e na segunda no pH 5,0). Através deste método de purificação, os autores conseguiram obter a enzima totalmente pura.

A β -1,3-glucanase lítica de *Flavobacterium dormitator* var. *glucanolyticae* foi purificada a partir do sobrenadante do meio de cultura através de fracionamento com sulfato de amônia, coluna cromatográfica SE-Sephadex e coluna de filtração em gel BioGel P-150 (Nagasaki et al., 1976).

A β -1,3-glucanase (LPHase) de *Streptomyces matensis* DIC-108 foi parcialmente purificada usando-se coluna cromatográfica DEAE-Sephadex, CM-Sephadex e cromatografia de filtração em gel Sephadex G-100 (Nakabayashi et al., 1998).

5.3.2.3. Eletroforese de proteínas - SDS-PAGE

As frações dos quatro picos eluídos da cromatografia em coluna DEAE-Sepharose Fast Flow foram analisadas através de eletroforese SDS-PAGE como descrito no item 4.8.3. As frações dos Picos 1, 3 e 4 apresentaram baixa concentração de proteínas e somente as frações do Pico 2, contendo atividade de β -1,3-glucanase e liticase, foram utilizadas para os ensaios de determinação da seqüência de aminoácidos N-terminal.

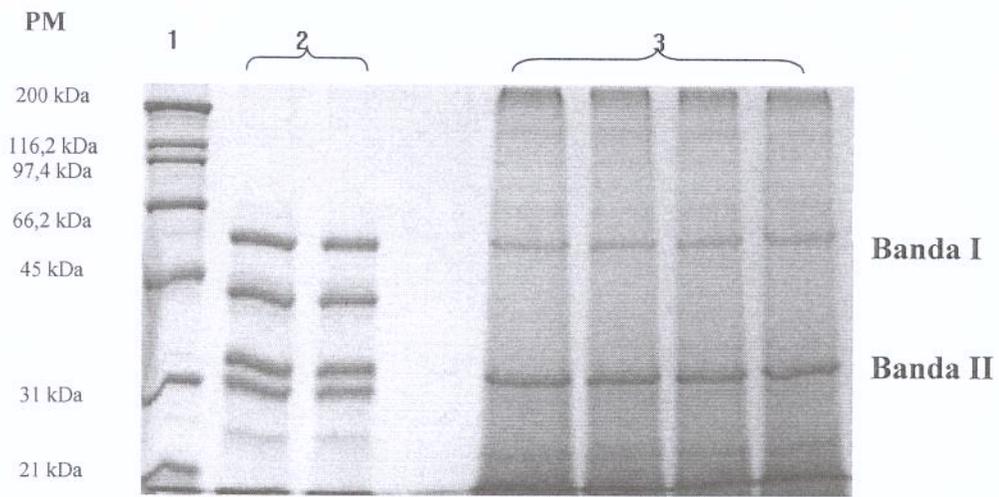


Figura 11 – Eletroforese de proteínas SDS-PAGE: 1- padrões de peso molecular (HMW); 2-Zymolyase 100T; 3- Pico 2 (β -1,3-glucanase lítica de *C. cartae* 191).

A Figura 11 ilustra que as frações do Pico 2 apresentaram duas bandas principais, uma na região de 57 kDa (Banda I) e a outra na região de 31 kDa (Banda II). A preparação comercial de Zymolyase 100 T (amostra 2) obtida de *Oerskovia xanthineolytica* (originariamente descrita como *Arthrobacter luteus* 73-14), apresentou quatro bandas principais sendo que a proteína de maior tamanho apresentou peso molecular similar a β -1,3-glucanase lítica de *Oerskovia xanthineolytica* descrita por Scott & Schekman (1980). Esses autores estimaram o peso molecular da β -1,3-glucanase lítica em 55kDa através da eletroforese SDS-PAGE.

A banda de peso molecular de aproximadamente 57 kDa da amostra de Zymolyase e as duas bandas do Pico 2 de peso molecular 57 kDa e 31 kDa foram selecionadas para o seqüenciamento da região N-terminal.

5.4. Análise da seqüência de aminoácidos N-terminal da β -1,3-glucanase

O seqüenciamento da região N-terminal da β -1,3-glucanase lítica de *C. cartae* 191 foi desenvolvido em seqüenciador de fase gasosa como descrito no item 4.9. Foram obtidos 5 resíduos de aminoácidos para a Banda I de Zymolyase e 12 resíduos para a Banda I do Pico 2 (β -1,3-glucanase lítica de *C. cartae* 191). As seqüências de aminoácidos obtidas foram:

Banda I Zymolyase: V P A T I.....

Banda I Pico 2: V P A T I P L T I T N D.....

Banda II Pico 2: não estava pura, contendo cerca de 3 espécies diferentes.

Shen et al. (1991), investigaram a seqüência do gene da β -1,3-glucanase lítica de *Oerskovia xanthineolytica*. O gene que codifica essa enzima foi clonado em células de *E. coli* DH5 α e a enzima recombinante expressa foi purificada. Os autores confirmaram a presença de uma única banda em gel de eletroforese de SDS-PAGE, contendo aproximadamente 57 kDa, a qual migrou na mesma posição da enzima madura presente na preparação comercial da Zymolyase 100T. Este valor, do peso molecular da enzima madura, foi consistente com o tamanho da seqüência de DNA predita. O gene da β -1,3-glucanase lítica de *Oerskovia xanthineolytica*, apresenta um quadro aberto de leitura (ORF) iniciando no nucleotídeo 463 e terminando no nucleotídeo 2106 da seqüência de DNA, predizendo assim uma proteína de 548 aminoácidos. Os autores também verificaram um possível sítio de clivagem do peptídeo sinal na posição entre Ala-36 e Val-37, codificando assim uma proteína madura de 512 aminoácidos. O fato de que a região N-terminal da proteína começa na posição 37, da seqüência de aminoácidos predita, foi confirmado pelo seqüenciamento

da enzima matura purificada do meio de cultura de *Oerskovia xanthineolytica*, a qual foi: V P A T I P L T I T N D S G R G P I Y L Y V L G E R D....., determinado através da degradação de Edman automatizada.

Ferrer et al. (1996a), descreveram a clonagem molecular do gene de β -1,3-glucanase do tipo II (β glIII) de *Oerskovia xanthineolytica* LLG109. Esta linhagem é considerada pelo autor como sinônimo subjetivo de *Cellulomonas cellulans*. Esta enzima foi purificada por Parrado et al.(1996) e seu peso molecular foi estimado em 31 kDa em gel de eletroforese de SDS-PAGE. Os autores seqüenciaram a região N-terminal desta proteína e compararam com a seqüência de aminoácidos da β -1,3-glucanase do tipo I de *Oerskovia xanthineolytica*. Estes mostraram que não há nenhuma similaridade significativa com nenhuma região da enzima do tipo I.

Os resíduos de aminoácidos obtidos neste trabalho, foram comparados em banco de dados. A região N-terminal da Banda I do Pico 2 se mostrou idêntica a da Zymolyase de *Arthrobacter luteus* e da enzima obtida por Shen et al. (1991); sugerindo espécies com grande similaridade. A Banda II do Pico 2, não estava totalmente pura e, desta forma, não pôde mostrar nenhuma correlação com outras β -1,3-glucanase descritas, inclusive com a β -1,3-glucanase termoativa de *Oerskovia xanthineolytica* descrita por Ferrer et al. (1996a), a qual possui peso molecular de 31 kDa.

5.5. Clonagem do gene da β -1,3-glucanase *Cellulomonas cartae* 191

5.5.1. Extração do DNA genômico de *Cellulomonas cartae* 191

O DNA bacteriano foi extraído para ser utilizado como molde na amplificação do gene através da reação de PCR como descrito no item 4.10.2. A Figura 12 mostra a integridade do DNA genômico extraído, em gel de agarose 1%. O DNA extraído apresentou a concentração de 420 μ g/mL.

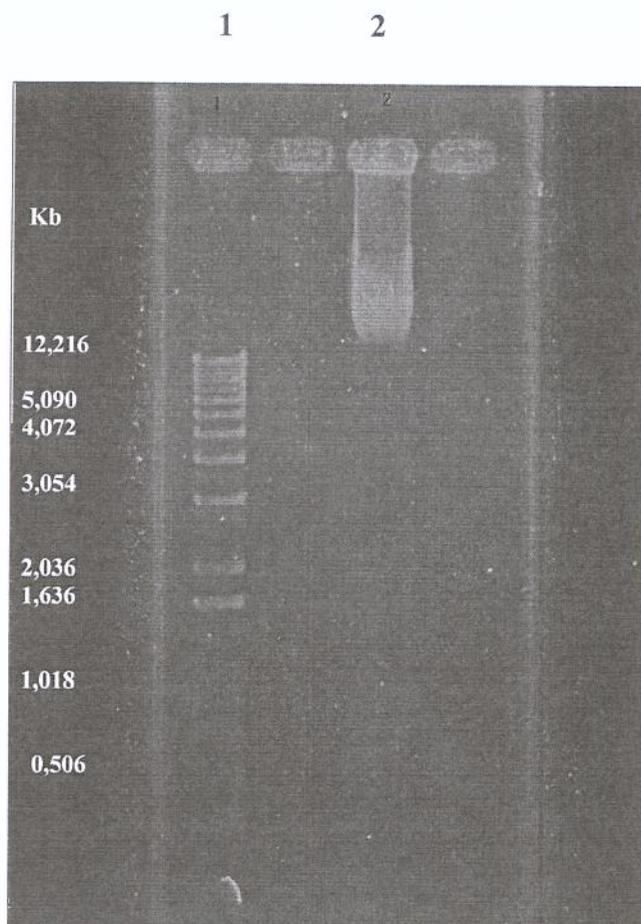


Figura 12 – DNA genômico de *C. cartae* 191 em gel de agarose de 1%. 1- Padrões de massa molecular; 2- DNA genômico.

5.5.2. Preparo do Clone A

Os resultados da reação de PCR mostraram que as condições ótimas de amplificação foram: 10 μL de solução de 10 pmol/ μL de cada *primer* degenerado (**G0** e **G5b**); 20 μL de solução 1 U/ μL de REDTaq DNA polimerase (SIGMA); 6 μL de solução de 10 mM de dNTPs; 20 μL de DMSO a 10%; 20 μL de solução 25 mM de MgCl_2 ; 10 μL solução 750 $\mu\text{g/mL}$ de DNA genômico; 20 μL de tampão TrisHCl 100 mM, pH 8,3 contendo KCl 500 mM, MgCl_2 11mM, 0,1% de gelatina e 84 μL de água deionizada. Processo: Desnaturação inicial de 90 segundos a 94°C seguido de 30 ciclos (5 segundos a 94°C (desnaturação); 60 segundos a 50°C (hibridação); 90 segundos a 75°C (elongamento)). Verificou-se apenas uma banda de DNA em gel de agarose 1% em torno de 1,5 Kb como era esperado para a região do gene que codifica para a proteína madura de cerca de 57 kDa. Os resultados estão mostrados na Figura abaixo.

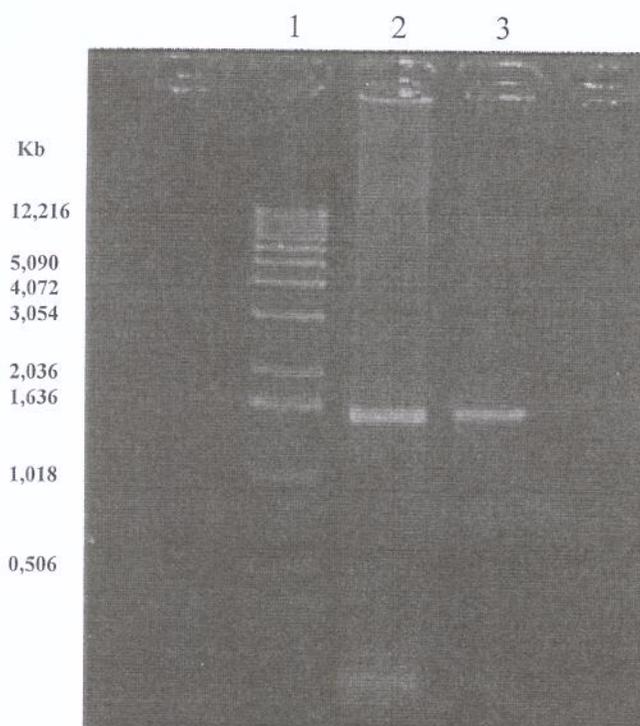


Figura 13 – Reação de PCR do Clone A em gel de agarose 1%: 1- Padrões de peso molecular (1Kb Ladder); 2- banda amplificada pela reação de PCR; 3- banda purificada através de QIAquick PCR Purification Kit.

O fragmento de DNA de 1,5 Kb purificado (faixa 3 da Figura 13) foi clivado com a enzima de restrição *Bam*HI e quantificado como descrito no item 4.10.4., bem como o vetor pBluescript. A Figura 14 mostra o gel de quantificação.

