

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

**PRODUÇÃO DE β -1,3 GLUCANASES, PROTEASES LÍTICAS E
QUITINASES POR MICRORGANISMOS E APLICAÇÃO NA LISE DE
LEVEDURAS.**

PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por **Luciana Francisco Fleuri** aprovada pela Comissão Julgadora em 31 de março de 2003.

LUCIANA FRANCISCO FLEURI
Bióloga

Campinas, 31 de março de 2003.

Profa. Dra. HÉLIA HARUMI SATO
Orientadora

Helia Harumi Sato

Profa. Dra. Helia Harumi Sato
Presidente da Banca

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

Campinas - SP
2003

UNIDADE	BC
Nº CHAMADA	T/UNICAMP
	F639p
V	EX
TOMBO BC	53561
PROC.	124/03
C	☐
D	☒
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	01/05/03
Nº CPD	

Consulta até:
17/2/05

T/FEA/2003.1857

CM00182269-1

318 ID 294001

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

F639p Fleuri, Luciana Francisco
Produção de β -1,3 glucanases, proteases líticas e quitinases por microrganismos e aplicação na lise de leveduras / Luciana Francisco Fleuri. – Campinas, SP: [s.n.], 2003.

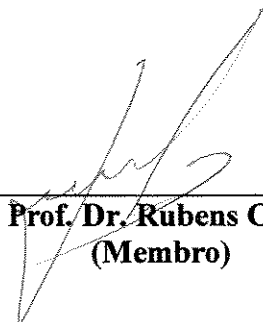
Orientador: Hélia Harumi Sato
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos.

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. Rubens Cruz
(Membro)



Profa. Dra. Gláucia Maria Pastore
(Membro)

Gabriela Macedo
(Membro)

Campinas, de de 2003.

Dedico,
À minha mãe Ivani pela ajuda constante e incondicional, pelo carinho e dedicação ao meu
filho, enfim, por tudo o que fez por mim.
Ao meu amor e mais fiel amigo, Thiago, pela compreensão, carinho, ajuda e incentivo.
Ao meu filho Diogo, razão da minha vida.
Ao meu pai Reginaldo e à minha irmã Mariana, pela paciência, ajuda e companherismo.
Muito obrigada! Amo vocês!

Dedico,
À Profa. Dra. Hélia Harumi Sato. Meu carinho e a minha gratidão a você que me atendeu durante esses anos, com atenção e generosidade, suportando tudo com calma e paciência. Deixo aqui a minha admiração, o meu profundo respeito e meu muito obrigada!

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Rubens Cruz pela orientação na iniciação científica, pelo incentivo e companherismo.

À FAPESP que através do apoio financeiro permitiu o desenvolvimento dessa tese e o meu aperfeiçoamento em vários aspectos.

À família Francisco & Fleuri, em especial às minhas tias Beth e Lau que acompanham o meu estudo desde criança.

Às famílias Delosi & Rocha & Montero pelas orações e vibrações positivas. Obrigada Vó Bel.

Aos meus amigos biólogos Fernanda, Otávio e Vitório pelo apoio.

À Margarida, Luciana Ferracini e Giselle pelos esclarecimentos das metodologias utilizadas na tese.

Aos meus recentes amigos Haroldo, Denise, Larissa e Mareike pela ajuda e companherismo.

À todos os professores, técnicos e colegas do Laboratório de Bioquímica de Alimentos pela ajuda, paciência e boa convivência.

“ É preciso amor pra poder pulsar,

É preciso paz pra poder sorrir,

É preciso chuva para florir.

Cada um de nós compõe a sua história, e cada ser em si, carrega o dom de ser capaz
e ser feliz.”

(Tocando em frente - Almir Sater).

ÍNDICE GERAL

1-INTRODUÇÃO	1
2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1- Composição da parede celular de leveduras.	3
2.1.1- Mananaproteínas.....	5
2.1.2- β -1,3 glucana	8
2.1.3- Quitina.....	12
2.2- Microrganismos produtores de enzimas líticas.	12
2.3- Microrganismos que lisam a parede celular de leveduras.....	14
2.4- Modo de ação das enzimas líticas.....	25
2.5- Aplicação de enzimas líticas.	31
3- MATERIAIS E MÉTODOS	37
3.1- MATERIAIS	37
3.2- MÉTODOS.....	38
3.2.1- Manutenção dos microrganismos.	38
3.2.2- Obtenção e preparação dos indutores.....	38
3.2.2.1- Parede celular de levedura extraída mecanicamente em Dyno-Mill.	38
3.2.2.2- Levedura autoclavada, lavada e liofilizada.	38
3.2.2.3- Glucana insolúvel em meio alcalino.	39
3.2.2.4- Quitina neutralizada e coloidal.	39
3.2.3- Estudo da produção de enzimas líticas β -1,3 glucanase, protease lítica e quitinase pelas linhagens B1, B22, B26, FXX, <i>Oerskovia</i> sp. n ^o 4 e <i>Cellulomonas cartae</i> n ^o 191 em meio de cultura I contendo diferentes indutores.....	40
3.2.4- Estudo da produção de enzimas líticas β -1,3 glucanase, protease lítica e quitinase pelas linhagens B1, B22, B26, FXX, <i>Oerskovia</i> sp. n ^o 4 e <i>Cellulomonas cartae</i> n ^o 191 nos meios de cultura II, III e IV.....	40
3.2.5- Determinação da atividade enzimática.....	42
3.2.5.1- Determinação da atividade de protease lítica.	42
3.2.5.2- Determinação da atividade de β -1,3 glucanase.....	42
3.2.5.3- Determinação da atividade de quitinase.....	42
3.2.6- Produção de protease lítica, β -1,3 glucanase e quitinase pelas linhagens de bactérias selecionadas.	43
3.2.7- Fracionamento das preparações enzimáticas brutas de protease, β -1,3 glucanase e quitinase com sulfato de amônio.	44
3.2.8- Estudo da atividade de lise de leveduras utilizando-se as preparações enzimáticas brutas e fracionadas com sulfato de amônio.	45
3.2.8.1- Estudo da lise da levedura <i>S.cerevisiae</i> KL-88 pelas preparações enzimáticas brutas.....	45
3.2.8.2- Estudo da lise da levedura <i>S.cerevisiae</i> KL-88 pelas preparações enzimáticas de β -1,3 glucanase, protease e quitinase.....	45
3.2.8.3- Estudo da lise de diferentes leveduras pelas preparações enzimáticas de β -1,3 glucanase, protease e quitinase.....	45
3.2.8.4- Obtenção das suspensões de células de leveduras.	46
3.2.8.5- Determinação da atividade lítica.....	46

3.2.9- Produção de enzimas que lisam a parede celular de leveduras pela linhagem <i>Cellulomonas cartae</i> n°191.	47
3.2.9.1- Estudo da relação entre tempo de fermentação, alteração do pH do meio de cultura, crescimento do microrganismo e produção das enzimas β -1,3 glucanase, protease e quitinase pela linhagem <i>Cellulomonas cartae</i> n°191 em frascos agitados a 30°C e 35°C.	47
3.2.9.2- Obtenção de β -1,3 glucanase da linhagem <i>Cellulomonas cartae</i> n°191 para a lise de leveduras.	48
3.2.10- Aplicação da enzima na lise de leveduras.	49
3.2.10.1- Planejamento experimental para a análise dos efeitos de diferentes variáveis na lise de levedura.	49
3.2.10.2- Estudo do efeito da cisteína e β -mercaptoetanol na lise de levedura.	50
3.2.10.3- Aplicação das enzimas líticas na lise da parede celular e extração de enzimas intracelulares.	50
3.2.10.4- Efeito do tratamento enzimático na lise da parede celular de leveduras com ultra-som.	51
4- RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
4.1- Estudo da produção das enzimas líticas protease, β -1,3 glucanase e quitinase pelas linhagens B1, B22, B26, FXX, <i>Oerskovia</i> sp. n°4 e <i>Cellulomonas cartae</i> n°191 em meio de cultura I.	53
4.2- Estudo da produção das enzimas líticas protease, β -1,3 glucanase e quitinase pelas linhagens B1, B22, B26, FXX, <i>Oerskovia</i> sp. n°4 e <i>Cellulomonas cartae</i> n°191 em meios de cultura II, III e IV.	57
4.3- Estudo da produção de protease, β -1,3 glucanase e quitinase.	67
4.4- Estudo da lise da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> KL-88 pelas preparações enzimáticas brutas de β -1,3 glucanase das linhagens B1 e 191, de protease das linhagens B26 e 191 e de quitinase da linhagem 191.	71
4.5- Fracionamento das preparações enzimáticas com sulfato de amônio.	72
4.6- Estudo da lise da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> KL-88 pelas preparações de β -1,3 glucanase, protease e quitinase obtidas por fracionamento com sulfato de amônio 60% de saturação.	74
4.7- Estudo da lise de leveduras utilizando preparações enzimáticas de β -1,3 glucanase da linhagem B1 e <i>Cellulomonas cartae</i> n°191 e protease e quitinase da linhagem <i>Cellulomonas cartae</i> n°191.	77
4.8- Estudo da relação entre tempo de fermentação, alteração do pH do meio de cultura, crescimento do microrganismo e produção das enzimas β -1,3 glucanases, proteases líticas e quitinases pela linhagem <i>C. cartae</i> n°191 em frascos agitados a 30°C e 35°C. ..	84
4.9- Obtenção da preparação enzimática de β -1,3 glucanase da linhagem <i>C. cartae</i> n°191 para a lise de leveduras.	101
4.10- Aplicação da β -1,3 glucanase da linhagem <i>C. cartae</i> n°191 fracionada com sulfato de amônio 60% de saturação na lise de leveduras.	101
4.10.1- Planejamento experimental para a análise dos efeitos de diferentes variáveis na lise de levedura.	101
4.10.2- Estudo do efeito da cisteína e β -mercaptoetanol na lise da levedura <i>S. cerevisiae</i> KL-88.	121

4.10.3- Extração de β -frutofuranosidase ou invertase de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> KL-88 e <i>Kluyveromyces marxianus</i> NCYC 587.....	125
4.10.4- Efeito do tratamento enzimático com a β -1,3 glucanase da linhagem <i>C. cartae</i> nº191 na lise de leveduras com ultra-som.	125
5- CONCLUSÕES.....	127
6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	131