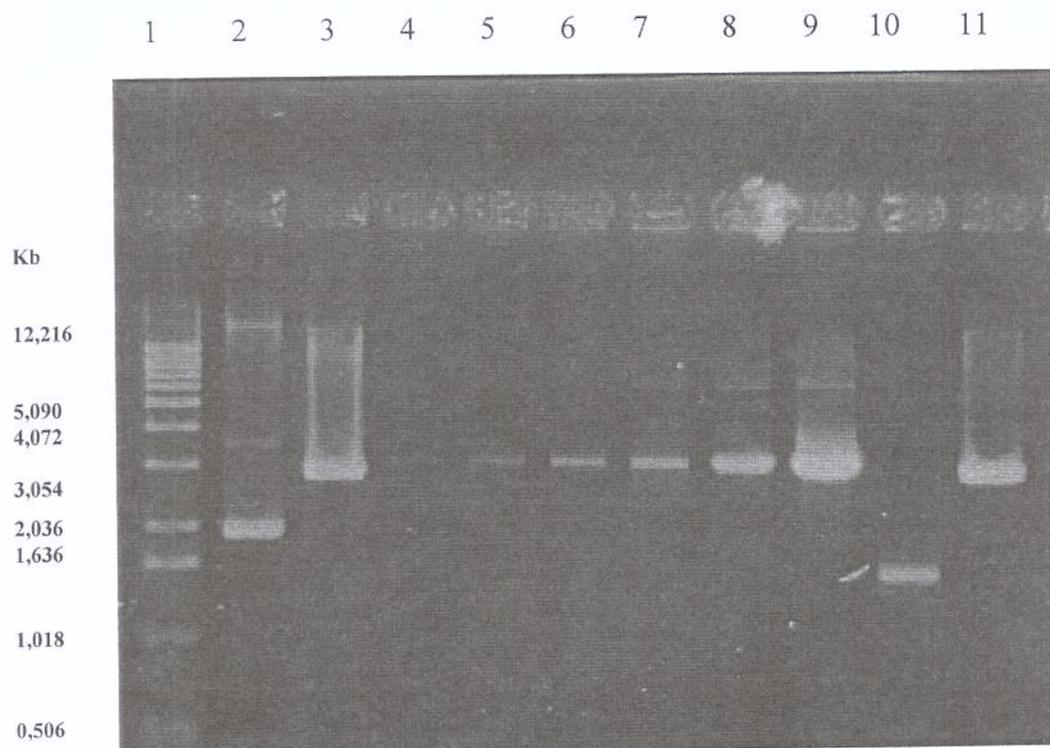


Figura 14 - Gel de quantificação do fragmento de 1,5 Kb e do pBluescript (agarose 1%): 1- Padrões de peso molecular (1Kb Ladder); 2- pBluescript intacto; 3- pBluescript clivado (controles); Padrões: 2,5 ng (4); 5,0 ng (5); 10 ng (6); 20 ng (7); 50 ng (8); 100 ng (9); 10- produto da reação de PCR clivado (fragmento de 1,5 Kb); 11- pBluescript clivado e defosfatado (vetor).

Obteve-se pBluescript na concentração de 34 ng/ μ l e o fragmento de DNA na concentração de 12 ng/ μ l. Para a reação de ligação, foram utilizados 38 ng (ou 20 fmol) do vetor pBluescript e 78 ng (ou 78 fmol) do produto da reação de PCR. A mistura foi incubada como descrito no item 4.10.4. O plasmídeo recombinante foi inserido em células competentes de *E. coli* DH5 α , usando-se o método de transformação descrito no item 4.11. Obtiveram-se 3 colônias na placa de meio SOB, onde duas colônias eram brancas translúcidas (W1 e W2) e uma azul (B1). Os plasmídeos recombinantes foram isolados das três colônias e clivados com a enzima *Bam*HI como descrito no ítem 4.11.1. A Figura 15 mostra o gel de agarose 1% para a seleção do plasmídeo recombinante contendo o fragmento de 1,5 Kb.

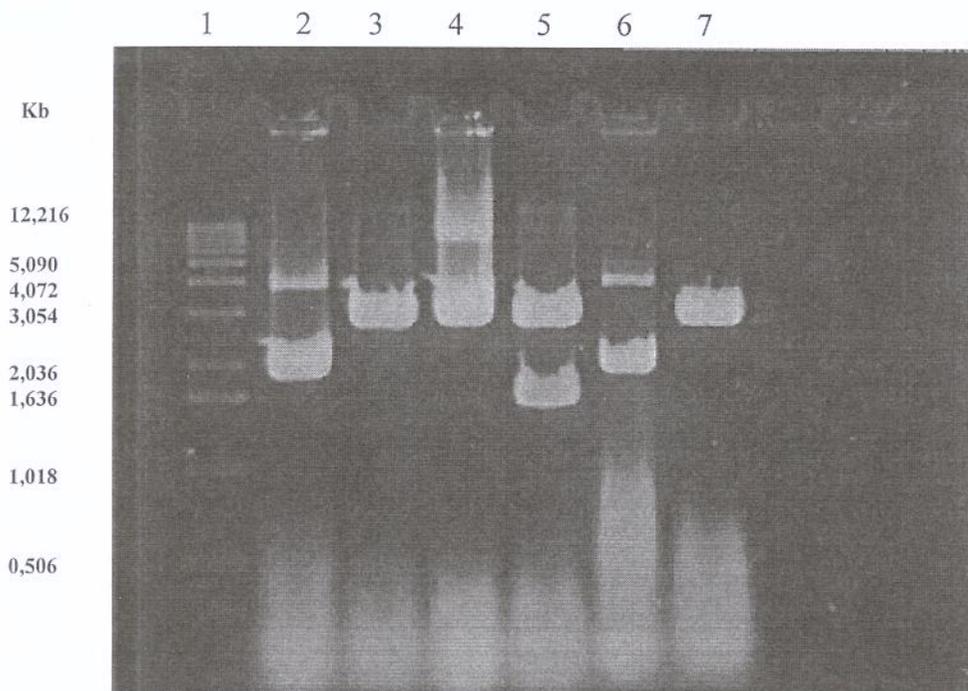


Figura 15 – Eletroforese em gel de 1% de agarose para seleção do Clone A: 1- Padrões de peso molecular (1Kb Ladder); 2- W1 intacto; 3- W1 clivado; 4- W2 intacto; 5- W2 clivado; 6- B1 intacto; 7- B1 clivado.

Como pode-se verificar pelos resultados obtidos no gel, a colônia azul (B1) não apresentou o inserto, como era esperado (baseada na seleção com IPTG/X-Gal). Pois esta apresentou o mesmo perfil do plasmídeo pBluescript intacto e clivado, ou seja, não possuía o inserto desejado. Uma das colônias brancas foi negativa também (a W1), entretanto, a W2 apresentou o perfil desejado, apresentando peso molecular maior do que o obtido para o pBluescript quando intacto e contendo o fragmento de cerca de 1,5 Kb quando clivado com a enzima de restrição *Bam*HI. Este clone positivo foi designado como **pGS1**.

Entretanto, dados da análise da seqüência nucleotídica do fragmento de DNA contendo parte do gene da β -1,3-glucanase de *C. cartae* 191 do plasmídeo pGS1, mostraram a presença de um codon terminador no meio do fragmento durante o seqüenciamento (vide item 5.7.). Para tanto, foi necessário fazer a seleção de outro clone positivo.

A partir da mesma mistura, reação de ligação, obtida para o clone pGS1, a qual havia sido mantida em freezer, foi possível fazer uma nova transformação. O plasmídeo recombinante foi inserido em células competentes de *E. coli* DH5 α e os transformantes foram selecionados como descrito no item 4.11.1. Obtiveram-se 18 colônias brancas translúcidas na placa contendo meio SOB. Resultados da seleção mostraram que apenas um clone foi positivo entre os dezoito analisados, o qual foi o proveniente da colônia nº 7. Esse plasmídeo recombinante selecionado, foi designado como clone **pGS7**. O plasmídeo pGS7 foi preparado em maior quantidade onde se obteve 250 μ l, diluído em tampão TE, na concentração de 5,32 μ g de DNA/ μ l.

5.5.3. Preparo do Clone B

O clone B constituiu a segunda etapa de clonagem do gene da β -1,3-glucanase de *C. cartae* 191 e foi desenvolvido como descrito no item 4.10.4. Os resultados da reação de PCR mostraram que as condições ótimas de amplificação foram: 10 μ L de solução de 10 pmol/ μ L de cada *primer* (**4aF e 4aR**); 10 μ L de solução 1 U/ μ L de REDTaq DNA polimerase (SIGMA); 6 μ L de solução de 10 mM de dNTPs; 20 μ L de DMSO a 10%; 14 μ L de solução 25 mM de $MgCl_2$; 4 μ L solução 750 μ g/mL de DNA genômico; 20 μ L de tampão TrisHCl 100 mM, pH 8,3 contendo KCl 500 mM, $MgCl_2$ 11mM, 0,1% de gelatina e 106 μ L de água deionizada. Processo: Desnaturação inicial de 120 segundos a 94°C seguido de 30 ciclos (15 segundos a 94°C (desnaturação); 30 segundos a 60°C (hibridação); 70 segundos a 72°C (elongamento)). A Figura 16 mostra o resultado obtido da reação de PCR.

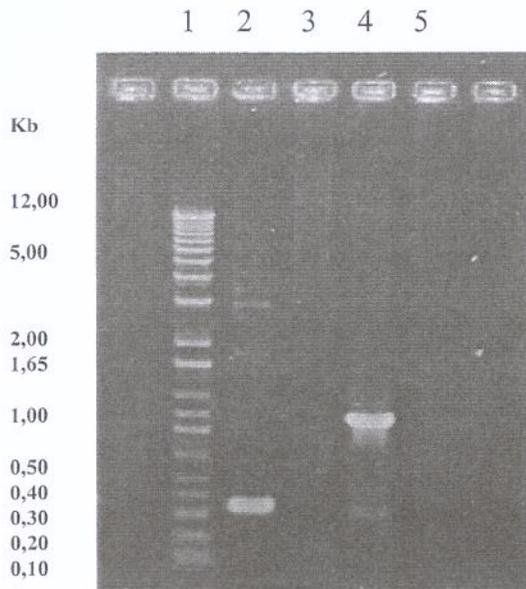


Figura 16 – Reação de PCR do Clone B em gel de agarose 1%. 1- Padrões de peso molecular (1Kb Plus Ladder); 2- controle com o *primer* 4aF apenas (=mistura de reação de PCR contendo todas as soluções exceto o *primer* 4aR); 3- controle com o *primer* 4aR apenas; 4- Teste (=banda amplificada pela reação de PCR usando os dois *primers*), 5- controle sem molde de DNA genômico.

Resultados da reação de PCR mostraram a presença de duas bandas de DNA em gel de agarose 1% (Coluna 4, Figura 16). A primeira em torno de 1,0 Kb como era esperado, e outra com cerca de 0,35 Kb. A segunda banda provavelmente ocorreu devido a formação de dímero entre o *primer* sense (4aF), pois o controle que não continha o *primer* 4aR (Coluna 2), apresentou a mesma banda a 0,35 Kb.

O fragmento de DNA de 1,0 Kb foi isolado, purificado e submetido a clivagem com enzima de restrição *Xho*I e *Sma*I. Como citado anteriormente no item 4.10.3, o oligonucleotídeo *primer* antisense (4aR) foi baseado na seqüência interna do Clone A após ter sido seqüenciado, na região após o sítio de reconhecimento da enzima de restrição *Xho*I. Isso possibilitou a clivagem do fragmento com a enzima *Xho*I. O oligonucleotídeo *primer* sense (4aF) foi baseado na seqüência acima do ATG do gene da β -1,3-glucanase de *Oerskovia xanthineolytica*, onde os dados de literatura mostram um sítio de reconhecimento para *Sma*I logo após esse *primer* escolhido. Isso possibilitaria a clivagem do fragmento obtido da reação de PCR de 1,0 Kb.

O fragmento de DNA de 1,0 Kb foi clivado rendendo um fragmento de cerca de 0,8 Kb, bem como o plasmídeo pBluescript foi clivado com as enzimas de restrição *Xho*I e *Sma*I como descrito no item 4.10.4. Obteve-se o vetor pBluescript na concentração de 11 ng/ μ l e o fragmento de DNA na concentração de 41 ng/ μ l. Para a reação de ligação, foram utilizados 38 ng (ou 20 fmol) do vetor pBluescript e 61 ng (ou 93 fmol) do produto da reação de PCR. A mistura foi incubada como descrito no item 4.10.4. O plasmídeo recombinante foi inserido em células competentes de *E. coli* DH5 α , usando-se o método de transformação descrito no item 4.11. Obtiveram-se 8 colônias na placa contendo meio SOB, onde 7 colônias eram brancas translúcidas e uma azul (controle negativo). Os plasmídeos recombinantes foram isolados das oito colônias e clivados com a enzima *Xho*I como descrito no item 4.11.1. A clivagem dos plasmídeos recombinantes com a enzima de restrição *Sma*I, entretanto não foi possível, o que foi posteriormente explicado no item 5.7 (ver seqüenciamento) pois não havia a presença do sítio de reconhecimento para essa

enzima no fragmento do gene da β -1,3-glucanase de *Cellulomonas cartae*. Resultados mostraram que apenas dois clones foram positivos, os provenientes da colônia n° 1 e n° 5. A Figura 17 ilustra o gel de agarose 1% para a seleção do plasmídeo obtido da colônia n° 1 contendo o inserto de cerca de 0,8 Kb.

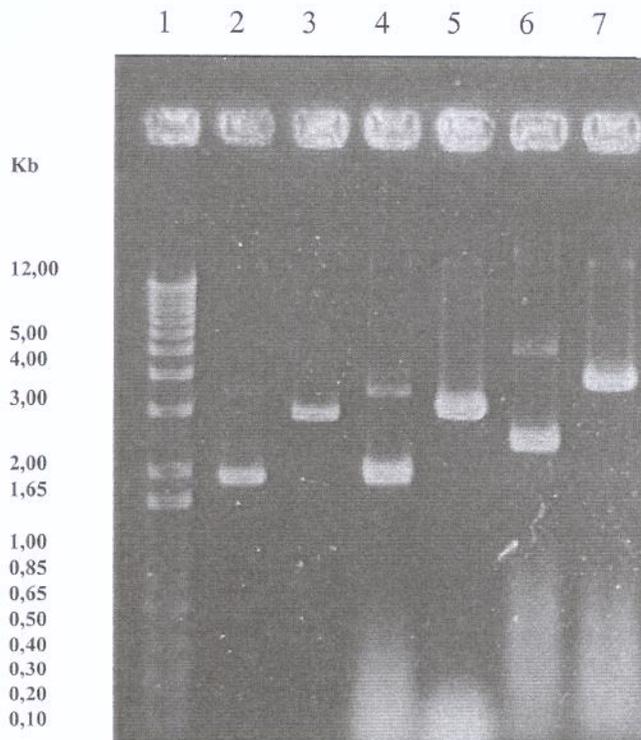


Figura 17 – Eletroforese em gel de 1% de agarose para seleção do Clone B: 1- Padrões de peso molecular (1Kb Plus Ladder); 2- pBluescript intacto; 3- pBluescript clivado (controles); 4- colônia azul intacta; 5- colônia azul clivada (controles); 6- colônia n° 1 intacta; 7- colônia n° 1 clivada.

Na Figura 17, podemos notar que o vetor, plasmídeo pBluescript, quando clivado com a enzima de restrição, apresenta PM de cerca de 3Kb. Portanto, esperávamos que o plasmídeo recombinante (coluna 7), quando clivado, tivesse PM de cerca de 3,8Kb (3Kb+0,8Kb do fragmento inserido), o que foi realmente confirmado pelo resultado obtido para a colônia n° 1. Também podemos observar por essa figura, na coluna 4 e 5, que a colônia azul (controle negativo) confirmou o mesmo perfil eletroforético do pBluescript. A colônia n° 1 foi a escolhida e o clone designado de **pGSB**. O plasmídeo pGSB foi preparado em maior quantidade para análises posteriores, onde se obteve 250 µl, diluído em tampão TE, na concentração de 6,51 µg de DNA/µl.

5.6. Mapa de restrição do inserto – Clone A

O mapa de restrição do inserto foi desenvolvido de acordo com o item 4.12. A Figura 18 mostra o perfil eletroforético obtido em gel de agarose 1%.

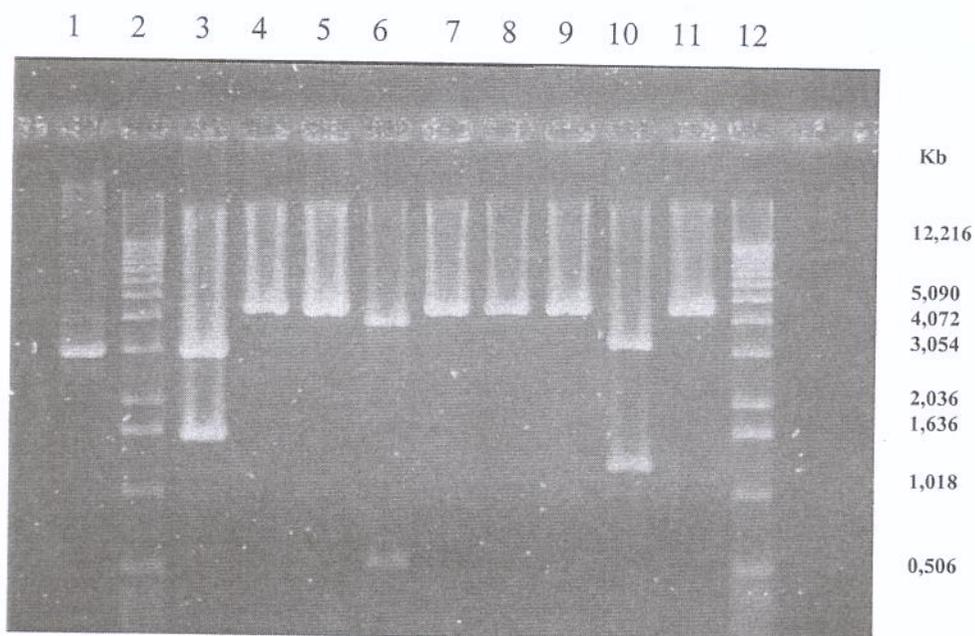


Figura 18- Mapa de restrição do inserto (Gel de agarose 1%): 1- pGS7 intacto; 2 e 12- Padrões de peso molecular (1Kb Ladder); 3- pGS7 clivado com *Bam*HI; 4- pGS7 clivado com *Xba*I; 5- pGS7 clivado com *Hind*III; 6- pGS7 clivado com *Xho*I; 7- pGS7 clivado com outra enzima; 8- pGS7 clivado com outra enzima; 9- pGS7 clivado com outra enzima; 10- pGS7 clivado com outra enzima; 11- pGS7 clivado com outra enzima.

clivado com *KpnI*; 8- pGS7 clivado com *SalI*; 9- pGS7 clivado com *EcoRI*; 10- pGS7 clivado com *PstI*; 11- pGS7 clivado com *SacI*.

Pela Figura 18, é possível notar que o plasmídeo recombinante pGS7 quando clivado com a enzima *XhoI*, apresentou um fragmento de cerca de 0,5 Kb e um fragmento de cerca de 1,2 Kb quando clivado pela enzima *PstI*. Resultados mostraram que para as enzimas de restrição testadas, o fragmento do gene de 1,5 Kb apresentou apenas dois sítios de clivagem internos, *XhoI* e *PstI*, além de ser clivado com a enzima de restrição *BamHI* (sítios inseridos). Essa conclusão está de acordo com os dados da literatura, pois coincidem com o mapa obtido da seqüência primária do gene da β -1,3-glucanase de *Oerskovia xanthineolytica* descrita por Shen et al. (1991), a qual é uma bactéria intimamente relacionada com *Cellulomonas cartae*. O esquema obtido do mapa do fragmento de DNA está ilustrado na Figura 19.

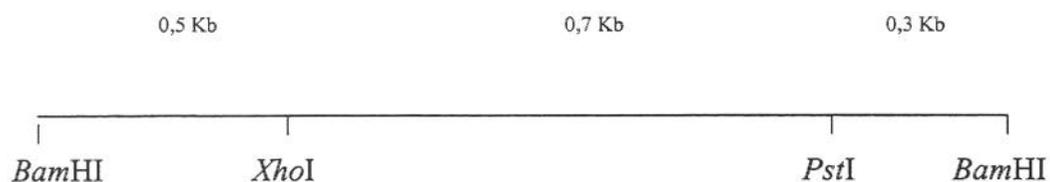


Figura 19 – Esquema dos sítios de clivagens internas do inserto de 1,5 Kb.

Esse esquema foi confirmado pelos dados obtidos do seqüenciamento do clone pGS7 (vide item 5.7). A partir do mapa de clivagem do clone, foram feitos os subclones, de acordo com o procedimento desenvolvido para o preparo dos clones (descrito no item 4.10.4.), baseando-se nos sítios internos do fragmento de DNA de 1,5 Kb. Os subclones foram desenvolvidos para possibilitar o seqüenciamento do gene.

Os subclones obtidos foram:

- pGSX1 (pBluescript contendo o fragmento de *XhoI* a *BamHI*, com cerca de 1 Kb)
- pGSX2 (pBluescript contendo o fragmento de *BamHI* a *XhoI* com cerca de 0,5 Kb)
- pGSP8 (pBluescript contendo o fragmento de *PstI* a *BamHI* com cerca de 0,3 Kb)
- pGSP9 (pBluescript contendo o fragmento de *BamHI* a *PstI* com cerca de 1,2 Kb)

5.7. Seqüenciamento do gene da β -1,3-glucanase lítica

O clone pGS1 e os seus subclones foram seqüenciados em Seqüenciador ABI PRISM Model 377 e a análise do DNA do gene foi feita em Banco de dados (NCBI website - National Center for Biotechnology Information), comparando-se com a seqüência da β -1,3-glucanase lítica de *Oerskovia xanthineolytica* como descrito no item 4.13. Resultados da seqüência inicial, demonstraram alta identidade (>85%) em relação a seqüência do gene de β -1,3-glucanase lítica de *Oerskovia xanthineolytica* obtido por Shen et al. em 1991 (GenBank M38734).

Entretanto, resultados do clone pGS1 mostraram a presença de um codon terminador (stop codon) dentro do quadro aberto de leitura (ORF) do gene na posição 948. Este codon terminador, devido a deleção de um nucleotídeo guanina (G) na posição 948, foi provavelmente causado por um erro da enzima polimerase durante a reação de PCR. O novo clone selecionado no item 5.5.2., o plasmídeo pGS7 e seus subclones foram seqüenciados como descrito no item 4.13.

Este clone foi totalmente seqüenciado, em ambas as direções (5'→3') e (3'→5'). A Figura 20 mostra a seqüência completa do clone pGS7, o qual contém o fragmento de DNA do gene de β -1,3-glucanase lítica de *Cellulomonas cartae* 191 que codifica a proteína madura, comparando-se com a seqüência nucleotídica do gene de β -1,3-glucanase lítica de *O. xanthineolytica* (GenBank M38734).

O.x.	GGATCCCAGACACCGGGGCGTCGGTGGTGCCGGTGACACCATCTTCGCCTTGTTCGGGA	60
O.x.	ACGCGGACTCGGCGGACTCGACAGTGGGCAGCCAGGTGAGGTCCGGCGGAGCGGGGTGA	120
O.x.	GGAGCTCGGCGCAGTGTCTCTGCTTGCCGGTGACCTGCGCGGGGTACGCGAGGTTCGAGGA	180
O.x.	GGGTGCACGACCGGCACCGGCCGGCGTCTAGTGGTGGCACTGCACTCGTTCGAGTCTAC	240
O.x.	GGGCGACCGGCTGCCTCCCGGGCCGCGCACGGAGGGAGGGCCGCGGCGTTCGATCCATGG	300
O.x.	CCCCCAGCACGCCACCAGGACCGAGGGAGCGCTCCCTGGCGTCGCGGGCCGCTGTCCG	360
O.x.	TTACGGTCTGTGGCAGCGCTTCCACACCTCTGTGGCAACGCTGTGCGCGGAACGGTCCGG	420
O.x.	CGACCGGTTTCGACGGAGCAACCGAACAGGAGCAGATCCCGTATGCCTCACGACAGGAAG	480
O.x.	AACAGCAGCAGACGAGCGTGGGCCGCGTGTGCGCGCGGTCTCGCGGTGAGCGGGGCG	540
O.x. 191	CTGGTTCGGCGTGGCGGCGCCCGGAGCGCAGTCCCGCGACCATCCCGCTGACGATCACC GTCCCGGCGACCATCCCACTCACGATCACC	600
O.x. 191	AACGACTCGGGCAGGGGGCCGATCTACCTGTACGTCTTCGGCGAGCGCGACGGCGTCGCC AACGACTCGGGCAAGGGGCCGATCTACCTGTACGTCTTCGGCGAGCGCGACGGCGTCGCC	660
O.x. 191	GGCTGGGCGGACGCGGGCGGCACGTTCCACCCGTGGCCCGCGGGGTTCGGGCCCGTGCCC GGCTGGGCCGACGCGGGCGGCACGTTCCACCCGTGGCCCGCGGGGTGGGGCCCGTGCCC	720
O.x. 191	GTCCCGGCACCCGACGCGTCCATCGCGGGCCCGGCCCGCCAGTCCGTGACGATCCGA GTCCCGGCGCCGACGCGTTCGATCGCGGGCCCGGCCCGCCAGTCCGTGACGATCCGG	780
O.x. 191	CTCCCGAAGCTGTCCGGGCGCGTCTACTACTCGTACGGCCAGAAGATGACGTTCCAGATC CTCCCGAAGCTGTCCGGGCGCGTCTACTACTCGTACGGCCAGAAGATGACGTTCCAGATC	840
O.x. 191	GTGCTCGACGGGCGGCTCGTCCAGCCCGCGTCCAGAACGACTCCGACCCCAACCGGAAC GTGCTCGACGGGCGGCTCGTCCAGCCCGCGTCCAGAACGACTCCGACCCCAACCGGAAC	900
O.x. 191	ATCCTCTTCAACTGGACCGAGTACACGCTCAACGACGGCGGCTGTGGATCAACAGCACG ATCCTCTTCAACTGGACCGAGTACACGCTCAACGACGGCGGCTGTGGATCAACAGCACG ↑	960
O.x. 191	GACCCAGGTGACTGGTCCGCGCGTACCAGGTGGGCGTCCAGCGCGCCGACGGGCAGGTC CAGGTGGACCACTGGTCCGCGCGTACCAGGTGGGCGTCCAGCGCGCCGACGGGCAGGTC	1020
O.x. 191	CTCAGCACGGGCATGCTCAAGCCGAACGGCTACGAGGCGTTCTACACGGCCCTCGAGGGC CTCAGCACGGGCATGCTCAGCCGAACGGCTACGAGGCGTTCTACAAGGCCCTCGAGAGC Xho I	1080
O.x. 191	GCGGGTGGGGCGGCTCGTGCAGCGCGCCCGACGGGAGCCGCTGCGCGCGCTCAAC GCGGGTGGGGCGGCTCGTGCAGCGCGCCCGACGGGAGCCGCTGCGCGCGCTCAAC	1140
O.x. 191	CCGTGCGACGGGATCGACGTCGGGAAGATCTCGTCGGCCTCGATCGACTCCTACGTCAAC CCGTGCGCGGGATCGACGTCGGCAAGATCTCCTCGGCGTTCGATCGACTCGTACGTCAAC	1200
O.x. 191	GAGGTGTGGAACCTGATCCGCACGCGGACATGGTCTGTCACGCCGTTCTCCACGAGCCC GAGGTGTGGAACCTGATCCGCACGCGGACATGGTCTGTCACGCCATTCTCCACGAGCCC	1260