ÍNDICE DAS ILUSTRAÇÕES

FIGURAS

Figura 1: Ilustração da composição e estrutura da parede celular de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (KLIS, 1994).....	5
Figura 2: Ilustração da parede celular e membrana plasmática (HUNTER & ASENJO, 1988)..	29
Figura 3: Produção de protease pelas linhagens B1, B22, B26, FXX, <i>Oerskovia</i> sp. n°4 e <i>Cellulomonas cartae</i> n°191 em meios contendo diferentes indutores.....	63
Figura 4: Produção de β -1,3 glucanase pelas linhagens B1, B22, B26, FXX, <i>Oerskovia</i> sp. n°4 e <i>Cellulomonas cartae</i> n°191 em meios contendo diferentes indutores.....	65
Figura 5: Produção de quitinase pelas linhagens B1, B22, B26, FXX, <i>Oerskovia</i> sp. n°4 e <i>Cellulomonas cartae</i> n°191 em meio IV contendo 1,5% de quitina neutralizada.....	67
Figura 6: Estudo da produção de β -1,3 glucanase pela linhagem <i>Cellulomonas cartae</i> n°191 em meio de cultura III em frascos agitados a 30°C.....	85
Figura 7: Estudo da produção de β -1,3 glucanase pela linhagem <i>Cellulomonas cartae</i> n°191 em meio de cultura III em frascos agitados a 35°C.....	87
Figura 8: Estudo da produção de protease pela linhagem <i>Cellulomonas cartae</i> n°191 em meio de cultura II em frascos agitados a 30°C.....	91
Figura 9: Estudo da produção de protease pela linhagem <i>Cellulomonas cartae</i> n°191 em meio de cultura II em frascos agitados a 35°C.....	93
Figura 10: Estudo da produção de quitinase pela linhagem <i>Cellulomonas cartae</i> n°191 em meio de cultura IV em frascos agitados a 30°C.....	97
Figura 11: Estudo da produção de quitinase pela linhagem <i>Cellulomonas cartae</i> n°191 em meio de cultura IV em frascos agitados a 35°C.....	99
Figuras 12a e 12b: Superfícies de resposta e curvas de contorno do efeito do tempo de fermentação para a obtenção de massa celular de levedura e da temperatura da mistura de reação na lise da levedura.....	107
Figuras 12c e 12d: Superfícies de resposta e curvas de contorno do efeito do pH e da temperatura de mistura de reação na lise da levedura.....	111

<i>Figuras 12e e 12f: Superfícies de resposta e curvas de contorno do efeito das condições de agitação para obtenção de massa celular de levedura e da temperatura de mistura de reação na lise da levedura.....</i>	<i>113</i>
<i>Figuras 12g e 12h: Superfícies de resposta e curvas de contorno do efeito do tempo de fermentação para a obtenção da massa celular de levedura e pH da mistura de reação na lise da levedura.....</i>	<i>115</i>
<i>Figuras 12i e 12j: Superfícies de resposta e curvas de contorno do efeito das condições de agitação para obtenção de massa celular de levedura e do pH da mistura de reação na lise da levedura.....</i>	<i>117</i>
<i>Figuras 12k e 12l: Superfícies de resposta e curvas de contorno do efeito do tempo de fermentação para a obtenção de massa celular de levedura e das condições de agitação para a obtenção da massa celular de levedura para a lise da levedura.....</i>	<i>119</i>
<i>Figura 13: Lise das suspensões de células de S. cerevisiae KL-88 utilizando-se a enzima β-1,3 glucanase de C. cartae n°191 e cisteína 1 mM.....</i>	<i>123</i>

QUADROS

<i>Quadro 1: Microrganismos produtores de enzimas líticas e indutores utilizados para a produção das enzimas líticas.....</i>	<i>13</i>
<i>Quadro 2: Sistemas enzimáticos líticos de microrganismos (ANDREWS e ASENJO,1987b).....</i>	<i>19</i>

TABELAS

<i>Tabela 1: Produção de protease, β-1,3 glucanase e quitinase pelas linhagens B1, B22, B26, FXX, Oerskovia sp. nº4 e Cellulomonas cartae nº191 em meio I contendo 1% de parede celular de levedura extraída mecanicamente em Dyno-Mill.....</i>	<i>54</i>
<i>Tabela 2: Produção de protease, β-1,3 glucanase e quitinase pelas linhagens B1, B22, B26, FXX, Oerskovia sp. nº4 e Cellulomonas cartae nº191 em meio I contendo 1% de levedura autoclavada, lavada e liofilizada.....</i>	<i>55</i>
<i>Tabela 3: Produção de protease, β-1,3 glucanase e quitinase pelas linhagens B1, B22, B26, FXX, Oerskovia sp. nº4 e Cellulomonas cartae nº191 em meio I contendo 1% de levedura seca instantânea.....</i>	<i>56</i>
<i>Tabela 4: Produção de protease, β-1,3 glucanase e quitinase pelas linhagens B1, B22, B26, FXX, Oerskovia sp. nº4 e Cellulomonas cartae nº191 em meio I contendo 1% de glucana insolúvel em meio alcalino.....</i>	<i>56</i>
<i>Tabela 5: Produção de protease, β-1,3 glucanase e quitinase pelas linhagens B1, B22, B26, FXX, Oerskovia sp. nº4 e Cellulomonas cartae nº191 em meio I contendo 1% de glicose.....</i>	<i>57</i>
<i>Tabela 6: Produção de protease, β-1,3 glucanase e quitinase pelas linhagens B1, B22, B26, FXX, Oerskovia sp. nº4 e Cellulomonas cartae nº191 em meio II contendo 8% de levedura seca instantânea.....</i>	<i>58</i>
<i>Tabela 7: Produção de protease, β-1,3 glucanase e quitinase pelas linhagens B1, B22, B26, FXX, Oerskovia sp. nº4 e Cellulomonas cartae nº191 em meio III contendo 1% de parede celular extraída mecanicamente em Dyno-Mill.....</i>	<i>59</i>
<i>Tabela 8: Produção de protease, β-1,3 glucanase e quitinase pelas linhagens B1, B22, B26, FXX, Oerskovia sp. nº4 e Cellulomonas cartae nº191 em meio IV contendo 1,5% de quitina neutralizada.....</i>	<i>61</i>
<i>Tabela 9: Produção de protease, β-1,3 glucanase e quitinase pelas linhagens B26 e Cellulomonas cartae nº191 em meio II contendo 8% de levedura seca instantânea.....</i>	<i>69</i>
<i>Tabela 10: Produção de protease, β-1,3 glucanase e quitinase pelas linhagens B1, B22, B26, FXX, Oerskovia sp. nº4 e Cellulomonas cartae nº191 em meio III contendo 1% de parede celular de levedura extraída mecanicamente em Dyno-Mill.....</i>	<i>70</i>

Tabela 11: Produção de protease, β -1,3 glucanase e quitinase pelas linhagens B1, B22, B26, FXX, <i>Oerskovia</i> sp.nº4 e <i>Cellulomonas cartae</i> nº191 em meio IV contendo 1,5% de quitina neutralizada.....	71
Tabela 12: Atividade de lise da levedura das preparações enzimáticas brutas de β -1,3 glucanase, protease e quitinase.....	72
Tabela 13: Unidades de atividade de protease, β -1,3 glucanase e quitinase das frações obtidas através de precipitação com sulfato de amônio.....	73
Tabela 14: Atividade de lise de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> KL-88 das preparações de β -1,3 glucanase, protease e quitinase obtidas por fracionamento com sulfato de amônio 60% de saturação.....	76
Tabela 15: Estudo da lise de <i>Kluyveromyces lodderi</i> , levedura de panificação Fleischmann, levedura de panificação Itaiquara, <i>Saccharomyces cerevisiae</i> KL-88, <i>S. diastaticus</i> NCYC 713, <i>Saccharomyces cerevisiae</i> NCYC 1001, <i>Candida glabrata</i> NCYC 388, <i>Kluyveromyces marxianus</i> NCYC 587 e <i>Hansenula mrakii</i> NCYC 500 utilizando preparações enzimáticas de β -1,3 glucanase da linhagem B1, protease e quitinase da linhagem <i>Cellulomonas cartae</i> nº 191.....	79
Tabela 16: Estudo da lise de <i>Kluyveromyces lodderi</i> , levedura de panificação Fleischmann, levedura de panificação Itaiquara, <i>Saccharomyces cerevisiae</i> KL-88, <i>Saccharomyces diastaticus</i> NCYC 713, <i>Saccharomyces cerevisiae</i> NCYC 1001, <i>Candida glabrata</i> NCYC 388, <i>Kluyveromyces marxianus</i> NCYC 587 e <i>Hansenula mrakii</i> NCYC 500 utilizando preparações enzimáticas de β -1,3 glucanase, protease e quitinase da linhagem <i>Cellulomonas cartae</i> nº 191.....	82
Tabela 17: Estudo da produção de β -1,3 glucanase, protease e quitinase pela linhagem <i>Cellulomonas cartae</i> nº191 em meio de cultura III em frascos agitados a 30°C.....	85
Tabela 18: Estudo da produção de β -1,3 glucanase, protease e quitinase pela linhagem <i>Cellulomonas cartae</i> nº191 em meio de cultura III em frascos agitados a 35°C.....	89
Tabela 19: Estudo da produção de protease, β -1,3 glucanase e quitinase pela linhagem <i>Cellulomonas cartae</i> nº191 em meio de cultura II em frascos agitados a 30°C.....	91
Tabela 20: Estudo da produção de protease, β -1,3 glucanase e quitinase pela linhagem <i>Cellulomonas cartae</i> nº191 em meio de cultura II em frascos agitados a 35°C.....	95

<i>Tabela 21: Estudo da produção de quitinase, β-1,3 glucanase e protease pela linhagem Cellulomonas cartae nº191 em meio de cultura IV em frascos agitados a 30°C.....</i>	<i>97</i>
<i>Tabela 22: Estudo da produção de quitinase, β -1,3 glucanase e protease pela linhagem Cellulomonas cartae nº191 em meio de cultura IV em frascos agitados a 35°C.....</i>	<i>101</i>
<i>Tabela 23: Valores reais ou decodificados utilizados no planejamento fatorial completo.....</i>	<i>102</i>
<i>Tabela 24: Planejamento experimental completo codificado do estudo da lise da levedura S. cerevisiae KL-88 utilizando a β-1,3 glucanase da linhagem C. cartae nº191.....</i>	<i>102</i>
<i>Tabela 25: Estimativa dos efeitos para a atividade lítica.....</i>	<i>104</i>
<i>Tabela 26: Resultados do coeficiente de regressão, desvio padrão e limites de confiança, provenientes do planejamento fatorial completo, para a atividade lítica.....</i>	<i>105</i>
<i>Tabela 27: Análise de variância para a atividade de liticase.....</i>	<i>105</i>
<i>Tabela 28: Estudo do efeito da cisteína e β-mercaptoetanol nas concentrações de 1, 10 e 100 mM, utilizando β-1,3 glucanase da linhagem C. cartae nº191 sobre a levedura S. cerevisiae KL-88.....</i>	<i>122</i>
<i>Tabela 29: Aplicação da β-1,3 glucanase da linhagem C. cartae nº191 na extração de invertase de S. cerevisiae KL-88 e no tratamento das células de levedura com ultrasonicador.....</i>	<i>126</i>
<i>Tabela 30: Aplicação da β-1,3 glucanase da linhagem C. cartae nº191 na extração de invertase de K. marxianus NCYC 587 e no tratamento das células de levedura com ultrasonicador.....</i>	<i>126</i>

RESUMO

O presente trabalho visou o estudo da produção de β -1,3 glucanases, proteases líticas e quitinases pelas linhagens B1, B22, B26, FXX, *Oerskovia* sp. n°4 e *Cellulomonas cartae* n°191 em meios de cultura contendo diferentes indutores e aplicação na lise de leveduras.

Entre as bactérias testadas as linhagens B26 e *Cellulomonas cartae* n°191 apresentaram maior produção de protease em meio de cultura II composto de 8% de levedura seca instantânea; as linhagens B1 e *C. cartae* n°191 apresentaram maior produção de β -1,3 glucanase em meio de cultura III contendo 1% de parede celular de levedura extraída mecanicamente em Dyno- Mill; e a linhagem *C. cartae* n°191 apresentou maior produção de quitinase em meio de cultivo IV contendo 1,5% de quitina neutralizada.

Os sobrenadantes dos meios de cultura obtidos da fermentação das linhagens B1 e *C. cartae* n°191 cultivadas em meio de cultivo III mostraram maior atividade de lise de levedura.

No estudo do fracionamento das enzimas líticas, a saturação do sobrenadante do meio de cultura com 60% de sulfato de amônio, foi adequada para a precipitação e obtenção de protease, β -1,3 glucanase e quitinase.

As preparações de β -1,3 glucanase das linhagens B1 e *C. cartae* n°191 obtidas do sobrenadante do meio de cultura através de fracionamento com sulfato de amônio, apresentaram atividade de lise das leveduras *Kluyveromyces lodderi*, *Saccharomyces cerevisiae* (levedura de panificação Fleischmann), *Saccharomyces cerevisiae* (levedura de panificação Itaiquara) e sobre as linhagens “killer” *Saccharomyces cerevisiae* KL-88, *Saccharomyces diastaticus* NCYC 713, *Saccharomyces cerevisiae* NCYC 1001, *Candida glabrata* NCYC 388, *Kluyveromyces marxianus* NCYC 587 e *Hansenula mrakii* NCYC 500. As linhagens *K. marxianus* NCYC 587 e *H. mrakii* NCYC 500 mostraram-se mais sensíveis à ação das β -1,3 glucanases e as linhagens de levedura Itaiquara e *C. glabrata* NCYC 388 mostraram-se mais resistentes à ação das β -1,3 glucanases, quando comparada com a susceptibilidade das células da linhagem de *S. cerevisiae* KL-88 à preparação enzimática.

A adição da preparação de quitinase, obtida do sobrenadante do meio de cultura através de fracionamento com sulfato de amônio, da linhagem *C. cartae* n°191, em alguns casos aumentou a susceptibilidade das leveduras à lise celular.

O pré-tratamento das suspensões das leveduras com as preparações de

protease obtidas dos sobrenadantes dos meios de culturas através de fracionamento com sulfato de amônio, da linhagem *C. cartae* n°191, diminuiu a lise da leveduras principalmente quando utilizada em altas concentrações.

A maior produção de β -1,3 glucanase da linhagem *C. cartae* n°191 em meio de cultura III ocorreu a 35°C após 48 horas de fermentação a 200 rpm, entretanto, atividade de β -1,3 glucanase muito próxima foi obtida na fermentação do microrganismo a 30°C durante 24 horas.

A maior produção de protease da linhagem *C. cartae* n°191 em meio de cultura II ocorreu a 35°C após 30 horas de fermentação a 150 rpm, enquanto que a maior produção de quitinase da linhagem *C. cartae* n°191 em meio de cultura IV ocorreu a 35°C após 72 horas de fermentação a 150 rpm.

No estudo das superfícies de respostas e das curvas de contorno referentes ao planejamento fatorial completo, foi obtido maior atividade de lise da levedura *S. cerevisiae* KL-88 utilizando-se a preparação enzimática de β -1,3 glucanase em pH 6,5 e a 35°C. As células de leveduras obtidas após 10 horas de fermentação em frascos sem agitação mostraram-se mais susceptíveis à lise pela β -1,3 glucanase de *C. cartae* n°191.

Foi obtido maior lise da levedura *S. cerevisiae* KL-88 quando a suspensão de células da levedura foi submetida ao tratamento com β -1,3 glucanase e cisteína 1mM.

A enzima invertase intracelular ou ligada à célula de *S. cerevisiae* KL-88 e *K. marxianus* NCYC 587 foi extraída após tratamento da suspensão celular de levedura com β -1,3 glucanase da linhagem *C. cartae* n°191.

O tratamento prévio das células de *S. cerevisiae* KL-88 e *K. marxianus* NCYC 587 com a enzima β -1,3 glucanase da linhagem *C. cartae* n°191, aumentou a susceptibilidade das células de levedura à lise com ultra-som.

ABSTRACT

The aim of this work was the study of β -1,3 glucanases, proteases and chitinases production by B1, B22, B26, FXX, *Oerskovia* sp. n°4 and *Cellulomonas cartae* n°191 strains in culture media containing different inductors as well as their application on yeast cell lysis.

The strains B26 and *Cellulomonas cartae* n°191 showed highest protease production using the culture medium II containing 8% of instant yeast. The strains B1 and *C. cartae* n°191 showed highest β -1,3 glucanase production using the culture medium III containing 1% of yeast cell wall obtained by Dyno-Mill. The strain *C. cartae* n°191 showed highest chitinase production using the culture medium IV containing 1.5% of chitin neutralized.

The culture medium III supernatants obtained by fermentation of strains B1 and *C. cartae* n°191 demonstrated the biggest yeast cell lysis activity.

The enzymes precipitation studies revealed that 60% ammonium sulphate was the best concentration for protease, β -1,3 glucanase and chitinase separation.

The β -1,3 glucanase extract obtained by B1 and *C. cartae* n°191 strains demonstrated lysis activity against *Kluyveromyces lodderi*, *Saccharomyces cerevisiae* (yeast Fleischmann), *Saccharomyces cerevisiae* (yeast Itaiquara), *Saccharomyces cerevisiae* KL-88, *Saccharomyces diastaticus* NCYC 713, *Saccharomyces cerevisiae* NCYC 1001, *Candida glabrata* NCYC 388, *Kluyveromyces marxianus* NCYC 587 and *Hansenula mrakii* NCYC 500. *K. marxianus* NCYC 587 and *H. mrakii* NCYC 500 were more sensitive to β -1,3 glucanases action, whereas Itaiquara yeast and *C. glabrata* NCYC 388 were more resistant when compared with *S. cerevisiae* KL-88 susceptibility.

The chitinase extract obtained by *C. cartae* n°191, in some cases increased the susceptibility of yeast to cellular lysis.

The previous treatment of the yeast suspensions with protease from *C. cartae* n°191, decreased the yeasts cell lysis, mainly when used at high concentrations.

The maximum β -1,3 glucanase production by *C. cartae* n°191, using culture medium III, occurred after 48 hours of fermentation at 35°C and 200 rpm. However, when the fermentation was performed after 24 hours of fermentation at 30°C and 200 rpm, the β -1,3 glucanase activity obtained was almost the same.

The maximum protease production by *C. cartae* n°191, using culture medium II, occurred after 30 hours of fermentation at 35°C and 150 rpm, while the highest

chitinase production by *C. cartae* n°191, using culture medium IV, occurred after 72 hours of fermentation at 35°C and 150 rpm.

The experimental design study showed that the best conditions to *S. cerevisiae* KL-88 lysis by β -1,3 glucanase extract were pH 6,5 and 35°C. This study also demonstrated that the yeast cells were more susceptible to lysis after 10 hours cultivation in flasks without agitation.

Lysis activity was increased when *S. cerevisiae* KL-88 cell suspension was treated β -1,3 glucanase and cystein 1mM.

The enzyme invertase of *S. cerevisiae* KL-88 and *K. marxianus* NCYC 587 was extracted after treatment of cell suspension with β -1,3 glucanase obtained from *C. cartae* n°191. The previous treatment of *S. cerevisiae* KL-88 and *K. marxianus* NCYC 587 with β -1,3 glucanase, increased the susceptibility to lysis when ultrasonic treatment was used.

1-INTRODUÇÃO

A parede celular da levedura *Saccharomyces cerevisiae* é formada por três componentes principais: glucana, um polímero de β -1,3 e β -1,6 glicose (48 - 60%), mananaproteínas (20 - 23%) e quitina, um polímero de β -1,4-N-acetilglicosamina (0,6-2,7%) (FLEET, 1985; HARTLAND *et al.* 1994; KLIS, 1994). A parede celular possui duas camadas principais: uma externa, composta de mananaproteínas e uma interna de glucana (ANDREWS & ASENJO, 1987 a,b).

Muitos microrganismos lisam a parede celular de leveduras. As enzimas envolvidas na lise de leveduras são β -1,3 glucanases, β -1,6 glucanases, mananases, proteases e quitinases. Essas enzimas atuam sinergicamente na lise da parede celular de leveduras. A protease lítica hidrolisa a camada externa de mananaproteína, a β -1,3 glucanase degrada a camada interna de β -1,3 glucana e a quitinase hidrolisa a quitina liberando unidades de N-acetilglicosamina. Algumas preparações enzimáticas devem conter proteases líticas e β -1,3 glucanases para a lise de leveduras (SCOTT & SCHEKMAN, 1980; ZLOTNIK *et al.*, 1984; ASENJO *et al.*, 1985); enquanto que algumas preparações de β -1,3 glucanases são capazes de lisar células viáveis de leveduras (FERRO, 2002; SOARES, 2002).

As enzimas que lisam a parede celular de leveduras tem aplicações biotecnológicas na preparação de protoplastos para melhoramento genético de leveduras e no aproveitamento de massa celular de levedura para extração de proteínas, enzimas e pigmentos. A lise enzimática de células de microrganismos também tem potencial de aplicação no tratamento de massa celular de levedura residual de indústrias de fermentação para a preparação de ração animal, na obtenção de carboidratos funcionais da parede celular como a glucana e no pré-tratamento para a ruptura mecânica de células aumentando a eficiência e reduzindo o requerimento de energia (HUNTER & ASENJO, 1988).