O.x. 191	GGCACGCAGTTCCGCGGCCGGTTCGACGGCGACTGGTTCCGCTTCAGGAGCGGGTCCGGG GGCACGCAGTTCCGCGGCCGGTTCGACGGCGACTGGTTCCGCTTCAGGAACGCGTCCGGG	1320
O.x. 191	CAGGAGGTCGCGCGTTCAAGAAGCCCGACGCGTCGAGCGTGTACGGGTGCCACAAGGAC CAGGGGGTCGCGCGCTTCACGAAGCCCGACGCGTCGAGCGTGTACGGGTGCCACAAGGAC	1380
O.x. 191	CTCCAGGCGCCCAACGACCACGTCGTCGGGCCGATCGCCCGCACCCCTGTGCGCCGCGCTC CTCCAGGCGCCCAACGACCACGTCGTCGGGCCGATCGCCCGCACCCCTGTGCGCCGCGCTC	1440
O.x. 191	GTCCGCACCACGGCGCTGACCAACCCGAACCAGCCGGACGCGAACAGCGCCGGCTTCTAC ATCCGCACCACGGCGCTGACGAACCCGAACCAGCCGGACGCGAGCGACGCCGGCTTCTAC	1500
O.x. 191	CAGGACGCGCGCACCAACGTCTACGCGAAGCTCGCGCACCCAGCAGATGGCGAACGGCAAG CAGGACGCGCGCACCAACGTCTACGCGAAGCTCGCGCACCCAGCAGATGGCGAACGGCAAG	1560
O.x. 191	GCGTACGCGTTCGCGTTCGACGACGTCGGCGCGCACGAGTCGCTCGTCCACGACGGCAAC GCGTACGCTTCGCGTTCGACGACGTCGGCGCGCACGAGTCGCTCGTCCACGACGGCAAT	1620
O.x. 191	CCCCAGGCCGCGTACATCAAGCTCGACCCGTTACCCGGCACGGCCACGCCCTCGGG --- CCCCAGGCCGCTTCATCAAGCTGGACCCGTTACGGGCGCCGACGCCCTCGGCGAC	1680
O.x. 191	AACGGCGGCAGCACCGAGCAGCCGGGCACCCCGCGGTCTGCCCGCCGGACGGGCGCG AACGGTGGCGGCACCGAGCAGCCGAACCCCGGGCGGCGCTGCCGACCGGCACCGGGACG	1740
O.x. 191	CTCCGCATCGGGAGCACGCTGTGCCTCGACGTCCCGTGGGCCGACCCGACCGACCCAAC ATCCGCGCCGGCGCCGCGCTGTGCCTCGACGTCCCGTGGGCCGACCCGACCGACGCCAAC	1800
O.x. 191	CAGGTCCAGCTCGCCACCTGCAGCGCAACCGCGCAGCAGTGGACGCGCGCACCGAC CAGGTCCAGCTCGCGAACTGCAGCGGCAACCGCGCAGCAGTGGACGCGCGGGTCCGAC Pst I	1860
O.x. 191	GGGACGGTGCAGCCCTCGGCAAGTGTCTCGACGTCGCGCGCAGCGGACGGCCGACGGC GGGACCGTGCAGCGCTGGGCAAGTGCCTCGACGTCGCCCGCAGCGGACCGCGGACGGC	1920
O.x. 191	ACCGCCGTGTGGATCTACACGTGCAACGGGACGGGCGCGCAGAAGTGGACGTACGACTCC ACCGTCTGTGGATCTACACGTGCAACGGCAGGGCGCCAGCAGTGGGTCTACGACGCC	1980
O.x. 191	GCGACCAAGGCCCTGCGCAACCCGAGTCCGGCAAGTGCCTCGACGCCAGGGCGGGCGCA GGCACCCAGGCCCTGCGCAACCCGAGTCCGGCAAGTGCCTCGACGCCAGGGCGGGGCG	2040
O.x. 191	CCGCTGCGTGACGGCCAGAAGGTCCAGTCTGGACCTGCAACCAGACCGAGGCCAGCGC CCGCTCCACGACGGCCAGAAGGTCCAGTCTGGACCTGTAACCAGACCGAAGCCCAACGC	2100
O.x. 191	TGGACGCTCTGA TGGACCTTCTAGGATCC	2160

Figura 20- Sequência nucleotídica do clone pGS7: Comparação entre as sequências de nucleotídeos de *Oerskovia xanthineolytica* (O.x.) e *Cellulomonas cartae*

191 (191). As caixas mostram os sítios de restrição *Xho*I e *Pst*I dentro do fragmento. A seta indica o nucleotídeo guanina na posição 948 mostrando a ausência do codon terminador no clone pGS7.

Os resultados mostraram que o clone pGS7 não apresentou nenhum codon terminador no meio do fragmento na posição 948 na Figura 20. Através do seqüenciamento, verificamos que o fragmento, contendo cerca de 1,5 Kb em gel de agarose 1%, é constituído de 1,548 Kb. Verificou-se a presença de uma trinca de nucleotídeos a mais do que na seqüência de DNA do gene da β -1,3-glucanase lítica de *Oerskovia xanthineolytica*, na posição 1678 a 1680. A Figura 21 ilustra o plasmídeo recombinante pGS7.

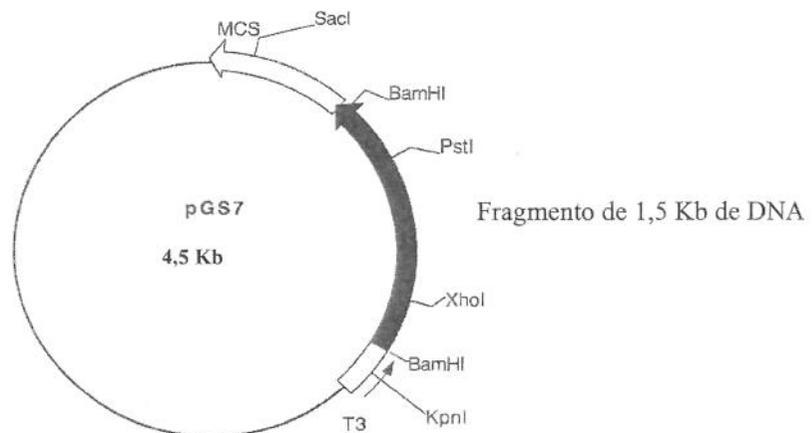


Figura 21 – Ilustração do plasmídeo recombinante pGS7: plasmídeo pBluescript contendo o fragmento de 1,5 Kb de DNA do gene da β -1,3-glucanase lítica de *Cellulomonas cartae* 191 correspondente a região que codifica a proteína madura. O fragmento se encontra inserido no sítio múltiplo de clonagem do pBluescript (MCS) flanqueado pelos sítios de reconhecimento para a enzima de restrição *Bam*HI (região escura).

O clone pGSB foi seqüenciado em Seqüenciador ABI PRISM Model 377 em ambos os sentidos como descrito no item 4.13. Os resultados do seqüenciamento mostraram que o fragmento (inserto) de 0,84 Kb estava na orientação inversa de transcrição do *LacZ* dentro do vetor pBluescript (verificado pelo sentido contrário obtido dos *primers* de seqüenciamento padrão T7 e T3), como esperado devido a posição dos sítios de restrição *SmaI* e *XhoI* no MCS do pBluescript. Onde o sítio de restrição para *SmaI* é posterior ao sítio de restrição de *XhoI*. Entretanto, verificou-se que o fragmento inserido, obtido da reação de PCR, não continha o sítio de reconhecimento para a enzima de restrição *SmaI*. Mas o fragmento pôde ser inserido possivelmente pela presença de terminais abruptos no vetor, causados pela clivagem com a enzima *SmaI*. A Figura 23 mostra que o início do fragmento do gene é o *primer* 4aF. O fragmento do Clone B, consiste da região antes do ATG, início da ORF até o sítio de reconhecimento para a enzima *XhoI*. Como ilustrado na Figura 2, existe uma região de sobreposição entre o fragmento inserido em pGS7 e pGSB, o qual contém cerca de 500 pb (pares de bases) e se encontra entre o início da proteína madura até a região de reconhecimento para a enzima de restrição *XhoI* dentro do fragmento. A Figura 22, ilustra o plasmídeo recombinante pGSB.

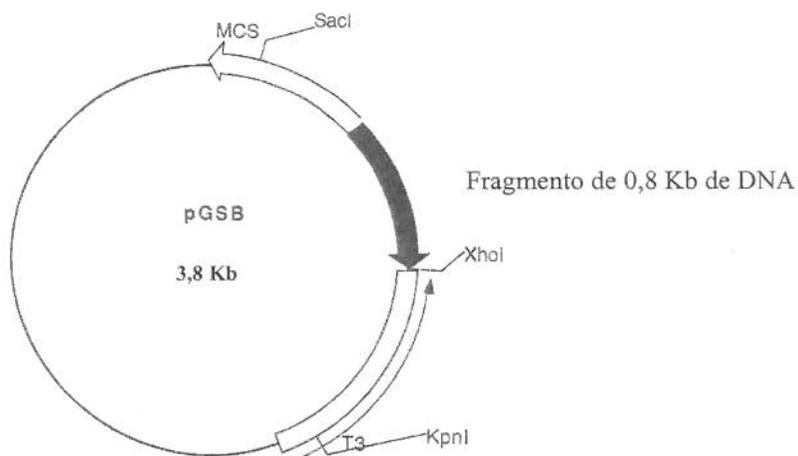


Figura 22 – Ilustração do plasmídeo recombinante pGSB: plasmídeo pBluescript contendo o fragmento de 0,84 Kb de DNA do gene da β -1,3-glucanase lítica de

Cellulomonas cartae 191 contendo a região antes do ATG e início da ORF. O fragmento se encontra inserido no sítio múltiplo de clonagem do pBluescript (MCS) flanqueado pelo primer 4aF e pelo sítio de reconhecimento para a enzima de restrição *Xho*I (região escura).

Foram usados os iniciadores *primers* descritos na Tabela 3 do item 4.13. para completar o seqüenciamento total do gene de β -1,3-glucanase lítica de *Cellulomonas cartae* 191. O gene da β -1,3-glucanase lítica de *Cellulomonas cartae* 191 foi isolado com sucesso e completamente seqüenciado, em ambas as direções. A Figura 23 mostra a seqüência de nucleotídeos e de aminoácidos deduzidos do gene bem como os sítios de reconhecimento para as enzimas de restrição e a posição dos *primers* usados na amplificação do gene.

Primer 4aF
 →
 GCCGGCGTCGTAGTGGTGGCACTGCACTCGTTCGAGTCTAGGTGCCGGGCGGGCACGGGTGCGGTGGGGGCC 72
 GTGCGCCGACGTCGTGGGAGCGCTCCCTGGCGCGTCGGCGTGCCGTCCGCTACGGTCTGGCAGCGCTCCCA 144
 CACCTCGTGCGGCAGTGCCGTCGCCGGGCCGTCCGGCGAGTGCGGTTTCGACGGAGCAACCGAACAGGAGC 216
 ↓
 AGACCTGGCATGAGTCTCGACAGGCGGAGAAGAAGCAGACGAGCGTGGGCCGCCCTGTGCGCGGCGGTCCCTC 288
 M S L D R R R R S R R A W A A L C A A V L
 Primer G0
 GCGGTGAGCGGGGCGGTTCGTGGTGGCGCGGCCCGCGAGCGCGGTCCCGGCGACCATCCCACTCACGATC 360
 A V S G A V V G A A A P A S A V P A T I P L T I
 ACCAACGACTCGGGCAAGGGGCCGATCTACCTGTACGTCCTCGGGGAGCGGACGGCGTCCGCCGGCTGGGCC 432
 T N D S G K G P I Y L Y V L G E R D G V A G W A
 GACGCGGGCGGCACGTTCCACCCGTGGCCCGGGCGGGTGGGGCCCGTGCCTCCCGGCGCCCGACGCGTCG 504
 D A G G T F H P W P G G V G P V P V P A P D A S
 ATCGCGGGCCCCGGCCCCGGCCAGTCCGTGACGATCCGGCTCCCGAAGCTGTCCGGGCGCGTCTACTACTCG 576
 I A G P G P G Q S V T I R L P K L S G R V Y Y S
 TACGGCCAGAAGATGACGTTCCAGATCGTGCTCGACGGGCGGCTCGTCCAGCCCGGGTCCAGAACGACTCC 648
 Y G Q K M T F Q I V L D G R L V Q P A V Q N D S
 GACCCCAACCGGAACATCCTCTTCAACTGGACCGAGTACACGCTCAACGACGGCGGGCTGTGGATCAACAGC 720
 D P N R N I L F N W T E Y T L N D G G L W I N S
 ACGCAGGTGGACCACTGGTCCGCGCCGTACCAGGTGGGCGTCCAGCGCGCCGACGGGCGAGTCCCTCAGCACG 792
 T Q V D H W S A P Y Q V G V Q R A D G Q V L S T
 XhoI
 GGCATGCTCACGCCGAACGGCTACGAGGCGTCTACAAGGCCCTCGAGAGCGCGGGGTGGGGCGGCCTCGTG 864
 G M L T P N G Y E A F Y K A L E S A G W G G L V
 CAGCGCGCCCCGACGGGAGCCGTCTGCGCGCGCTCAACCCGTGCGCGGGATCGACGTCGGCAAGATCTCC 936
 Q R A P D G S R L R A L N P S R G I D V G K I S
 Primer 4aR
 ←
 TCGGCGTCGATCGACTCGTACGTCACCGAGGTGTGGAACCTCTACCGCACGCGGACATGGTCTCAGCCA 1008
 S A S I D S Y V T E V W N S Y R T R D M V V T P
 TTCTCCACGAGCCCGCACGCAGTTCGCGGCCGGTTCGACGGCGACTGGTTCGCTTCAGGAACGCGTCC 1080
 F S H E P G T Q F R G R V D G D W F R F R N A S

GGGCAGGGGGTTCGCGCCTTCACGAAGCCCGACGCGTTCGAGCGTGTACGGGTGCCACAAGGACCTCCAGGCG	1152
G Q G V A A F T K P D A S S V Y G C H K D L Q A	
CCCAACGACCACGTCGTCGGGCCGATCGCCCGCACCTGTGCGCGGCGCTCATCCGCACCACGGCGCTGACG	1224
P N D H V V G P I A R T L C A A L I R T T A L T	
AACCCGAACCAGCCCGACGCGAGCGACGCCGGCTTCTACCAGGACGCGCGCACCAACGTCTACGCCAAGCTC	1296
N P N Q P D A S D A G F Y Q D A R T N V Y A K L	
GCGCACCAGCAGATGGCGAACGGCAAGGCGTACGCTTCGCGTTCGACGACGTCGGCGCGCACGAGTCGCTC	1368
A H Q Q M A N G K A Y A F A F D D V G A H E S L	
GTCCACGACGGCAATCCCCAGGCCCGCTTCATCAAGCTGGACCCGTTACGGGGCGCCGACGCCCGTCGGC	1440
V H D G N P Q A A F I K L D P F T G A A T P V G	
GACAAACGGTGGCGCACCGAGCAGCCGAACCCCGCGGCGCCTGCCGACCGGCACCGGGACGATCCGCGCC	1512
D N G G G T E Q P N P G G G L P T G T G T I R A	
GGCGCCGCGCTGTGCCTCGACGTGCCGTGGGCCGACCCGACCGCAACCAGTCCAGCTCGCGAACTGC	1584
G A A L C L D V P W A D P T D A N Q V Q L A N C	
AGCGGCAACGCGGCGCAGCAGTGGACGCGCGGGTCCGACGGGACCGTGC GCGCGCTGGGCAAGTGCCTCGAC	1656
S G N A A Q Q W T R G S D G T V R A L G K C L D	
GTGCCCCGACGCGGGACCGCGGACCGCACCGTTCGTCGTGGATCTACACGTGCAACGGCACGGGCGCCAGCAG	1728
V A R S G T A D G T V V W I Y T C N G T G A Q Q	
TGGGTCTACGACCGCGCACCCAGGCCCTGCGCAACCCGACGTCGGCAAGTGCCTCGACGCCAGGGCGGG	1800
W V Y D A G T Q A L R N P Q S G K C L D A Q G G	
GCGCCGCTCCACGACGGCCAGAAGGTCCAGCTCTGGACCTGTAACCAGACCGAAGCCCAACGCTGGACCTTC	1872
A P L H D G Q K V Q L W T C N Q T E A Q R W T F	
————— Primer G5b	
TAGGATCC	1981
B D	

Figura 23 – Sequência de nucleotídeos e de aminoácidos deduzidos do gene de β -1,3-glucanase lítica de *C. cartae* 191: Os nucleotídeos são numerados a partir do terminal 5' do fragmento de DNA. Os aminoácidos sublinhados foram determinados pelo seqüenciamento de Edman automatizado da proteína madura purificada. A seta vertical indica o início da ORF. Os sítios de reconhecimento para as enzimas de restrição *Xho*I e *Pst* I estão sombreadas em cinza. As setas horizontais indicam os *primers* usados na amplificação do gene.