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

mecanismo da síntese da parede celular para controle de leveduras patogênicas.

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

2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1- Composição da parede celular de leveduras.

A parede celular de leveduras tem muitas funções: proteção física, estabilidade osmótica, suporte de enzimas, adesão célula/célula e barreira de permeabilidade seletiva (STRATFORT,1994). Além disso promove rigidez e o transporte de nutrientes para o citoplasma proporcionando a integridade, o metabolismo e o crescimento celular (CABIB *et al.*,1997).

A parede celular constitui cerca de 15 a 25% do peso seco da célula. A parede celular de leveduras não é uma estrutura estática e sim uma estrutura em constante crescimento e mudança. Os componentes da parede celular são sintetizados e unidos entre si; e estruturas especializadas, como os séptos são formados em sincronia com o crescimento e divisão celular (CABIB *et al.*,1997).

A parede celular de leveduras é formada por uma camada de mananaproteína que sobrepõe a camada de glucana, o que explicaria a resistência das células vivas de leveduras ao ataque das misturas enzimáticas elaboradas por alguns microrganismos (BACON *et al.*,1969; ANDREWS & ASENJO,1987 a e b).

A parede celular de *Saccharomyces* sp. é formada por três componentes principais: glucana, um polímero de β -1,3 e β -1,6 glicose (48-60%), mananaproteínas (20-23%) e quitina, um polímero de β -1,4 N-acetilglucosamina (0,6-2,7%) (FLEET 1985; HARTLAND *et al.* 1994; KLIS, 1994). As mananaproteínas estão localizadas na parte externa da parede celular e são compostas por polímero de manose com ligações α -1,2, α -1,3 e α -1,6 que estão covalentemente ligadas a peptídeos formando glicopeptídeos (LAMPEN,1968; YAMAMOTO & NAGASAKI, 1975; KAPTEYN *et al.*,1999 a).

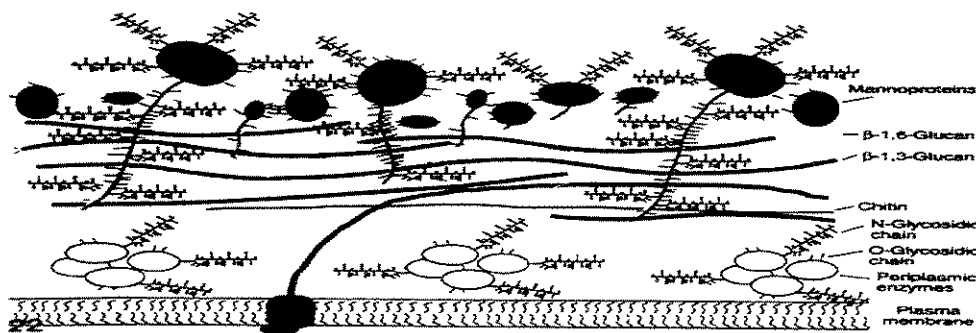


Figura 1: Ilustração da composição e estrutura da parede celular de *Saccharomyces cerevisiae* (KLIS, 1994).

KAPTEYN *et al.* (1999), POPOLO & VAI (1999) e KAPTEYN *et al.* (2000) relataram que a parede celular de leveduras apresenta quatro classes de macromoléculas (proteínas de parede celular, β -1,6 glucanas, β -1,3 glucanas e quitinas) que estão interconectadas por ligações covalentes. Como citado por CABIB *et al.* (1997), os autores acima afirmaram que a parede celular não apresenta composição molecular fixa e que é uma estrutura dinâmica ajustável durante o ciclo celular e em resposta às condições de desenvolvimento.

2.1.1- Mananaproteínas.

A camada de mananaproteínas tem a função de proteger a célula contra injúrias externas e é responsável pela porosidade da parede celular, enquanto que a camada de glucana é responsável pela estrutura da parede celular perante choques mecânicos e desequilíbrio osmótico (ZLOTNIK *et al.*, 1984; CABIB *et al.*, 1997).

As mananaproteínas de baixo peso molecular são O-glicosiladas, enquanto que, as de alto peso molecular são geralmente N-glicosiladas e susceptíveis à ação de glucanases (STRATFORD, 1994).

VAN DER VAART *et al.* (1995) dividiram as mananaproteínas em dois grupos: as mananaproteínas que podem ser extraídas por sódio dodecil sulfato (SDS) e as que podem ser extraídas por ação das glucanases, que são solubilizadas pela digestão da camada de glucana. Duas dessas proteínas, α -aglutinina e a-aglutinina

estão envolvidas na agregação sexual e uma terceira, está envolvida na floculação. As proteínas extraídas pela glucanase estão provavelmente ligadas covalentemente a glucana.

CABIB *et al.* (1997) sugeriram a existência de ligações cruzadas entre polissacarídeos e mananaproteínas e que a β -1,3 glucana e quitina estão conectadas por uma ligação β -1,4 entre um grupo redutor final de N-acetilglicosamina da quitina e um grupo não redutor da glicose da glucana. Os autores verificaram também a presença de um núcleo central de mananaproteína, em que a quitina e a β -1,3 glucana estão conectadas preferencialmente a cadeias curtas de β -1,6 glucanas. Há evidências que as mananaproteínas estão retidas na parede celular por ligações indiretas com as β -1,3 glucanas, e estas ligadas preferencialmente a cadeias curtas de β -1,6 glucanas e provavelmente porções residuais de glicosilfosfatidilinositol.

KAPTEYN *et al.* (1999a) identificaram dois tipos de proteínas da parede celular (CWPs) que contribuem para a organização da parede celular das leveduras. As proteínas foram denominadas GPI-CWPs e Pir-CWPs e estavam covalentemente ligadas à β -glucana. A proteína GPI era formada em blocos sendo as estruturas essenciais GPI-CWP $\Rightarrow$ β -1,6 glucana $\Rightarrow$ β -1,3 glucana, as quais podiam ser prolongadas por uma ou mais cadeias de quitina. A estrutura provável da proteína Pir era Pir-CWP $\Rightarrow$ β -1,3 glucana, as quais também podiam ser prolongadas por uma ou mais cadeias de quitina.

Segundo MRSA *et al.* (1999a) a parede celular de *Saccharomyces* contém mais de 20 tipos de mananaproteínas que desempenham papéis diferentes na construção, preservação, modificação da parede celular e na interação das células com suas adjacências como por exemplo as interações intercelulares durante a aglutinação ou floculação. As mananaproteínas podem ser divididas em três grupos: proteínas unidas por ligações não covalentes com polissacarídeos estruturais da parede, relacionadas, na sua maioria, com as atividades enzimáticas; proteínas ligadas covalentemente principalmente às β -glucanas e que podem ser liberadas da

parede por ação das glucanases; e as proteínas que podem ser extraídas com NaOH 30 mM, cujas ligações são desconhecidas.

2.1.2- β -1,3 glucana

Em 1966, FLEMING *et al.*, estudaram a camada de glucana da parede celular de leveduras de panificação e, verificaram que o comprimento das cadeias não ramificadas de resíduos de glicose tem um efeito marcante na solubilidade das β -1,3 glucanas.

MANNERS *et al.* (1973) descreveram a β -1,3 glucana insolúvel em álcali, com 3 – 6% de ramificações β -1,6, como o principal componente estrutural da parede celular de leveduras. Estudos microscópicos mostraram a agregação destas microfibras na parte interna da parede celular. A glucana solúvel em álcali tem estrutura química semelhante à insolúvel, entretanto, apresenta maior número de ramificações β -1,6. A glucana álcali-solúvel representa aproximadamente 20% da parede celular e a análise estrutural revelou a presença de 80 – 85% de ligações β -D-1,3; 8 – 12% de ligações β -D-1,6 e 3 – 4% de resíduos de ramificações ligados por C-1, C-3 e C-6.

KOPECKÁ *et al.* (1974) estudaram a ultraestrutura da parede celular de isolados de *S. cerevisiae* durante a fase exponencial e estacionária de crescimento. Através da ação de β -1,3 glucanases os autores obtiveram duas importantes informações: as regiões de brotamento de leveduras são estruturas resistentes ao efeito dessa enzima; os componentes fibrilares das leveduras são constituídos de glucanas com ligações β -1,3, uma vez que as microfibrilas desapareceram após tratamento com β -1,3 glucanase. Os autores então, relataram que as moléculas de glucana permitem a associação das cadeias mais afastadas de polissacarídeos com outras moléculas de ramificações superficiais, dando origem a um componente fibrilar contínuo.

Através de estudos da parede celular de leveduras com a utilização de microscópio eletrônico, KREGER & KOPECKÁ (1976) confirmaram a posição interna da fração de glucana. No mesmo ano, FLEET & MANNERS relataram que a parede celular de *S. carlsbergensis* continha aproximadamente 20% de glucana alcalina insolúvel, sendo que sua maioria continha ligações β -1,3 D.

Segundo HINTON & PRESSEY 1980, as glucanas podem ser encontradas em microrganismos e plantas superiores como principais constituintes da parede celular, como material citoplasmático ou de reserva vacuolar e como substâncias extracelulares. As glucanas são polímeros não cíclicos de anidroglicose unidos por ligações β -1,3 glucosídicas contendo ramificações β -1,6, as quais pertencem a uma das classes mais abundantes de polissacarídeos.

A parede celular de *Saccharomyces cerevisiae* contém duas frações de β -1,3 glucana (uma solúvel em álcali e outra insolúvel) e uma fração de β -1,6 glucana com poucas ligações β -1,3 (insolúvel em álcali e solúvel em soluções diluídas de ácido). As β -1,3 glucanas têm tamanho estimado de 1.500 resíduos de glicose; enquanto que as β -1,6 glucanas são menores apresentando 150 a 200 resíduos (STRATFORD, 1994). Muitos estudos têm mostrado que estes componentes, depois de serem depositados na parede, são rearranjados para formarem um complexo integrado. Os rearranjos podem ocorrer através de glicosiltransferases as quais introduzem ramificações nos polissacarídeos lineares. Há evidências de ligações entre mananaproteínas e quitina. A insolubilidade da glucana em álcali é explicada pela presença de ligações covalentes entre glucana e quitina, uma vez que a degradação da quitina por quitinase dissolve completamente a glucana em álcali. Foi demonstrado que ocorre a formação de ligação α -1,6 glicosídica entre a glucana e quitina na parede celular de *Candida albicans* mas em *Saccharomyces cerevisiae* a natureza da ligação é desconhecida (HARTLAND *et al.*, 1994).