O gene da β -1,3-glucanase lítica de *C. cartae* 191, apresentou um quadro aberto de leitura (ORF) iniciando no nucleotídeo 226 e terminando no nucleotídeo 1872 da seqüência de DNA, predizendo assim uma proteína de 549 aminoácidos. O sítio de iniciação ATG foi precedido a uma distância de dez bases por uma suposta seqüência Shine Delgarno de AGGAG.

Assim como descrito por Shen et al. (1991), há um possível sítio de clivagem do peptídeo sinal na posição entre Ala-36 e Val-37, codificando assim uma proteína madura de 513 aminoácidos. O fato de que a região N-terminal da proteína começar na posição 37, da seqüência de aminoácidos predita, foi confirmada pelo seqüenciamento da enzima madura purificada do meio de cultura de *Cellulomonas cartae* 191.

Essa proteína madura predita apresentou massa molecular calculada em 56,5 kDa, o que está de acordo com a massa molecular estimada da proteína através da eletroforese de SDS-PAGE (vide item 5.3.2.3). Os resultados mostraram, entretanto, que o gene da β -1,3-glucanase lítica de *C. cartae* 191 possui três nucleotídeos a mais dentro da sua ORF quando comparada com a β -1,3-glucanase lítica de *O. xanthineolytica*. A Figura 24 mostra o alinhamento das seqüência de aminoácidos deduzidos da β -1,3-glucanase lítica de *C. cartae* 191 e de *O. xanthineolytica*.

1_O.x	MPHDRKNSSRRAWAALCAAVLAVSGALVGVAAPASAVPATIPLTITNDSGRGPIYLYVLG	60
2_191	MSLDRRRRSRRAWAALCAAVLAVSGAVVGAAAPASAVPATIPLTITNDSGKGPYLYVLG *. **: . *****;*. *****;*****	
1_O.x	ERDGVAGWADAGGTFHPWPGGVGPVVPAPDAS IAGPGPGQSVTIRLPKLSGRVYYSYGQ	120
2_191	ERDGVAGWADAGGTFHPWPGGVGPVVPAPDAS IAGPGPGQSVTIRLPKLSGRVYYSYGQ *****	
1_O.x	KMTFQIVLDGRLVQPAVQNDSDPNRNILFNWTEYTLNDGGLWINSTQVDHWSAPYQVGVQ	180
2_191	KMTFQIVLDGRLVQPAVQNDSDPNRNILFNWTEYTLNDGGLWINSTQVDHWSAPYQVGVQ *****	
1_O.x	RADGQVLSTGMLKPNGYEAFYTALEGAGWGGLVQRAPDGSRLRALNPSHGIDVGKISSAS	240
2_191	RADGQVLSTGMLTPNGYEAFYKALESAGWGGLVQRAPDGSRLRALNPSRGIDVGKISSAS *****.*****.***.*****;*****	
1_O.x	IDSYVTEVWNSYRTRDMVVT PFSHEPGTQFRGRVDGDWFRFRSGSGQEVAAFKPKDASSV	300
2_191	IDSYVTEVWNSYRTRDMVVT PFSHEPGTQFRGRVDGDWFRFRNASGQGVAAFTKPKDASSV *****.*** ***.*****	
1_O.x	YGCHKDLQAPNDHVVGPIARTLCAALVRTTALTNPNQPDANSAGFYQDARTNVYAKLAHQ	360
2_191	YGCHKDLQAPNDHVVGPIARTLCAALIRTTALTNPNQPDASDAGFYQDARTNVYAKLAHQ *****;*****.*****	
1_O.x	QMANGKAYAFADFDDVGAHESLVHDGNPQAAYIKLDPFTGTATPLG-NGGSTEQPGTPGGGL	420
2_191	QMANGKAYAFADFDDVGAHESLVHDGNPQAAFIKLDPFTGAATPVGDNGGGTEQPNPGGGL *****;*****;***;* ***.***.***	
1_O.x	PAGTGALRIGSTLCLDVPWADPTDTNQVQLATCSGNAAQQWTRGTDGTVRALGKCLDVAR	480
2_191	PTGTGTIRAGAALCLDVPWADPTDANQVGLANCSGNAAQQWTRGSDGTVRALGKCLDVAR *:***:;* *:;*****;*** **;*****;*****	
1_O.x	SGTADGTAVWIYTCNGTGAQKWTYDSATKALRNPQSGKCLDAQGGAPLRDGGQKVQLWTCN	540
2_191	SGTADGTVVWIYTCNGTGAQQWVYDAGTQALRNPQSGKCLDAQGGAPLHDGQKVQLWTCN *****.*****;*.**;.*:*****;*****	
1_O.x	QTEAQRWTL	549
2_191	QTEAQRWTF *****;	

Figura 24 – Comparação entre as seqüências de aminoácidos deduzidas dos genes da β -1,3-glucanase lítica de *C. cartae* 191 e de *O. xanthineolytica*: Os asteriscos (*) mostram resíduos idênticos; dois pontos (:) indicam substituições fortemente conservadas e um ponto (.) indicam substituições pouco conservadas. Para esse alinhamento foi usada a matriz Gonnet Pam250 no CLUSTAL X (Thompson et al., 1997).

O resultado da comparação das duas seqüências de aminoácidos, mostrou um aminoácido a mais na seqüência de *C. cartae* 191. Este aminoácido, Aspartato (D) encontra-se na posição 406 da seqüência determinada na Figura 24.

Utilizando-se de ferramenta de bioinformática, website NCBI ferramenta BLAST de comparação de pares, resultados mostraram 92% de identidade de nucleotídeos e 87% de identidade de aminoácidos com a enzima da β -1,3-glucanase lítica madura de *O. xanthineolytica* descrita por Shen et al. (1991).

Stackebrandt et al. (1982), propuseram combinar *Cellulomonas cartae*, *Brevibacterium lyticum*, *Brevibacterium fermentans*, *Nocardia cellulans* e *Oerskovia xanthineolytica* em uma espécie a qual foi denominada de *Cellulomonas cartae*. A proposta de combinar todas as cinco espécies sob o nome de *Cellulomonas cartae* não está de acordo com o Código Bacteriológico pois o pseudônimo *cellulans* em *Nocardia cellulans* têm prioridade sobre o pseudônimo *cartae* (regras 38 e 42). Desta forma, o nome taxonômico sobre o qual elas são unidas é *Cellulomonas cellulans*.

Esta alta identidade (> 90%) do gene de *C. cartae* 191 com o gene previamente clonado de uma bactéria intimamente relacionada (a *O. xanthineolytica*- banco de dados gi 150444), confirma desta forma, que o gene clonado neste trabalho foi realmente o gene requerido, ou seja o da β -1,3-glucanase lítica.

Resultados da análise da seqüência de aminoácidos de outras glucanases mostram 87% de identidade com a endo β -1,3-glucanase do tipo I de *Arthrobacter* sp. YCWD3 (banco de dados gi 3023679) e 57% com a endo β -1,3-glucanase de *Streptomyces matensis* DIC-108 descrita por Nakabayashi et al., 1998 (gi 3869090).

A β -1,3-glucanase de *C. cartae* 191, apresentou alinhamento significativo mas menor identidade com a β -1,3-glucanase do tipo II de *O. xanthineolytica* descrita por Ferrer et al., 1996 (gi 2981143), aonde verificou-se similaridade apenas na região C-terminal destas enzimas. A seqüência de aminoácidos deduzidos da β -1,3-glucanase lítica de *Cellulomonas cartae* 191 não mostrou nenhuma homologia com a seqüência de aminoácidos N-terminal da β -1,3-glucanase de *Oerskovia xanthineolytica* TK-1 descrita por Saeki et al. (1994). A Figura 25 ilustra o alinhamento destas seqüências usando-se o programa BioEdit.

```

191      1  msldrrrrsrrawaalcaavlavsgavvgaapasavpatipltitndsgkpgpiylyvlg
ARTSP    1  mphdrknssrrawaalcaavlavsgalvgvaapasavpatipltitndsgkpgpiylyvlg
OERXA    1  mphdrknssrrawaalcaavlavsgalvgvaapasavpatipltitndsgkpgpiylyvlg
bglII    1  ~~~~~~
LPHase   1  mlrtllrrrvtavalglatalgggglwlaagvpspahaavpatipltitndsgraeqihiynl

191      61  erdgvagwadaggtfhpwpggvvppvpapdasilagppggqsvtirllpklsgrvvyygygg
ARTSP    61  erdgvagwadaggtfhpwpggvvppvpapdasilagppggqsvtirllpklsgrvvyygygg
OERXA    61  erdgvagwadaggtfhpwpggvvppvpapdasilagppggqsvtirllpklsgrvvyygygg
bglII    1  ~~~~~~dlarhr
LPHase   61  gtelsgrqgwadasgafhpwpaggnpptpapdasilggpapgsttqipkfsgriyfsy

191      121  kntfgiivldgrlvcpavqndsdpnrrnilfnwteytlndgglwinstqvdhwsapyqvgvq
ARTSP    121  kntfgiivldgrlvcpavqndsdpnrrnilfnwteytlndgglwinstqvdhwsapyqvgvq
OERXA    121  kntfgiivldgrlvcpavqndsdpnrrnilfnwteytlndgglwinstqvdhwsapyqvgvq
bglII    7  sltpprtptgrpparrnllasalvaalcaaaaalavtvaatsaaaapgdllwdfdfgaa
LPHase   121  grkmefrlittgglvqpavqndsdpnrrnilfnwseytlndsglwinstqvdhwsapyqvgvq

191      181  radgqvlstgmltprgyeafykalesagwgglvqrapdgsrlralnpsrgidvvgkissas
ARTSP    181  radgqvlstgmlkprgyeafytalesagwgglvqrapdgsrlralnpsrgidvvgkissas
OERXA    181  radgqvlstgmlkprgyeafytalesagwgglvqrapdgsrlralnpsrgidvvgkissas
bglII    67  qsapnpavmnhetgahgwgnaelqnytasransaldggglvitarregdqsytsarntt
LPHase   181  rrgdgttlstgklrpggyngvfnaalrgqsgganliqtrndgtvlralsplygvetgalp

191      241  idsyvtewnsyrtrdvvvtpfshhepgtqfngrvdgdwfrfrnsggqveaafkkipdassv
ARTSP    241  idsyvtewnsyrtrdvvvtpfshhepgtqfngrvdgdwfrfrnsggqveaafkkipdassv
OERXA    241  idsyvtewnsyrtrdvvvtpfshhepgtqfngrvdgdwfrfrnsggqveaafkkipdassv
bglII    127  qgkyppgyrieaariqiprgqgiwpa fwmllggsfpgtpwssgeidimenvgfephrvhg
LPHase   241  asvmdyihrvwnkytgtdliwvtfadrpdvrytgrvsggvlrfdgdsgavvttfqpka

191      301  ygchkdlgapndhvvvgpiartlcaalirttaltnpnpdasdagfyqdartrnvyaklahq
ARTSP    301  ygchkdlgapndhvvvgpiartlcaalvrttaltnpnpdasdagfyqdartrnvyaklahq
OERXA    301  ygchkdlgapndhvvvgpiartlcaalvrttaltnpnpdasdagfyqdartrnvyaklahq
bglII    187  tvhggysggsgitgmyqhpqgwsfadtfhtfavdwkppgeitwfvdggqfhrvtrasvga
LPHase   301  ssvfgchrlldapndqvrpiserltcagfnrttllanphqprdrsaagfygepvtnhycari

191      361  qmangkayafa fddvgaheslvhdgmpqaa fikldpftgaaatpvgdngggteqpnpggg1
ARTSP    361  qmangkayafa fddvgaheslvhdgmpqaa yikldpftgtatpia~nggsteqpgtppgg1
OERXA    361  qmangkayafa fddvgaheslvhdgmpqaa yikldpftgtatplg~nggsteqpgtppgg1
bglII    247  nawvfdqpfllilnvavggqwpqyppdgttqlppqmkvdyrvyvdn~sgssspgnpgtgl
LPHase   361  ihakmadgkaygfa fddvggheslvhdgdprgasltldpfd~~~~~

191      421  pagtgatiragaalclldvpwadptdangvylancsgnaaqwtgrgdgtvralgkldvar
ARTSP    420  pagtgallrigstlclldvpwadptdtnvgvlatcsgnaaqwtgrgdgtvralgkldvar
OERXA    420  pagtgallrigstlclldvpwadptdtnvgvlatcsgnaaqwtgrgdgtvralgkldvar
bglII    306  pagtgavraangucvldvpwadptdgnvqilvtcsgnaaqwtgrgdgtvralgkldvrd
LPHase   401  ~~~~~~

191      481  sgtadgtvwydytengtgagqkwvydagtqalrnpqsgkcldagggaplrdgqkvglwtcn
ARTSP    480  sgtadgtavwydytengtgagqkwtydsatkalrnpqsgkcldagggaplrdgqkvglwtcn
OERXA    480  sgtadgtavwydytengtgagqkwtydsatkalrnpqsgkcldagggaplrdgqkvglwtcn
bglII    366  gstrrgaavvwtengtgagqkwaydagaskalrnpqsgkcldatggaplrdgqrlglwtcn
LPHase   401  ~~~~~~

191      541  qteagrwtf
ARTSP    540  qteagrwtl
OERXA    540  qteagrwtl
bglII    426  gttaggwtl
LPHase   401  ~~~~~~

```

Figura 25- Alinhamento da β -1,3-glucanase de *C. cartae* 191 (**191**) com a endo β -1,3-glucanase de *Arthrobacter* sp. YCWD3 (**ARTSP**), com a endo β -1,3-glucanase do tipo I de *Oerskovia xanthineolytica* ATCC21606 (**OERXA**), com a β -1,3-glucanase do tipo II de *Oerskovia xanthineolytica* LLG109 (**β gIII**) e com a endo β -1,3-glucanase de *Streptomyces matensis* DIC-108 (**LPHase**). Região negra indica identidade de aminoácidos e região cinza indica similaridade de aminoácidos.

Nenhuma similaridade significativa foi encontrada quando se comparou a seqüência de aminoácidos da β -1,3-glucanase lítica de *C. cartae* 191 com a seqüência da laminarinase (endo-1,3(4)- β -glucanase) termoestável de *Clostridium thermocellum* descrita por Zverlov & Velikodvorskaya (1990) (gi 396451). A comparação com a seqüência de aminoácidos da endo β -1,3-glucanase de *Flavobacterium dormitator* não foi possível, tendo em vista que, o gene desta enzima não foi seqüenciado pelos autores (Nagata et al., 1990), os quais descreveram apenas a clonagem e expressão do gene da endo β -1,3-glucanase em células de *Escherichia coli*. A β -1,3-glucanase lítica de *C. cartae* 191, também foi comparada com a seqüência de aminoácidos da β -1,3-glucanase de *Bacillus circulans* IAM 1165 descrita por Aono et al. (1992) (gi 484466). O resultado mostrou que não houve homologia entre elas.

A β -1,3-glucanase de *C. cartae* 191 não apresentou similaridade significativa com a exo β -1,3-glucanase da levedura *Candida albicans* ATCC10261 descrita por Chambers et al., 1993a (gi 1169578). Esta exo β -1,3-glucanase fúngica contém vários blocos de seqüência homólogas a vários genes de celulasas (endo β -1,4-glucanases) inclusive a seqüência conservada NEP (asparagina, ácido glutâmico e prolina). A β -1,3-glucanase de *C. cartae* 191 também não apresentou similaridade significativa com outra exo β -1,3-glucanase fúngica descrita por Giczey et al. (2001) produzida por *Coniothyrium minitans* (gi 7547014) nem com a endo β -1,3-glucanase BGN13.1 do fungo *Trichoderma harzianum* (gi 1706550), a qual é a única endo β -1,3-glucanase fúngica seqüenciada até o presente.

Nenhuma similaridade significativa foi encontrada quando se comparou a seqüência de aminoácidos da β -1,3-glucanase lítica de *C. cartae* 191 com a seqüência da endo β -1,3(4)-glucanase de *Phaffia rhodozyma* CBS 6938, descrita por Bang et al. (1999) (gi 3152652). Nenhuma similaridade significativa também foi encontrada com as enzimas β -1,3-glucanase de plantas *Nicotiana tabacum* (gi 640904) e *Cucumis melo* (gi 18087505).

Entretanto, a β -1,3-glucanase lítica de *C. cartae* 191 apresentou alinhamento significativo mas menor identidade com outras enzimas como a glicosil hidrolase de *Streptomyces coelicolor* (gi 6752332), com a quitinase chi35 de *Streptomyces thermoviolaceus* (gi 6681672) e com endo β -1,4-xilanases e arabinosidases de *Streptomyces* sp. Esta similaridade foi verificada entre os resíduos de aminoácidos número 429 a 549 da seqüência deduzida da enzima de *C. cartae* 191. A β -1,3-glucanase de *C. cartae* 191 apresentou pequenos blocos de homologia com lectina. Estes domínios conservados foram encontrados na região Carboxi terminal da β -1,3-glucanase (resíduos de aminoácidos 427 a 549). As lectinas são proteínas de plantas com alta afinidade por resíduos de açúcares localizados na parte extracelular de membranas. A região Carboxi terminal da enzima β -1,3-glucanase de *C. cartae* 191 pode estar envolvida na interação com glicoproteínas ligadas à parede celular de leveduras.

5.8. Construção do plasmídeo recombinante (Clone C)

Os dois fragmentos do gene, inseridos nos plasmídeos pGS7 e pGSB (já seqüenciados), foram inseridos juntos em um só plasmídeo como descrito no item 4.10.5. Esse clone contendo o plasmídeo recombinante com a seqüência do gene completa, foi designado de pGSC.

Pela estratégia escolhida, inicialmente foi feito a seleção do plasmídeo pGS7-, como descrito no item 4.10.5. Foram obtidas 40 colônias na placa contendo meio SOB, sendo que 15 colônias foram escolhidas para a seleção. Os plasmídeos recombinantes foram isolados das quinze colônias e clivados com a enzima *Pst*I. Pelo perfil eletroforético em gel de agarose 1%, obteve-se a colônia nº9 como possível clone pGS7-. Pois foi verificada a presença de fragmento de cerca de 4,2Kb (0,3Kb + 4,2Kb = 4,5Kb); ao contrário do clone pGS7 o qual possui fragmentos de 3,3Kb e 1,2Kb no gel de agarose quando clivado com a enzima *Pst*I. A colônia nº9 confirmou ser o clone desejado pGS7-, pelo perfil eletroforético obtido em gel de agarose 1%, quando clivado com a enzima de

restrição *Xho*I. Foram usados o pGS7 e o pBluescript intactos e clivados com *Xho*I como controles negativos (Figura 26).

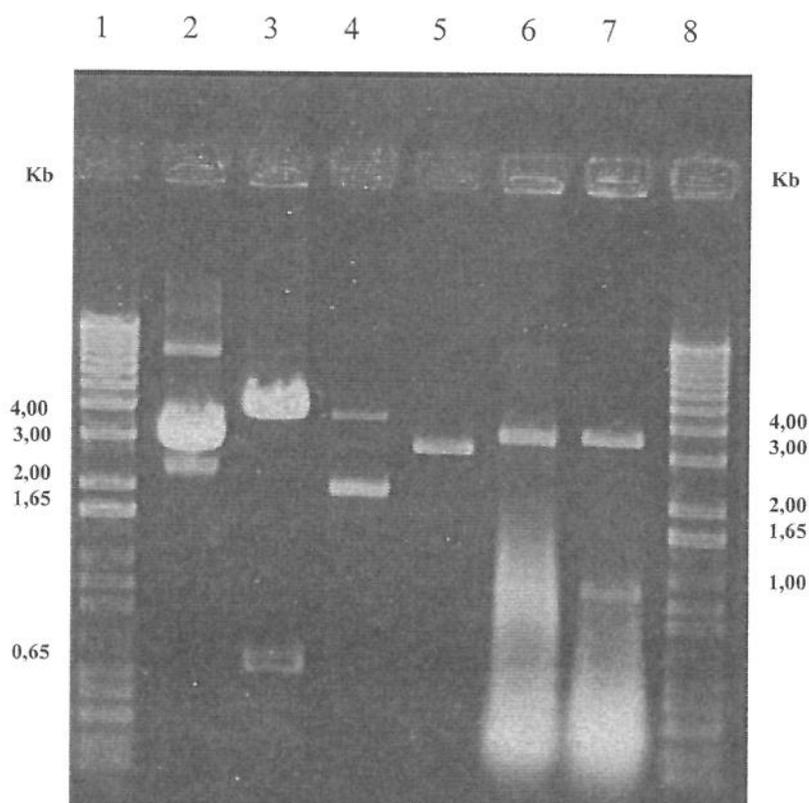
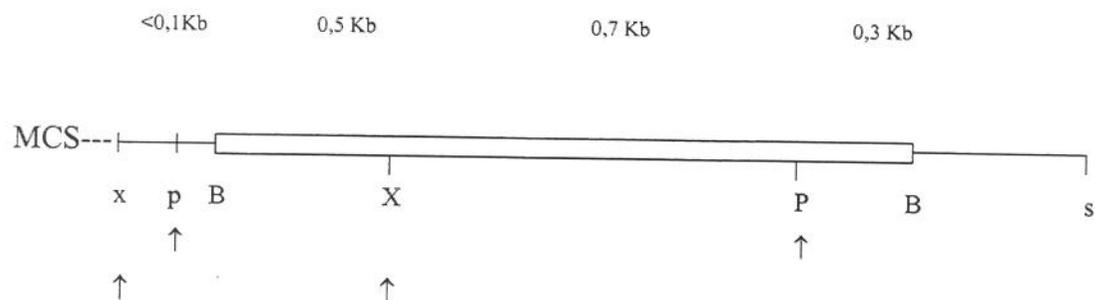


Figura 26 – Eletroforese em gel de 1% de agarose para seleção do Clone pGS7-: 1 e 8- Padrões de peso molecular (1Kb Plus Ladder); 2- pGS7 intacto; 3- pGS7 clivado com *Xho*I (controles); 4- pBluescript intacto; 5- pBluescript clivado com *Xho*I (controles); 6- colônia n° 9 intacta; 7- colônia n° 9 clivada com *Xho*I.

pGS7



pGS7 -

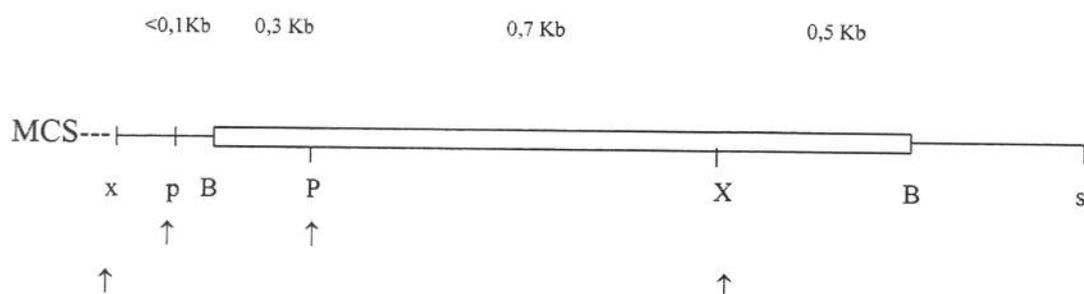


Figura 27 – Ilustração dos sítios de clivagem do fragmento de 1,5 Kb inserido no plasmídeo recombinante pGS7 e pGS7 -. As letras indicam os sítios de reconhecimento para as enzimas de restrição (letras minúsculas mostram sítios dentro do MCS e maiúsculas dentro do fragmento do gene):

B= *Bam*HI; K= *Kpn*I; P= *Pst*I; S= *Sac* I e X= *Xho*I.

Como observado nos resultados, a colônia nº 9 quando clivada com *Xho*I, apresentou dois fragmentos: um com cerca de 3,4 Kb e outro de 1,1 Kb. Diferente do pGS7 clivado com a mesma enzima, o qual, apresentou uma banda na posição de cerca de 3,9 Kb e 0,6 Kb. Portanto, como se esperava baseando-se no mapa de restrição de pGS7, a amostra nº 9 foi escolhida como pGS7-. Este plasmídeo foi preparado em maior quantidade para análises posteriores, usando-se QIAGEN-tip 500. Obteve-se 100 μ l, diluído em tampão TE, na concentração de 0,28 μ g de DNA/ μ l.

Continuando a estratégia escolhida para construção do plasmídeo recombinante pGSC, contendo o gene de β -1,3-glucanase completo, o plasmídeo pGS7- e pGSB foram clivados de acordo com o item 4.10.5.

Obteve-se um fragmento de cerca de 1,1 Kb a partir do plasmídeo pGS7- clivado com *Xho*I. Para a mistura de ligação usou-se 46 ng (ou 18 fmol) do vetor, pGSB defosfatado, e 40 ng (ou 60 fmol) do fragmento. Os transformantes foram selecionados como descrito no item 4.11.1.

Obteve-se cerca de 100 colônias na placa de SOB. Para a seleção do clone pGSC, foram isolados os plasmídeos recombinantes de 24 colônias. Fez-se a seleção em gel de agarose 1%, usando-se o pGSB (com cerca de 3,8 Kb) como controle negativo.

Os resultados mostraram que as colônias n° 2, 10, 19 e 20 apresentavam perfil eletroforético diferentes. Estas colônias foram clivadas com a enzima *Bam*HI, bem como o controle pGSB e analisados em gel de agarose 1%, para confirmação. A Figura 28 mostra os resultados.