A parede da levedura *Saccharomyces cerevisiae* apresenta como principais componentes as β -glucanas, sendo que as β -1,3 glucanas representam 40% do peso

seco da parede e as β -1,6 glucanas, 10%. Outro componente principal da parede celular são as mananaproteínas que são responsáveis pelos outros 40% de peso seco e parecem controlar a permeabilidade. Há ainda uma pequena quantidade de quitina, encontrada na sua maioria, no septo primário. Foi sugerido que polissacarídeos e mananaproteínas estão interligados por ligações cruzadas e que a β -1,3 glucana e quitina estão conectadas por uma ligação β -1,4 entre um grupo redutor final de N-acetilglicosamina da quitina e um grupo não redutor da glicose da glucana. Um outro complexo estudado apresenta um núcleo central de mananaproteína, em que a quitina e a β -1,3 glucana estão conectadas preferencialmente a cadeias curtas de β -1,6 glucanas. Há evidências de que as mananaproteínas estão retidas na parede celular por ligações indiretas com as β -1,3 glucanas e estas ligadas preferencialmente a cadeias curtas de β -1,6 glucanas e provavelmente a porções residuais de glicosilfosfatidilinositol (CABIB *et al.*, 1997).

Através da utilização de um microscópio eletrônico de varredura e um microscópio eletrônico de transmissão, OSUMI (1998) estudou e observou a ultraestrutura e a formação da parede celular de *Candida albicans*. A autora verificou que os protoplastos da levedura que foram regenerados pela síntese das microfibrilas da superfície apresentaram uma imensa rede de longas fibrilas. Esta estrutura microfibrilar era formada de cadeias de β -1,3 glucana que foram quebradas após tratamento com β -1,3 glucanase.

Segundo SANDULA *et al.* (1999), a glucana solúvel em água apresenta pouca estrutura ramificada com uma razão de unidades de glicose nas cadeias laterais e na parte terminal de 1:8. Utilizando tratamento ultrasônico e subsequente derivatização química, derivados solúveis em água (carboximetil e sulfoetil) da glucana de leveduras foram obtidos com alto rendimento.

As mananaproteínas localizadas na camada mais externa da parede celular de leveduras determinam a porosidade da parede, e por isso, regulam a ligação entre as proteínas do espaço periplasmático e macromoléculas do meio ambiente. Em muitas

leveduras, incluindo *S. cerevisiae*, a porção glucana das mananaproteínas não é composta somente de oligossacarídeos neutros contendo manose e N-acetilglicosamina, mas também oligossacarídeos ácidos contendo manosilfosfato. Esses resíduos conferem carga negativa na parede celular, mudando as propriedades e o meio ambiente da superfície da célula (JIGAMI & ODAMI,1999).

Segundo FUJII *et al.* (1999), Tip1p é um dos principais componentes protéicos da camada de mananaproteínas da parede celular de *S. cerevisiae*. Os autores sugerem que o Tip1p funciona como uma âncora entre os resíduos de glicosilfosfatidilinositol e a camada de glucana.

POPOLO & VAI (1999) isolaram diversas glicoproteínas denominadas Gas 1p homólogas das glicoproteínas de espécies de *Candida* e *S. pombe*. Segundo esses autores, Gas 1p, uma glicoproteína apoiada na parte externa da membrana plasmática através de resíduos de glicosilfosfatidilinositol, executa papel chave na junção da parede celular. A ausência de Gas 1p leva a vários defeitos morfogênicos e há um decréscimo da função da ligação cruzada entre as glucanas da parede celular. Análises genéticas e moleculares sugerem que a Gas 1p poderia executar a função de um polímero de ligação cruzada, provavelmente por catalisar reações de transglicosilação.

ALEXANDRE *et al.* (2000) estudaram a parede celular de leveduras formadoras de películas e a parede celular de leveduras não formadoras de películas através de tratamento com β -1,3 glucanase. Os pesquisadores identificaram na parede celular de leveduras formadoras de película a mananaproteína 49 kDa de característica hidrofóbica. Como a hidrofobicidade da superfície celular desempenha um papel importante na formação de agregados, é provável que a mananaproteína esteja envolvida na formação da película.

ARVINDEKAR & PATIL (2002) utilizaram a β -1,3 glucanase no estudo da parede celular de leveduras. Os autores verificaram a presença de glicogênio covalentemente ligado à parede celular de *S. cerevisiae*. O glicogênio foi classificado em dois grupos; um solúvel e intracelular e outro presente na parede

celular e insolúvel em água devido à sua ligação covalente com a Q-glucana. A ligação entre o glicogênio e a β -1,3 glucana seria estabelecida através de ligações glicosídicas β -1,6. A presença do glicogênio na parede celular da levedura foi confirmada pelo controle da ação enzimática no α - β -glucano usando liticase proveniente de *Arthobacter luteus* sem ruptura da membrana plasmática.

2.1.3- Quitina

Na maioria dos fungos, a quitina (um polímero de N-acetilglicosamina com ligações β -1,4) é o maior componente estrutural da parede celular, sendo portanto susceptível a inúmeras espécies de bactérias, actinomicetos e fungos que podem agir como antagonistas devido a produção de enzimas quitinolíticas (SAHAI,1993).

Em leveduras, a quitina é encontrada predominantemente em septos primários e em volta do círculo de constrição entre a célula mãe e a jovem. Cerca de 90% da quitina está localizada na cicatriz de brotamento e o restante na parede celular (HARTLAND *et al.*,1994).

A composição e estrutura da parede celular sofrem ajustes consideráveis durante o ciclo celular e em resposta às condições ambientais como nutrientes, disponibilidade de O₂, temperatura e pH. A parede celular também apresenta um mecanismo de reparação quando a célula é danificada (KAPTEYN *et al.*, 1999b).

2.2- Microrganismos produtores de enzimas líticas.

As enzimas líticas começaram a se destacar na década de sessenta, quando muitas bactérias apresentaram resistência a lisozima, que na época era utilizada para a elucidação da estrutura química da parede celular desses microrganismos. Em 1968, WARD & PERKINS sugeriram que para a investigação da parede celular e dos componentes intracelulares das bactérias resistentes a lisozima, havia a necessidade do isolamento de enzimas mais apropriadas.

YOSHIMOTO & TSURU (1972) isolaram *Streptomyces griseus* com capacidade de lisar as células de *Staphylococcus aureus*. A preparação enzimática

bruta produzida por *S. griseus* apresentou aparentemente uma alta atividade lítica sobre as células intactas da bactéria. Foram, então, isoladas e purificadas dois tipos de enzimas (F1 e F2) presentes no caldo de cultura da cepa *S. griseus* S-35 que lisam *Staphylococcus aureus*. A atividade enzimática isolada de cada enzima foi baixa, indicando que a lise foi dependente do sinergismo de ambas enzimas.

Muitos microrganismos, como bactérias fungos e leveduras são capazes de produzir enzimas líticas. A maioria deles necessitam da presença de indutores para a síntese de enzimas de interesse.

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

Referências Bibliográficas	Microrganismo lítico	Fonte de carbono (indutor)	Enzima(s) produzida(s)
BACON <i>et al</i> (1970)	<i>Cytophaga johnsonii</i>	Parede celular de levedura de panificação .	β -1,3 glucanase e β -1,6 glucanase
KITAMURA & YAMAMOTO (1972)	<i>Arthrobacter citreus</i>		β -1,3 glucanase
YAMAMOTO & NAGASAKI (1975)	<i>Rhizopus chinensis</i> R-69	Células de leveduras de panificação ou farelo.	Endo e exo β -1,3 glucanase
SCOTT & SCHEKMAN (1980)	<i>Oerskovia xanthineolytica</i>	Glucana insolúvel em meio alcalino, levedura autoclavada e glicose.	β -1,3 glucanase e protease alcalina
HAYASHI <i>et al</i> (1981 a e b)	<i>Streptomyces rutgersensis</i> H-46	Glicose e extrato de soja.	Enzimas bacteriolíticas
ASENJO <i>et al</i> (1985)	<i>Oerskovia sp</i>	Glucana e parede celular de leveduras.	β -1,3 glucanase
PITSON (1997 a e b)	Várias espécies de <i>Acremonium</i> e <i>Cephalosporium</i>	Glicose e laminarina ou pustulana.	β -1,3 glucanase
BURTSEVA (2000)	<i>Chaetomium indicum</i>		β -1,3 glucanase
NORONHA (2000)	<i>Trichoderma harzianum</i>	Parede celular purificada. Quitina, quitosana, N-acetilglicosamina e laminarina.	3 isoformas de β -1,3 glucanase. 1 isoforma de β -1,3 glucanase.
EL- KATANY <i>et al</i> (2001)	<i>Trichoderma harzianum</i> Rifai T24		Quitinase e endo β -1,3 glucanase.

Em 1975, YOSHIMOTO *et al.* isolaram do solo, linhagens de *Streptomyces* sp. P51 capazes de produzir enzimas líticas extracelulares com atividade sobre células de *Pseudomonas* IFO 3448. Essas enzimas agiram sobre bactérias gram-positivas, como por exemplo *Micrococcus lysodeikticus* e *Bacillus subtilis*, e permaneceram inertes sobre bactérias gram-negativas.

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

2.3- Microrganismos que lisam a parede celular de leveduras.

Muitos microrganismos produzem enzimas β -1,3 glucanases e proteases que lisam a parede celular de leveduras. As bactérias *Cytophaga johnsonii* (BACON *et al.*, 1970), *Arthrobacter luteus* (DOI *et al.*, 1973), *Flavobacterium dormitator* var. *glucanolyticae* (NAGASAKI *et al.*, 1976), *Oerskovia* sp. CK (OBATA *et al.*, 1977 a e b), *Rarobacter faecitabidus* (YAMAMOTO *et al.*, 1988), *Rarobacter incanus* (YAMAMOTO *et al.*, 1993b), *Cellulomonas cartae* n°191 (SANTOS & SATO, 1999) produzem enzimas β -1,3 glucanases, proteases líticas e quitinases capazes de lisar células de leveduras. Estes microrganismos têm sido isolados a partir de lodo ativado de sistemas de tratamento de água de indústrias de alimentos e bebidas alcoólicas (HASUO *et al.*, 1984).