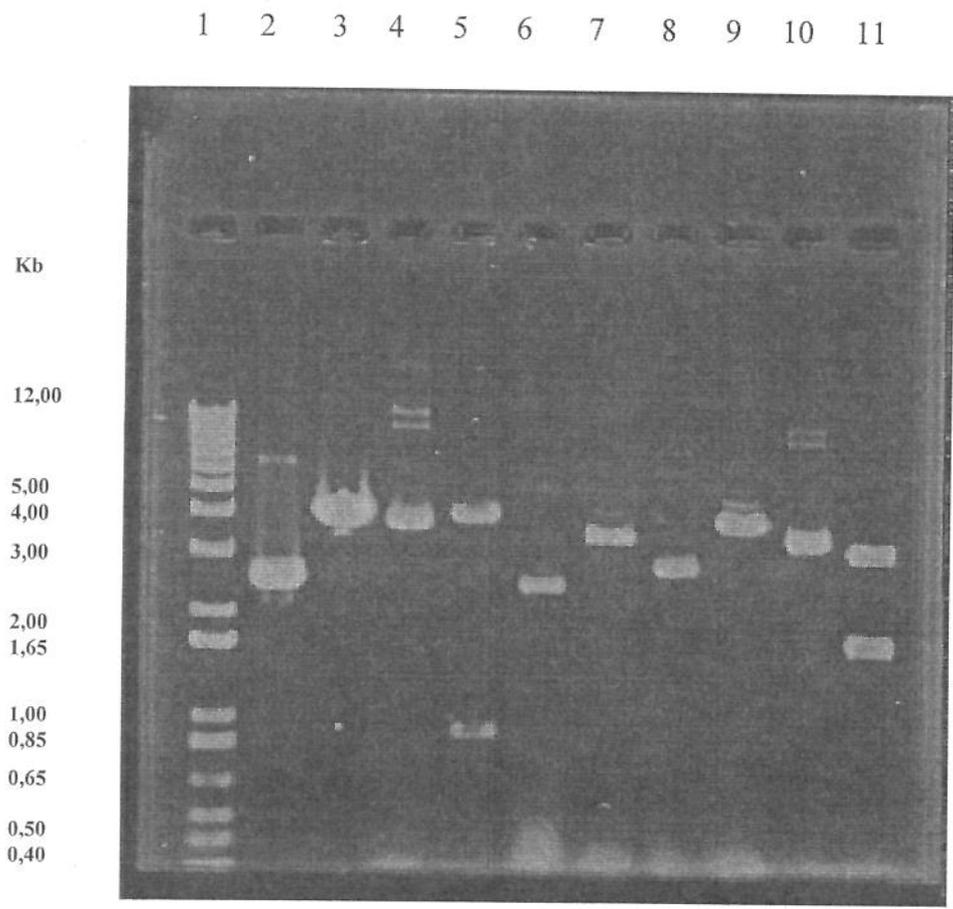
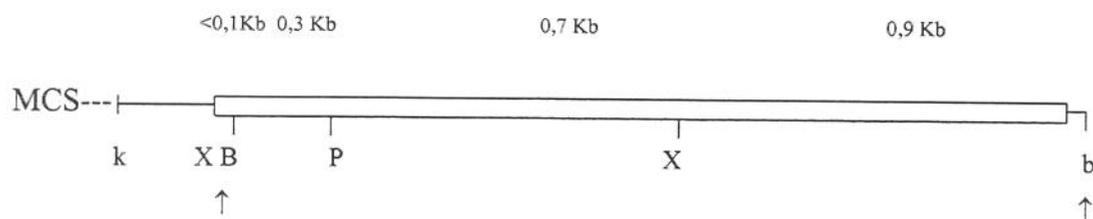


Figura 28- Eletroforese em gel de 1% de agarose para a seleção do Clone C:
 1- Padrões de peso molecular (1Kb Plus Ladder); 2- pGSB intacto; 3- pGSB clivado (controles); 4- colônia nº 2 intacta; 5- colônia nº 2 clivada; 6- colônia nº 10 intacta; 7- colônia nº 10 clivada; 8- colônia nº 19 intacta; 9- colônia nº 19 clivada; 10- colônia nº 20 intacta; 11- colônia nº 20 clivada. (Clivados com *Bam*HI).

pGSC



pGSC -

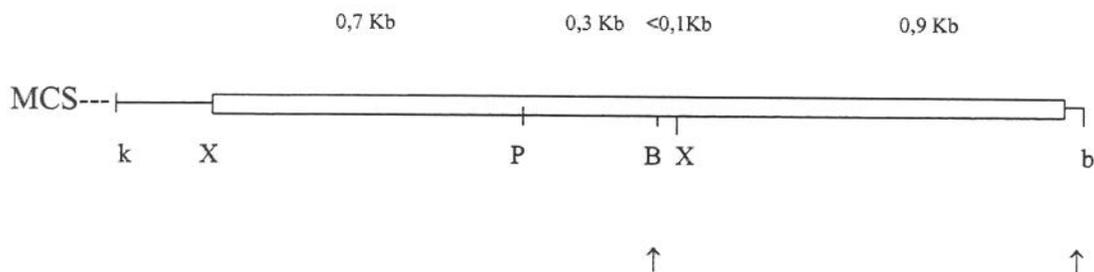


Figura 29 – Ilustração dos sítios de clivagem do fragmento de DNA contendo o gene completo da β -1,3-glucanase lítica de *Cellulomonas cartae* 191 inserido no plasmídeo recombinante pGSC e pGSC -. As letras indicam os sítios de reconhecimento para as enzimas de restrição (letras minúsculas mostram sítios dentro do MCS e maiúsculas dentro do fragmento do gene):

B= *Bam*HI; K= *Kpn*I; P= *Pst*I e X= *Xho*I.

Pela Figura 28, podemos verificar que as colônias n° 10 (Coluna 6 e 7) e 19 (Coluna 8 e 9) apresentaram o mesmo perfil que o do controle pGSB, intacto e clivado. As colônias n° 2 (Colunas 4 e 5) e 20 (Colunas 10 e 11), apresentaram PM maior do que o do controle, como desejado, pois com a combinação de 3,8 Kb (pGSB) + 1,1 Kb (fragmento) espera-se um plasmídeo pGSC de cerca de 5Kb. Entretanto, estas duas

amostras, intactas e clivadas, apresentaram perfis eletroforéticos diferentes entre elas. Isto é explicado pelo fato de que na colônia n° 2, o fragmento inseriu-se no vetor pGSB de forma invertida do desejado (vide esquema mostrado na Figura 29, pGSC-), pois quando clivado rendeu um fragmento de cerca de 1 Kb e outro de cerca de 4 Kb. Ficando um codon terminador, desta forma, dentro da ORF.

A colônia n° 20 (Colunas 10 e 11) mostrou ser a desejada, pois quando clivada por *Bam*HI, apresentou um fragmento de cerca de 2 Kb e outro de cerca de 3 Kb. Apresentando o fragmento completo na posição correta (vide Figura 29, pGSC). A ilustração do plasmídeo recombinante pGSC é mostrado na Figura 30. O pGSC foi preparado em maior quantidade, usando-se QIAGEN-tip 500. Obteve-se 500 µl, diluído em tampão TE, na concentração de 0,53 µg de DNA/µl.

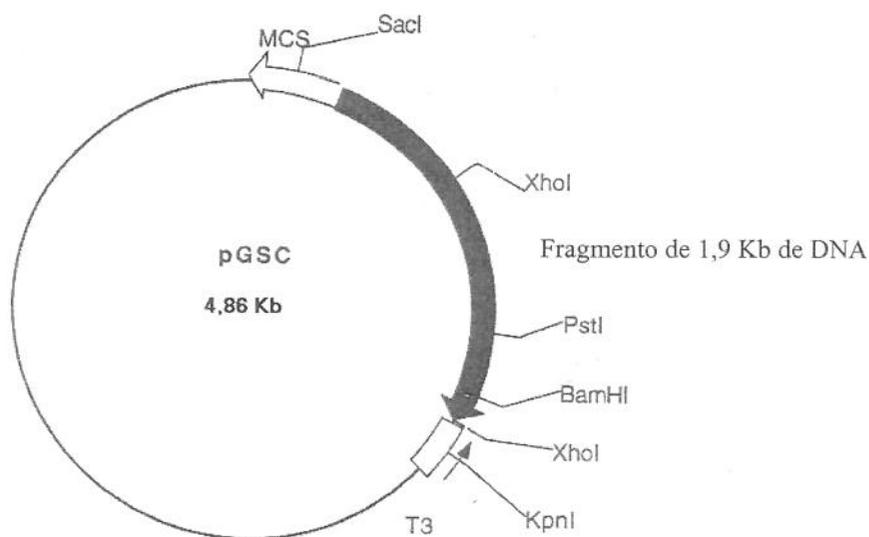


Figura 30 - Ilustração do plasmídeo recombinante pGSC: plasmídeo pBluescript contendo o fragmento de DNA do gene completo da β -1,3-glucanase lítica de *Cellulomonas cartae* 191. O fragmento de cerca de 1,9 Kb se encontra inserido no sítio múltiplo de clonagem do pBluescript (MCS) flanqueado pelo sítio de reconhecimento para a enzima de restrição *Xho*I (região escura).

6. CONCLUSÕES

A linhagem de *Cellulomonas cartae* 191 é capaz de lisar células de levedura *Saccharomyces cerevisiae* e também de inibir o crescimento do fungo fitopatogênico *Penicillium digitatum*.

A β -1,3-glucanase produzida pela linhagem de *Cellulomonas cartae* 191 mostrou ser uma enzima cuja síntese é induzida, sendo que o melhor indutor estudado foi a parede celular de leveduras obtida por rompimento mecânico, a qual possibilitou maior produção desta enzima.

As condições de cultivo foram otimizadas de forma que obteve-se cerca de 75% a mais de atividade de β -1,3-glucanase. Melhor atividade de β -1,3-glucanase foi obtida quando o microrganismo *C. cartae* 191 foi cultivado em meio Scott & Schekman modificado composto de 1% de parede celular de levedura, 0,2% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,02% de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ em tampão fosfato de sódio 0,2 M pH 7,5, após 24 horas de fermentação em frascos agitados a 200 rpm a 30 °C.

A enzima β -1,3-glucanase lítica de *C. cartae* 191 foi purificada a partir do sobrenadante do meio de cultura concentrado por ultrafiltração em membrana de exclusão de 10 kDa, diálise e cromatografia em coluna aniônica de DEAE-Sepharose Fast Flow equilibrada em tampão acetato de sódio 0,01 M, pH 5,5 e eletroforese de SDS-PAGE. A seqüência de aminoácidos N-terminal da β -1,3-glucanase lítica purificada de *C. cartae* 191 foi determinada e os resíduos de aminoácidos obtidos foram idênticos aos obtidos da enzima lítica comercial Zymolyase. A massa molecular da β -1,3-glucanase foi estimada em 57 kDa através de eletroforese de SDS-PAGE.

O gene da β -1,3-glucanase de *C. cartae* 191 foi isolado e clonado em células de *Escherichia coli* DH5 α , sendo obtido um fragmento de DNA de cerca de 1,9 Kb contendo um quadro aberto de leitura (ORF) de 1650 pb de nucleotídeos, predizendo uma proteína de 549 aminoácidos. A proteína apresenta um sítio de clivagem do peptídeo sinal na posição Ala-36 e Val-37, codificando assim uma proteína madura de 513 aminoácidos, o qual está de acordo com a massa molecular da enzima estimada em 57 kDa por SDS-PAGE.

O gene foi totalmente seqüenciado em ambas as direções e mostrou alta similaridade com o gene da β -1,3-glucanase lítica de *Oerskovia xanthineolytica* (92% de identidade). A β -1,3-glucanase de *Cellulomonas cartae* 191 apresentou 87% de identidade de aminoácidos deduzidos com a β -1,3-glucanase lítica do tipo I de *Oerskovia xanthineolytica* e *Arthrobacter luteus* e 57% com a de *Streptomyces matensis*. Confirmando, desta forma, que o gene isolado trata-se do gene requerido neste estudo.

7. SUGESTÕES PARA A CONTINUIDADE DO TRABALHO

O gene da β -1,3-glucanase isolado de *Cellulomonas cartae* 191 e inserido no plasmídeo recombinante pGSC, contém parte da região acima do ATG e o quadro aberto de leitura (ORF) completo. O plasmídeo recombinante pGS7 contém o fragmento do quadro aberto de leitura (ORF) sem a região que codifica o peptídeo sinal da proteína. Esses plasmídeos recombinantes, obtidos nesse trabalho conferem um grande potencial de continuidade de pesquisa. Através das técnicas de biologia molecular, os fragmentos poderão ser isolados desses plasmídeos e transferidos para plasmídeos específicos de expressão e secreção. Como citado por Salazar et al.(1999), a expressão de uma β -1,3-glucanase de *O. xanthineolytica* em *E. coli*, a qual não tinha sido expressa com sucesso em *E. coli* anteriormente por Ferrer et al., foi possível através da introdução do gene em um vetor de expressão e secreção, o pET20b(+). Portanto, é sugerido para continuidade desse trabalho, estudos de expressão da β -1,3-glucanase recombinante de *C. cartae* 191 em células de bactéria *Escherichia coli* bem como estudos com a proteína recombinante.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDREWS, B.A.; ASENJO, J.A. Continuous-culture studies of synthesis and regulation of extracellular β -1,3-glucanase and protease enzymes from *Oerskovia xanthineolytica*. **Biotechnology and Bioengineering**, v.30, p.628-637, 1987.
- AONO, R.; YAMAMOTO, M.; SATO, M.; NOGI, Y.; HORIKOSHI, K. Cloning and expression of a gene for an 87 KDa β -1,3-glucanase from *Bacillus circulans* IAM1165 in *Escherichia coli* K-12. **Bioscience Biotechnology Biochemistry**, v.56, n.11, p.1854-1858, 1992.
- ASENJO, J.A.; ANDREWS, B.A.; HUNTER, J.B.; LECORRE, S. Microbial cell lytic enzyme systems: production and reaction kinetics. **Process Biochemistry**, v.20, p.158, 1985.
- ASSIS, E.M. **Polissacarídeos da parede celular de levedura de cervejaria (*Saccharomyces cerevisiae*), obtida por rompimento mecânico da célula e de processo industrial de autólise**. Campinas, Universidade Estadual de Campinas. 1996, 115p. (Tese de Doutorado).
- BANG, M.L.; VILLADSEN, I.; SANDAL, T. Cloning and characterization of an endo- β -1,3(4)-glucanase and aspartic protease from *Phaffia rhodozyma* CBS 6938. **Applied Microbiology Biotechnology**, v.51, p.215-222, 1999.
- BECERRA, M.; DÍAZ PRADO, S.; GONZÁLES SISO, M.I.; CERDÁN, M.E. New secretory strategies for *Kluyveromyces lactis* β -galactosidase. **Protein Engineering**, v.14, n.5, p.379-386, 2001.

- CHAMBERS, R.S.; BROUGHTON, M.J.; CANNON, R.D.; CARNE, A.; EMERSON, G.W.; SULLIVAN, P.A. An $\text{exo-}\beta\text{-(1,3)}$ -glucanase of *Candida albicans*: purification of the enzyme and molecular cloning of the gene. **Journal of General Microbiology**, v.139, p.325-334, 1993a.
- CHAMBERS, R.S.; WALDEN, A.R.; BROOKE, G.S.; CUTFIELD, J.F.; SULLIVAN, P.A. Identification of a putative active site residue in the $\text{exo-}\beta\text{-(1,3)}$ -glucanase of *Candida albicans*. **FEBS**, v.327, n.3, p.366-369, 1993b.
- CÓRDOBA, G.M.C. **Composição, valor proteico e caracterização, toxicologia de células íntegras, células rompidas e concentrado proteico de levedo de cerveja (*Saccharomyces cerevisiae*)**. Tese de Doutorado - Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas 1996.
- CRUMPLEN, R.M.; DAMORE, T.; RUSSEL, I.; STEWART, G.G. The use of spheroplast fusion to improve yeast osmotolerance. **American Society of Brewery and Chemistry**, v.48, n.2, p.58-61, 1990.
- DOI, K.; DOI, A.; FUKUI, T. Purification and properties of lytic β -glucanase from an *Arthrobacter* bacterium. **Agricultural and Biological Chemistry**, v.37, n.7, p.1619-1627, 1973.
- DOI, K.; DOI, A.; NAKAMURA, S. Differential behavior of molecular species of $\beta\text{-1,3}$ -glucanase of some bacterial glucanase systems on Avicel columns. **Agricultural and Biological Chemistry**, v.40, n.9, p.1669-1677, 1976.
- DOI, K.; DOI, A. Cloning and expression in *Escherichia coli* of the gene for an *Arthrobacter* $\beta\text{-(1,3)}$ -glucanase. **Journal of Bacteriology**, v.168, n.3, p.1272-1276, 1986.