BACON *et al.* em 1970, relataram que o microrganismo *Cytophaga johnsonii* produziu enzimas capazes de lisar células de leveduras pré-tratadas com tiol, na presença de indutor. Neste estudo foram testadas células autoclavadas ou tratadas com álcali, parede celular e glucana de levedura como indutores para a produção dessas enzimas líticas. A purificação do sobrenadante da cultura através de cromatografia em coluna, mostrou a presença de dois tipos de endo- β -1,3 glucanases e muitas β -1,6 glucanases.

KITAMURA & YAMAMOTO (1972) relataram que o microrganismo *Arthrobacter luteus*, isolado de resíduos de cervejarias, cresceu em meio contendo

células de levedura ou β -1,3 glucana e produziu enzimas com atividade de lise de leveduras. O conjunto destas enzimas foi denominado Zymolyase e requeria polímeros lineares de glicose com ligações β -1,3 como substrato específico. Os autores verificaram que o polissacarídeo termo-tratado pachymana e a glucana de levedura foram hidrolisados por Zymolyase à unidades de laminaripentaose.

Os microrganismos do gênero *Arthrobacter* produzem dois tipos de β -1,3 glucanase. A glucanase I causa lise em células jovens na presença de β -mercaptoetanol e 0,6 M de KCl como estabilizador osmótico. A glucanase II é similar à encontrada em fluido de cultura de *Bacillus circulans*. Na dissolução da parede celular de leveduras por glucanase I, a enzima ataca a glucana liberando fragmentos de vários tamanhos que servem como substratos para a glucanase II. As β -glucanases são estáveis em ampla faixa de pH, mas perdem rapidamente a atividade em temperaturas acima de 60°C; apresentam pH ótimo de atividade na faixa de 5,5 a 6,5 (DOI *et al.*, 1973).

A bactéria *Flavobacterium dormitator* var. *glucanolyticae* também produz uma endo β -1,3 glucanase capaz de lisar células de leveduras, liberando pequenos oligossacarídeos. Esta enzima prefere grandes cadeias de sacarídeos como substrato para sua ação, entretanto, pequenos oligossacarídeos como laminaritriose, também são decompostos por ela. A endo β -glucanase é inativada ou tem atividade restrita em células viáveis de leveduras (NAGASAKI *et al.*, 1976).

O microrganismo *Oerskovia* sp. CK produz três tipos de enzimas designadas F-L, F-0 e F-2 que estão envolvidas na lise da parede celular de leveduras. A enzima F-L, mostrou alta atividade lítica em células viáveis de levedura, mas fraca atividade sobre a glucana de levedura. As enzimas F-0 e F-2 mostraram baixa ou nenhuma atividade lítica, mas alta atividade de β -1,3 glucanase. Os resultados evidenciaram que as enzimas F-0 e F-2 não são eficientes na lise de leveduras devido 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 de F-0 e F-2 à camada de glucana, possibilitando a lise da célula. Foi observado efeito sinérgico entre as enzimas F-L e F-0 ou F-L e F-2. A protease F-L produzida por *Oerskovia* sp. CK possui alto efeito sinérgico com a enzima β -1,3 glucanase na lise de leveduras (OBATA *et al.*, 1977b).

ROWLEY & BULL em 1977, estudaram uma linhagem de *Arthrobacter* com alta capacidade para lisar células vivas de *Saccharomyces fragilis*. O complexo enzimático extracelular produzido pelo microrganismo continha β -1,3 glucanase, mananase, manohidrolase e atividade proteolítica. A produção enzimática em meio de cultura não foi somente dependente do crescimento celular mas também foi influenciada pelo aumento do substrato limitante. A produção de protease e a atividade lítica foram estudadas em batelada e em meio de cultura contendo leveduras como substrato limitante. A taxa de crescimento máximo específico de *Arthrobacter* nestas condições foi de $0,22 \text{ hr}^{-1}$. As atividades de β -1,3 glucanase e protease foram obtidas na fase de crescimento exponencial do microrganismo, mas o máximo da atividade lítica não foi desenvolvido até o declínio da taxa de crescimento específico, neste momento a síntese de mananase foi induzida.

A Zymolyase, preparação comercial para lise da parede celular de leveduras, é obtida a partir *Arthrobacter luteus*. Esse microrganismo foi reclassificado como *Oerskovia xanthineolytica* (LECHEVALIER & LECHEVALIER, 1986). A Zymolyase é uma preparação enzimática, composta de duas frações: a Zymolyase A, que é uma β -1,3 glucanase e a Zymolyase B, que é uma protease alcalina e provavelmente também uma serina protease. A β -1,3 glucanase (Zymolyase A) não diminui a turbidez nem o número de células de uma suspensão de leveduras. A protease (Zymolyase B) diminui a turbidez, mas não altera o número de células da suspensão. No entanto, a ação cooperada de Zymolyase A e B tem como efeito alta atividade lítica, lisando completamente as células de leveduras. Mas isso só ocorre quando primeiro age a Zymolyase B e depois a Zymolyase A. Esta última pode lisar as células, mas somente quando são pré-tratadas com 2-mercaptoetanol, isto porque tanto a Zymolyase B quanto 2-mercaptoetanol têm função de destruir a barreira

superficial que impede a atuação da β -1,3 glucanase, impossibilitando seu acesso à estrutura da β -glucana da parede. O 2-mercaptoetanol destrói a barreira rompendo as pontes de dissulfeto das proteínas da parede celular (KITAMURA, 1982a).

KITAMURA (1982b) obteve aumento do rendimento da enzima lítica de *Arthrobacter luteus* em cultura em condições otimizadas; as bactérias apresentaram produtividade 14 vezes maior em meio otimizado do que em meio original. O meio otimizado era constituído de 4% de levedura seca; 0,05% de cevada germinada; 0,2% de NH_2NO_3 ; 1% de K_2HPO_4 ; 0,1% de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,5% de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; pH 10,0. O mutante M13-203 obtido por tratamento químico com N-metil N'-nitro-N-nitrosoguanidina apresentou 2,6 vezes mais atividade no meio otimizado do que a parental B111-1 e produziu a mesma atividade em meio sem indutor do que a parental na presença do indutor; esta produtividade foi aumentada pela adição de frutose ou sorbose juntamente com a CM-pachymana. A produtividade da enzima foi fortemente aumentada com a presença da cetohexose e da CM-pachymana, isso porque o mecanismo de indução da enzima lítica era afetado pelas duas, independentemente.

KOBAYASHI *et al.* (1982) estabeleceram um método para produção e preparação de um complexo enzimático que degrada parede celular de leveduras produzido por espécies de *Rhizoctonia*, em escala comercial. A produção da enzima bruta em pó, com uma atividade lítica de 100 unidades/mg, em batelada de 80 Kg mostrou-se viável. Esta preparação enzimática foi avaliada para uso industrial.

YAMAMOTO *et al.* (1984) isolaram microrganismos que lisam leveduras (YLM - yeast lysing microorganisms) a partir do 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 nutriente normal pertenciam aos gêneros: *Streptomyces* sp., *Oerskovia* sp. e *Bacillus* sp.

Tratamentos com compostos tiol, como 2-mercaptoetanol ou cisteína, promovem o aumento na susceptibilidade das células de levedura à lise enzimática.

E as condições de cultura da levedura também influenciam na sua susceptibilidade à lise celular (KANEKO *et al.*, 1973).

A bactéria *Rhizoctonia solani* produz enzimas líticas capazes de lisar a parede celular de leveduras. As enzimas foram separadas em quatro frações: L-1, L-2, L-3 e L-4. Três delas foram consideradas β -1,3 glucanases líticas. A fração L-3 mostrou alta atividade de protease. A protease purificada L-3 sozinha, assim como as outras β -1,3 glucanases líticas foram capazes de lisar células intactas e parede celular isolada de *S. cerevisiae*. A separação completa da protease lítica de *Rhizoctonia solani* não foi importante apenas para esclarecer a ação hidrolítica da parede celular de levedura, mas também para elucidar a estrutura da parede (USUI & OGUCHI, 1986).

ANDREWS & ASENJO (1987a) verificaram que as enzimas β -1,3 glucanase e protease do sistema lítico da bactéria *Oerskovia xanthineolytica* LL-G109 são capazes de lisar e romper totalmente as células de leveduras. Esta bactéria apresentou taxa de glucanase-protease maior que a de outras cepas. Quando cultivada em sistema contínuo, a bactéria *Oerskovia xanthineolytica* apresentou produtividade e concentração de enzimas maiores do que quando cultivada em batelada. O sistema de enzimas líticas está sujeito a repressão catabólica pela glicose e mostrou-se induzível pela glucana da levedura. Na fermentação da linhagem *Oerskovia* sp. em cultura contínua, a glicose pode ser utilizada como meio de crescimento com concentração relativamente baixa do indutor.

YAMAMOTO *et al.* (1987) isolaram trinta e seis linhagens de bactérias que lisam leveduras (YLM) de lodo ativado de resíduos de tratamento de água. Estes microrganismos aderiram-se às células viáveis de todas as espécies de *Saccharomyces* e *Hansenula* e algumas espécies de *Candida*, aglutinaram-se com as leveduras e as lisaram. Esses microrganismos não aderiram ou lisaram células viáveis de *Rhodotorula*, *Cryptococcus* e *Trichosporon*.

Quadro 2: Sistemas enzimáticos líticos de microrganismos (ANDREWS e ASENJO, 1987b).

Microrganismos Líticos	Enzimas	pH Ótimo	Temperatura Ótima °C	Microrganismos Lisados
<i>Arthrobacter luteus/ Oerskovia xanthineolytica</i> (Zymolyase) Scott e Scheckman, (1980), Vrsanská <i>et al.</i> (1977 a,b)	β -1,3 glucanase	5,0-6,5	45-60	<i>Saccharomyces sp.</i> , <i>Candida sp.</i> , <i>Hansenula sp.</i> , <i>Pichia sp.</i> e outras leveduras
	Protease	9,0-10,0	35	
	Atividade na célula de levedura integral	7,5	30-35	
<i>Arthrobacter sp.</i> G1 Rowley e Bull (1977)				<i>Saccharomyces fragilis</i> NCYC 587, <i>Torulopsis colliculosa</i> NCYC 141, <i>Candida utilis</i> NCYC 707
<i>Cellomonas cartae</i> 191 Santos (2000)	β -1,3 glucanase	4,5	55	<i>Kluyveromyces marxianus</i> NCYC587, <i>Pachysolen tannophilus</i> NRRL 2460, <i>Saccharomyces capensis</i> NCYC 761, <i>S.cerevisiae</i> KL88, <i>Candida glabrata</i> NCYC 388, <i>Debaryomyces vanrii</i> NCYC 577
	Protease	8,0	50	
	Atividade na célula de levedura integral	pH 7,0 - 7,5	30-35	
<i>Cytophaga</i> NCIB 9497 Andrews e Asenjo (1985)	Atividade na célula de levedura integral	9,0	45-55	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Bacillus sp.</i> , <i>Corynebacteria.</i> , <i>E.coli</i>
<i>Flavobacterium dormitator</i> var. <i>glucanolyticae</i> Nagasaki <i>et al.</i> (1976)	β -1,3 glucanase	6,0	50	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>Oerskovia</i> CK Obata <i>et al.</i> (1977 a e b)	β -1,3 glucanase		35-40	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
	Protease		60	
	Atividade na célula de levedura integral	9,0	35-40	
<i>Rhizoctonia sp.</i> Kobayashi, <i>et al.</i> (1982)	β -1,3 glucanase	5,5	55-60	<i>Candida sp.</i> , <i>Sacchromyces sp.</i> , <i>Hansenula sp.</i>
	Protease	6,5	40	
	Atividade na célula de levedura integral	6,0	40	
<i>Streptomyces sp.</i> 1228 Bielecki <i>et al.</i> (1989)	β -1,3 glucanase	5,5-6,0	50-55	<i>Candida utilis</i> , <i>Saccharomyces carlsbengensis</i> , <i>Schizosaccharomyces pombe</i>

RYAN & WARD (1988) verificaram que a enzima β -1,3 glucanase de *Basidiomycete apylophoroles* possui alta atividade lítica em leveduras. Quando usada em combinação com papaína na lise de leveduras, 90 a 95% do peso seco das leveduras foi solubilizado. Em comparação com estudos envolvendo três β -1,3 glucanases, a atividade de laminarinase não foi bem correlacionada com a atividade lítica em leveduras. O mecanismo da β -1,3 glucanase do *B. apylophoroles* em glucana isolada de levedura foi caracterizado pela alta taxa de produção de laminaribiose.

SHIMOI *et al.* (1991b) purificaram enzimas líticas produzidas por *Rarobacter faecitabidus*, uma bactéria capaz de lisar células de leveduras isolada de sistema de tratamento de água. As enzimas consistiram de uma β -1,3 glucanase e duas proteases. O peso molecular das duas proteases e da β -1,3 glucanase foram estimados em 35.000, 33.000 e 82.000 Da, respectivamente, por eletroforese em gel poliacrilamida SDS. As duas proteases eram serinas proteases e foram inibidas por diisopropilfluorofosfato. As proteases apresentaram maior atividade em pH alcalino. Estas proteases podem reduzir a turbidez de suspensões de levedura. Por este tratamento, quase todas as células testadas perderam sua viabilidade, enquanto que o número de células de leveduras não diminuiu sob observação ao microscópio. A β -1,3 glucanase apresentou maior atividade a pH 5,0. Esta enzima sozinha não diminuiu a turbidez da suspensão de leveduras nem afetou a viabilidade das células, mas a β -1,3 glucanase combinada com as duas proteases lisaram as células de levedura completamente.

VENTOM & ASENJO em 1991, estudaram as características bioquímicas da β -1,3 glucanase excretada por *Oerskovia xanthineolytica* LL-G109. A enzima apresentou pH ótimo de atividade em pH 6,0 usando substrato laminarina e em pH 8,0 em ensaios com glucana de levedura. O peso molecular da enzima foi estimado em 12.000 Da através de filtração em gel. O K_m para a reação de glucanase com

laminarina foi menor (0,95 mg/ml) do que com glucana de levedura (2,5 mg/ml). As duas proteases líticas produzidas pelo microrganismo mostraram pH ótimo de atividade em pH 9,5 a 10,0, mas diferentes termoestabilidades. A β -1,3 glucanase purificada mostrou atividade lítica limitada em levedura, mas foi estimulada duas e cinco vezes, respectivamente pelas duas proteases.

YAMAMOTO *et al.* (1993) isolaram no Brasil, linhagens de bactérias que lisam leveduras a partir de amostras de solo, flores, frutos e outras fontes. Destas linhagens 46 foram identificadas como *Rarobacter* que se aglutinaram com *S. cerevisiae*. Essas linhagens de *Rarobacter* exigiam composto heme para o crescimento aeróbico. Outras quatro bactérias gram positivas não exigiam grupo heme para o crescimento aeróbico; duas delas foram identificadas como *Oerskovia*, uma como *Arthrobacter* e a quarta não foi identificada.

SAEKI *et al.* (1994) purificaram e caracterizaram a β -1,3 glucanase de uma cultura de *Oerskovia xanthineolytica* TK-1. A enzima apresentou peso molecular estimado em 40.000 Da e pI de 6,5. O pH ótimo de atividade da enzima em laminarina e glucana de levedura foram, respectivamente, 7,5 e 5,5. A enzima atuou com uma endoenzima sobre o substrato glucana de levedura.

YEO *et al.* (1998) isolaram a linhagem *Bacillus alcalophilus* YB380 produtora de uma hidrolase extracelular que lisa parede celular de levedura em pH alcalino. Essa hidrolase foi purificada e parcialmente caracterizada. Seu peso molecular foi estimado em 27.000 Da e apresentou atividade ótima a 60°C e pH 9,0.

SANTOS & SATO (1999) estudaram a produção de β -1,3 glucanase e protease por microrganismos que lisam a parede celular de levedura. As linhagens FXX e *Cellulomonas cartae* n°191 apresentaram maior produção de β -1,3 glucanase, enquanto que a linhagem *Oerskovia* sp. n°4 apresentou maior produção de protease. A maior produção de β -1,3 glucanase foi verificada em meio de cultivo contendo parede celular de levedura extraída mecanicamente como indutor, enquanto que a maior produção de protease ocorreu com levedura autoclavada, lavada e liofilizada.

GACTO *et al.* (2000) estudaram o crescimento do actinomiceto *Micromonospora chalybeata*, em meio contendo laminarina como fonte de carbono para induzir a produção de um sistema de enzimas extracelulares capazes de lisar células de várias espécies de levedura.

Segundo GUILLOUX-BENATIER *et al.* (2000), a bactéria *Oenococcus oeni* produz β -1,3 glucanase durante a fase exponencial de crescimento. A maior atividade da enzima ocorreu quando a bactéria foi cultivada em meio de cultura contendo moléculas glicosídicas da parede celular de leveduras como indutor. A β -1,3 glucanase de *O. oeni* foi capaz de lisar células viáveis e mortas de *S. cerevisiae*, sendo que as células nas fases de crescimento exponencial e estacionária, foram lisadas facilmente.

A protease lítica do microrganismo *Cellulomonas cartae* n°191, capaz de lisar a parede celular de levedura foi caracterizada quanto às condições ótimas de atividade e estabilidade. A protease lítica apresentou atividade ótima em pH 8,0 e a 50°C. Cerca de 13% de sua atividade foi perdida após tratamento a 50°C e a enzima foi inativada após 10 minutos de tratamento a 70°C. A protease foi parcialmente inibida por fenilmetanosulfonilfluoreto e EDTA na concentração 1mM. As melhores condições para a atividade lítica de *Saccharomyces cerevisiae* KL-88, usando o extrato enzimático bruto, ocorreu em pH 7,0 a 7,5 e na temperatura de 30-35°C. O extrato enzimático bruto de *Cellulomonas cartae* n°191 foi capaz de lisar células viáveis das leveduras *Saccharomyces diastaticus* NCYC 713, *Saccharomyces capensis* NCYC 761, *Candida glabrata* NCYC 388, *Debaryomyces hansenii* NCYC 577, *Kluyveromyces marxianus* NCYC 587, *Kluyveromyces fragilis*, *Hansenula anomala* NCYC 435 e *Pachysolen tannophilus* NRRL 2460. O extrato enzimático bruto de *Cellulomonas cartae* n° 191 não foi capaz de lisar as linhagens de *Kluyveromyces fragilis* ATCC 15126, *Rhodotorula rubra*, *Pichia membranaefaciens* NCYC 333, *Hansenula mrakii* NCYC e *Trichosporon beigelii* (SANTOS, 2000).

SALAZAR *et al.* (2001) obtiveram uma *E. coli* recombinante para a super

produção de β -1,3 glucanase de *Oerskovia xanthineolytica*.

A enzima β -1,3 glucanase da linhagem *Cellulomonas cartae* n°191 foi purificada do sobrenadante do meio de cultura através de ultrafiltração e cromatografia em coluna de CM-Sepharose CL-6B. A enzima purificada apresentou atividade ótima a 55°C e na faixa de pH entre 4,5 – 6,5. A β -1,3 glucanase purificada apresentou-se estável na faixa de pH 5,5 – 6,5 e foi inativada a temperaturas superiores a 55°C. A massa molecular da enzima purificada foi estimada em 17,1 kDa através de SDS – PAGE e foi capaz de hidrolisar as ligações glicosídicas da laminarina atuando como uma endoenzima. A β -1,3 glucanase purificada mostrou-se capaz de lisar a parede celular de *Saccharomyces cerevisiae* ATCC26602 sem a necessidade de protease. Através da microscopia eletrônica de varredura, observou-se que as enzimas líticas da linhagem *Cellulomonas cartae* n°191 foram capazes de alterar a superfície celular de leveduras (FERRO, 2002).

SOARES (2002) estudou a produção, purificação da β -1,3 glucanase e a sequência de nucleotídeos do gene que codifica a β -1,3 glucanase. A linhagem *C. cartae* n°191 foi crescida em meio contendo diferentes tipos de indutores e as condições de cultivo foram otimizadas através do planejamento experimental para o aumento da produção desta enzima. O meio de SCOTT & SCHEKMAN modificado selecionado para a maior produção da enzima foi 0,20% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,02% de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 1% de parede celular de levedura extraída mecanicamente em Dyno-Mill em tampão fosfato 0,2M; pH 7,5. O melhor indutor testado foi a parede celular de leveduras obtida por rompimento mecânico. Após otimização obteve-se cerca de 75% a mais de atividade de β -1,3 glucanase em relação às condições originais, aonde a melhor produção foi obtida quando o microrganismo foi crescido após 24 horas em meio SCOTT & SCHEKMAN modificado; pH 7,5, em agitador rotatório a 200 rpm e a 30°C. A β -1,3 glucanase foi purificada do sobrenadante do meio de cultura através de ultrafiltração (membrana de exclusão de 10 KDa) e cromatografia de troca iônica em coluan de DEAE-Sepharose equilibrada em pH 5,5. A enzima apresentou peso molecular de aproximadamente 57 kDa em gel de eletroforese SDS-

PAGE. A região N-terminal desta proteína foi seqüenciada. Os resíduos obtidos do sequenciamento da região N-terminal desta enzima foram idênticos aos obtidos da enzima β -1,3 glucanase lítica comercial Zymolyase. Um fragmento de DNA de *C. cartae* n°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 “open reading frame” de 1.646 pares de base, 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. carte* n°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 o gene da β -1,3 glucanase lítica requerido.