- FERRER, P.; HEDEGAARD, T.; HALKIER, T.; DIERS, I.; SAVVA, D.; ASENJO, J.A. Molecular cloning of a lytic β -1,3-glucanase gene from *Oerskovia xanthineolytica* LLG109. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.782, p.555-565, 1996a.
- FERRER, P.; HALKIER, T.; HEDEGAARD, T.; DIERS, I.; SAVVA, D.; ASENJO, J.A. Nucleotide sequence of a β -1,3-glucanase isoenzyme IIa gene from *Oerskovia xanthineolytica* LLG109 (*Cellulomonas cellulans*) and initial characterization of the recombinant enzyme expressed in *Bacillus subtilis*. **Journal of Bacteriology**, v. 178, n.15, p.4751-4757, 1996b.
- FERRO, L.A.; SATO, H.H.; YIM, D.K.; PACKER, C.N. Isolamento de microrganismos produtores de enzimas capazes de lisar a parede celular de *Saccharomyces cerevisiae*. **Anais do XIX Congresso Brasileiro de Microbiologia** - Rio de Janeiro, Novembro de 1997.
- FERRO, L.A.; SATO, H.H. Estudo da produção das enzimas responsáveis pela lise da parede celular de leveduras. **Anais do XIX Congresso Brasileiro de Microbiologia** - Rio de Janeiro, Novembro de 1997.
- FERRO, L.A. **Produção, purificação e caracterização da enzima β -1,3-glucanase de *Cellulomonas cellulans* YLM-B191-1 e ação da enzima na parede celular de leveduras**. Campinas, Universidade Estadual de Campinas. 2002, 174p. (Tese de Doutorado).
- FUJINO, S.; KITAMURA, K.; KANEKO, T.; YAMAMOTO, Y. Preparation of yeast extract by cell wall lytic enzyme. **Journal of Fermentation Technology**, v.52, n.11, p.828-836, 1974.

- GICZEY, G.; KERÉNYI, Z.; FULOP, L.; HORNOK, L. Expression of *cmg1*, an exo- β -(1,3)-glucanase gene from *Coniothyrium minitans*, increases during sclerotial parasitism. **Applied and Environmental Microbiology**, v.67, n.2, p.865-871, 2001.
- GUNGE, N.; SAKAGUCHI, K. Intergeneric transfer of deoxyribonucleic acid killer plasmids, pGK11 and pGK12, from *Kluyveromyces lactis* into *Saccharomyces cerevisiae* by cell fusion. **Journal of Bacteriology**, v.147, n.1, p.155-160, 1981.
- HAAPALAINEN, M.L.; KOBETS, N.; PIRUZIAN, E.; METZLER, M.C. Integrative vector for stable transformation and expression of a β -(1,3)-glucanase gene in *Clavibacter xyli* subsp. *cynodontis*. **FEMS Microbiology Letters**, v.162, p.1-7, 1998.
- 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 cells. **Biotechnology and Bioengineering**, v.38, p.977-985, 1991.
- HUNTER, J.B.; ASENJO, J.A. Kinetics of enzymatic and disruption of yeast cell: II. A simple model of lysis kinetics. **Biotechnology and Bioengineering**, v.30, p.481-480, 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.
- JAVADEKAR, V.S.; SIVARAMAN, H.; GOKHAL, D.V. Industrial yeast strain improvement: construction of highly flocculent yeast with a killer character by protoplast fusion. **Journal of Industrial Microbiology**, v.15, p.94-102, 1995.

- KANEKO, T.; KITAMURA, K.; YAMAMOTO, Y. Susceptibilities of yeasts cell wall lytic enzymes of *Arthrobacter luteus*. **Agricultural and Biological Chemistry**, v.37, n.10, p.2295-2302, 1973.
- KAPTEYN, J.C.; TER RIET, B.; VINK, E.; BLAD, S.; NOBEL, H.; VAN DEN ENDE, H.; KLIS, F.M. Low external pH induces HOG1-dependent changes in the organization of the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. **Molecular Microbiology**, v.39, n.2, p.469-479, 2001.
- KIRIN BREWERY CO. LTD. Zymolyase 5000 - Boletim Informativo do Research Laboratories of Kirin Brewery Co. Ltd, Japão.
- 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.
- KITAMURA, K. A high yeast cell wall lytic enzyme-producing mutant of *Arthrobacter luteus*. **Journal of Fermentation Technology**, v.60, n.3, p.253-256, 1982.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v.227, p.680-685, 1970.
- LIU, L.; PROKOPAKIS, G. J.; ASENJO, J.A. Optimization of enzymatic lysis of yeast. **Biotechnology and Bioengineering**, v.32, p.1113-1127, 1988.
- MACKENZIE, L.F.; BROOKE, G.S.; CUTFIELD, J.F.; SULLIVAN, P.A. Identification of Glu-330 as the catalytic nucleophile of *Candida albicans* exo- β -(1,3)-glucanase. **Journal of Biological Chemistry**, v.272, n.6, p.3161-3167, 1997.

- MANNERS, D.J.; MASSON, A.J.; PATTERSON, J.C. The structure of β -1,3-Dglucan from yeast cells walls. **Biochemistry Journal**, v.135, p.19-30, 1973.
- NAGASAKI, S.; NISHIOKA, T.; MORI, H.; YAMAMOTO, Y. Purification and properties of lytic β -1,3-glucanase from *Flavobacterium dormitator* var *glucanolyticae*. **Agricultural and Biological Chemistry**, v.40, n.6, p.1059-1067, 1976.
- NAGATA, S.; MARU, I.; ISHIHARA, F.; MISONO, H.; NAGASAKI, S. Cloning and expression of endo β -1,3-glucanase gene from *Flavobacterium dormitator* in *Escherichia coli* and characterization of the gene product. **Agricultural and Biological Chemistry**, v.54, n.10, p. 2675-2680, 1990.
- NAKABAYASHI, M.; NISHIJIMA, T.; EHARA, G.; NIKAIDOU, N.; NISHIHASHI, H.; WATANABE, T. Structure of the gene encoding laminaripentaose-producing β -1,3-glucanase (LPHase) of *Streptomyces matensis* DIC-108. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v.85, n.5, p.459-464, 1998.
- NETO, B.B.; SCARMINIO, I.S.; BRUNS, R.E. **Planejamento e otimização de experimentos**. Editora da Universidade Estadual de Campinas, 299p., 1995.
- NOBEL, H.; RUIZ, C.; MARTIN, H.; MORRIS, W.; BRUL, S.; MOLINA, M.; KLIS, F.M. Cell wall perturbation in yeast results in dual phosphorylation of the Slt2/Mpk1 MAP kinase and in an Slt2-mediated increase in FKS2-*lacZ* expression, glucanase resistance and thermotolerance. **Microbiology**, v.146. p.2121-2132, 2000.
- OBATA, T.; YAMASHITA, K.; FUJIOKA, K.; SHODO, H.; AKIYAMA, H. Purification of β -1,3-glucanases from highly lytic enzymes produced by *Oerskovia* sp. and their properties. **Journal of Fermentation Technology**, v.54, n.9, p.640-648, 1976.

- OBATA, T.; FUJIOKA, K.; HARA, S.; NAMBA, Y. The synergistic effects among β -1,3-glucanase from *Oerskovia* sp CK on lysis of viable yeast cell. **Agricultural and Biological Chemistry**, v.41, n.12, p.2387-2394, 1977.
- 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.11, p.731-736, 1983.
- PARRADO, J.; ESCUREDO, P.R.; CONEJERO-LARA, F.; KOTIK, M.; PONTING, C.P.; ASENJO, J.A.; DOBSON, C.M. Molecular characterization of a thermoactive β -1,3-glucanase from *Oerskovia xanthineolytica*. **Biochemistry and Biophysics Acta**, v.1296, p.145-151, 1996.
- PAVIA, J.; AGUADO, C.; MORMENEO, S.; SENTANDREU, R. Secretion, interaction and assembly of two O-glycosylated cell wall antigens from *Candida albicans*. **Microbiology**, v.147, p.1983-1991, 2001.
- ROMBOUTS, F.M.; PHAFF, H.J. Lysis of yeast cell walls, lytic β -1,6-glucanase from *Bacillus circulans* WL-12. **European Journal of Biochemistry**, v.63, p.109-120, 1976.
- RYAN, E.; WARD, O.P. The application of lytic enzymes from *Basidiomycetes* *aphyllophorales* in production of yeast extract. **Process Biochemistry**, p. 12-16, 1988.
- SAEKI, K.; IWATA, J.; YAMAZAKI, S. WATANABE, Y.; TAMAI, Y. Purification and characterization of a yeast lytic β -1,3-glucanase from *Oerskovia xanthineolytica* TK-1. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v.78, n.6, p.407-412, 1994.
- SALAZAR, O.; MOLITOR, J.; ASENJO, J.A. Cloning and expression of an *Oerskovia xanthineolytica* β -(1,3)-glucanase in *Escherichia coli*. **Biotechnology Letters**, v.21, p.797-802, 1999.

- SALAZAR, O.; MOLITOR, J.; LIENQUEO, M.E.; ASENJO, J.A. Overproduction, purification, and characterization of β -(1,3)-glucanase type II in *Escherichia coli*. **Protein Expression and Purification**, v.23, n.2, p.219-225, 2001.
- SCOTT, J.H.; SCHEKMAN, R. Lyticase: endoglucanase and protease activities that act together in yeast cell lysis. **Journal of Bacteriology**, v.142, n.2, p.414-423, 1980.
- SHEN, S.H.; CHRÉTIEN, P.; BASTIEN, L.; SLILATY, S.N. Primary sequence of the glucanase gene from *Oerskovia xanthineolytica*. **Journal of Biological Chemistry**, v.266, n.2, p.1058-1063, 1991.
- SHENE, C.; ANDREWS, B.A.; ASENJO, J.A. Fedbatch fermentations of *Bacillus subtilis* ToC46 (pPFF1) for the synthesis of a recombinant β -1,3-glucanase: experimental study and modeling. **Enzyme and Microbial Technology**, v.24, p.247-254, 1999.
- SMITH, P.K.; KROHN, R.I.; HERMANSON, G.T.; MALLIA, A.K.; GARTNER, F.H.; PROVENZANO, M.D.; FUJIMOTO, E.K.; GOEKE, N.M.; OLSON, B.J.; KLEN, D.C. Measurement of protein using bicinchonic acid. **Analytical Biochemistry**, v.150, p.76-85, 1985.
- 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.
- SULO, P.; MICHALCÁKOVÁ, S.; REISER, V. Construction and properties of K1 type killer wine yeasts. **Biotechnology Letters**, v.14, n.1, p.55-60, 1992.

- THÉODORE, K.; PANDA, T. Statistical optimization of production medium for β -1,3-glucanase synthesis by *Trichoderma harzianum*. **Biotechnology Techniques**, v.8, n.6, p.381-384, 1994.
- THÉODORE, K.; PANDA, T. Effect of glucose level on the batch production of β -1,3-glucanase by *Trichoderma harzianum* and cell growth. **Bioprocess Engineering**, v.20, p.309-311, 1999.
- THOMPSON, I.D.; GIBSON, T.J.; PLEWNIAK, F.; JEANMOUGIN, F.; HIGGINS, H.D. The clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analyses tools. **Nucleic Acid Research**, v.24, p.4876-4882.
- TOIDA, J.; ARIKAWA, Y.; KONDOU, K.; FUKUZAWA, M.; SEKIGUCHI, J. Purification and characterization of triacylglycerol lipase from *Aspergillus oryzae*. **Bioscience Biotechnology Biochemistry**, v.62, n.4, p.759-763, 1998.
- UEDA, S.; NANRI, N. Production of isoamylase by *Escherichia intermedia*. **Applied Microbiology**, v.15, n.4, p.492-496, 1967.
- YAMAMOTO, S.; NAGASAKI, S. Purification and characterization of an exo α -1,2-mannanase from *Flavobacterium dormitator* var. *glucanolyticae*. **Agricultural and Biological Chemistry**, v.39, p.1981-1989, 1975.
- YAMAMOTO, N.; HASUO, T.; TERAUCHI, T.; SAITO, K.; TEDENUMA, M. Studies on yeast-lysing microorganism. Habitats of yeast-lysing in waste water treatment process of food factory. **Journal of Brewing Society of Japan**, v.79, p.828-833, 1984.

- YAMAMOTO, N.; SATO, S.; SAITO, K.; HASUO, T; TEDENUMA, M.; SUZUKI, K.; TAMOAKA, J.; KOMAGATA, K. *Rarobacter faecitabidus* gen. Nov., a yeast-lysing *Coryneform bacterium*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.38, p.7-11, 1988.
- YAMAMOTO, N. G.; SATO, S.; MIKI, H.; PARK, Y.K.; TADENUMA, M. Isolation of Yeast -Lysing Bacteria in Brazil. **Report of the Research Institute of Brewing**, N.165, p. 37-43, 1993.
- ZLOTNIK, H.; FERNANDEZ, M.P.; BOWERS, B.; CABIB, E. *Saccharomyces cerevisiae* mannoproteins from an external cell wall layer that determines wall porosity. **Journal of Bacteriology**, v.159, p.1018-1026, 1984.
- ZVERLOV, V.V.; VELIKODVORSKAYA, G.A. Cloning the *Clostridium thermocellum* thermostable laminarinase gene in *Escherichia coli*; the properties of the enzyme thus produced. **Biotechnology Letters**, v.12, n.11, p. 811-816, 1990.