A produção de quitinase pela linhagem da bactéria FXX capaz de lisar parede celular de levedura foi estudada por YAMAGUCHI (2002). Foi obtida maior produção de quitinase em meio de cultura composto de 4 g/l de extrato de levedura; 2 g/l de triptona; 4 g/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 1,2 g/l de KH_2PO_4 ; 2,8 g/l de K_2HPO_4 e 15 g/l de quitina neutralizada utilizada como indutor. Foi obtida maior produção de quitinase incubando-se os frascos a 150 rpm e 30°C. A quitinase bruta apresentou atividade ótima a 45°C e pH 5,0; e estabilidade na faixa de pH 7,0 a 9,0.

Estudos complementares da protease lítica da linhagem *Cellulomonas cartae* n°191 vêm sendo desenvolvidos por SANTOS. O meio para a produção de protease lítica foi otimizado por planejamento experimental utilizando o software STATISTICA e foi obtida a seguinte composição: 2,0 g/l de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,2 g/l de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 8% de levedura seca instantânea utilizada como indutor em tampão fosfato 0,15M; pH 8,0. Foi obtido maior produção de protease lítica na fermentação em frascos agitados.

2.4- Modo de ação das enzimas líticas.

BACON *et al.* (1970) estudaram a ação da β -1,3 glucanase lítica e não lítica de *Cytophaga johnsonii* sobre a glucana solúvel da parede celular de levedura. A primeira enzima formou oligossacarídeos de alto e baixo peso molecular e glicose. Já a segunda, produziu laminaribiose e glicose, com pouca quantidade de oligossacarídeos de alto peso molecular.

MADA *et al.* (1970) sugeriram que as enzimas líticas de *Basidiomycetes* atuavam endoliticamente à parede celular de leveduras liberando vários oligômeros.

No mesmo ano, MACWILLIAM relatou que há diferenças na lise da parede celular de leveduras dependendo dos estágios de crescimento celular e dos gêneros de levedura. Células jovens são mais susceptíveis à lise do que células velhas e uma β -1,3 glucanase pode não lisar, lisar incompletamente ou lisar completamente diferentes gêneros de levedura.

KANEKO *et al.* (1973) verificaram que a susceptibilidade das leveduras à ação enzimática varia com o gênero e a espécie. A maioria das linhagens de levedura *Candida* foi mais susceptível do que as linhagens de *Saccharomyces*, no entanto, após o tratamento com 2-mercaptoetanol as linhagens de *Saccharomyces* se tornaram tão susceptíveis quanto as de *Candida*. As linhagens de *Rhodotorula* e *Sporobolomyces* não se mostraram susceptíveis a ação enzimática, isso porque suas células não contêm glucana na parede celular, mas sim quitina e manana. Os autores verificaram que as células de leveduras são mais facilmente lisadas enzimaticamente após tratamento com calor e que as leveduras na fase exponencial de crescimento são mais facilmente lisadas do que aquelas obtidas na fase estacionária .

KITAMURA *et al.* (1974) verificaram que o pH ótimo para a lise de células viáveis de leveduras por Zymolyase era 7,0 a 7,5 e a temperatura ótima, 35°C. As enzimas se mantiveram razoavelmente estáveis em pH de 5,0 a 11,0. Cerca de 70% da atividade enzimática foi perdida com incubação a 50°C por 5 minutos e toda a atividade foi perdida com incubação a 60°C por 5 minutos.

A protease F-L produzida por *Oerskovia* sp. CK é uma enzima que possui alto efeito sinérgico com a enzima β -1,3 glucanase na lise de leveduras (OBATA *et al.*, 1977b). FUNATSU *et al.* em 1978, estudando as enzimas líticas de *Arthrobacter luteus*, observaram que na lise da parede celular de leveduras a protease deve atuar primeiro. Isso foi demonstrado com a inativação da protease em que foi observada perda de atividade lítica da parede da célula.

SCOTT & SCHEKMAN (1980) relataram que o sistema de enzimas líticas da bactéria *Oerskovia xanthineolytica* consiste de duas enzimas que atuam sinergicamente. A β -1,3 glucanase mostrou alta afinidade por glucana, o que possibilita a atividade lítica. A protease mostrou afinidade específica por manana. A enzima se associa a 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.

A Zymolyase B, uma protease produzida por *Arthrobacter luteus*, tem ação específica na parede celular devido a afinidade pela manana da levedura. Esta enzima é encontrada em duas formas: livre ou ligada a manana, mas só ocorre atividade proteolítica sobre a proteína e liberação de peptídeo-manana após a união da enzima à manana da levedura (KITAMURA, 1982a).

ZLOTNIK *et al.* (1984) concluíram que o tratamento com a protease de Zymolyase causa o surgimento de poros suficientemente largos para dar passagem e permitir o contato com a membrana plasmática. Através da microscopia eletrônica, os autores foram capazes de demonstrar que a protease ataca a camada mais externa da parede celular que se apresenta com erosões irregulares por todos os lados. Esta ação, na maior parte dos casos, não resulta na morte da célula. Quando elas foram inoculadas em placas de ágar YEPD (1% de extrato de levedura, 2% de peptona, 2% de glicose), a taxa de sobrevivência foi de 80%. Após a ação da protease, a camada de glucana da parede celular ficou exposta e a glucanase foi capaz de lisar a parede

celular.

A lise da parede celular é primeiramente causada pela ação das enzimas protease e β -1,3 glucanase. As enzimas β -1,6 glucanase e mananase participam na solubilização dos fragmentos da parede. Com a lise celular, há liberação de um grande número de produtos associados a diferentes organelas celulares ou estruturas celulares. Para o isolamento das organelas, a lise celular não é suficiente, havendo a necessidade de purificação dos componentes desejados da célula microbiana. Neste contexto, é importante ressaltar que métodos enzimáticos ou métodos mecânicos, ou ainda, uma combinação deles, podem ser usados para a obtenção seletiva de produtos da célula, que podem ser recuperados e purificados (ASENJO *et al.*, 1985).

HUNTER & ASENJO (1987) estudaram o sistema lítico da espécie *Oerskovia xanthineolytica*. Foram identificadas uma protease e três glucanases sendo que duas das glucanases foram capazes de hidrolisar glucana de levedura. A β -1,3 glucanase não lítica hidrolisou laminarina, uma β -1,3 glucana solúvel de alga marinha. A β -1,3 glucanase I lítica hidrolisou glucana rompendo ligações aleatoriamente, e a β -1,3 glucanase II hidrolisou glucana em laminaripentaose. Nenhuma das glucanases líticas foram ativas em células viáveis de leveduras sem o tratamento prévio com reagentes tiol ou protease lítica. A protease lítica de *Oerskovia* apresentou pH ótimo alcalino e peso molecular de cerca de 30.000 Da. O tratamento de células viáveis com a protease seguida pela glucanase resultou em lise celular extensiva, enquanto que o tratamento na ordem inversa produziu pouca ou nenhuma lise. Proteases como tripsina, pronase e quimotripsina não puderam substituir a protease lítica indicando que esta protease é específica para a lise da mananaproteína. A protease lítica foi fortemente inibida por manana solúvel, e é fracamente inibida por mananas de baixo peso molecular e oligossacarídeos de manose.

No ano seguinte, HUNTER & ASENJO apresentaram um modelo para explicar que a lise enzimática da célula de levedura acontece em passos progressivos de ruptura de estruturas celulares, começando pela superfície externa e prosseguindo

pelas estruturas celulares dentro do protoplasma. Cada passo da reação é consequência direta da estrutura da parede celular da levedura.

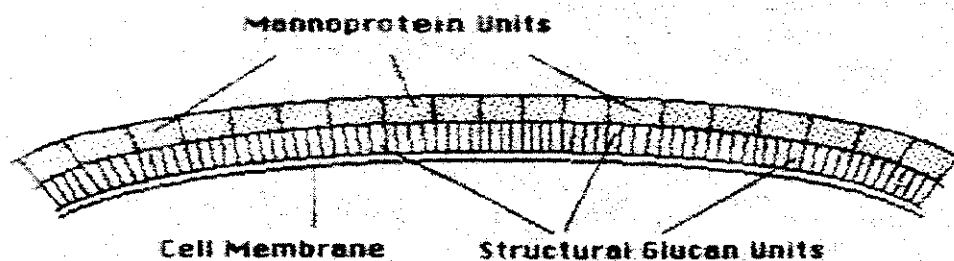


Figura 2: Ilustração da parede celular e membrana plasmática (HUNTER & ASENJO, 1988).

A protease 1 de *R. faecitabidus* se adere a porção de manana da camada de mananaproteína e hidrolisa a proteína. Essa enzima é uma serina protease com especificidade pelo substrato tipo elastase e afinidade por manose, características essenciais que permitem a lise da célula de levedura pela bactéria (SHIMOI & TADENUMA, 1991a).

BIELICKI & GALA (1991) estudaram quatro frações de β -1,3 glucanase produzida por *Streptomyces* sp., denominadas GI, GII, GIV e GVIII, que foram aplicadas na lise da parede celular e na solubilização da glucana da parede celular de levedura. O efeito sinérgico máximo na lise de *C. utilis* foi observado com as glucanases GI e GII. Na lise de *Schizosaccharomyces pombe* as frações GI e GII tiveram maior efeito, enquanto que na lise de *S. carlbergensis*, o maior efeito foi obtido com as frações GI e GIV. Os autores observaram maior degradação do polissacarídeo da parede celular durante a ação da β -1,3 glucanase GI após o tratamento prévio da levedura com a glucanase GII e GIV.

PROKOPAKIS & LIU (1997) relataram que a lise de levedura ocorre em três etapas. Na primeira, as camadas de mananaproteína e glucana são digeridas, na segunda, a célula se rompe devido a diferença da pressão osmótica liberando o material intracelular; e na terceira, este último é digerido pelas enzimas ainda existentes na solução.

A preparação comercial Zymolyase (constituída por enzimas líticas) foi utilizada para a hidrólise da parede celular de *Candida albicans*, visando o estudo de dois antígenos O-glicosilados presentes na parede celular da levedura (PAVIA *et al.*, 2001).

2.5- Aplicação de enzimas líticas.

Em 1975, YOKOGOWA estudou a mutanolisina de *Streptomyces globisporus* 1829. A enzima apresentou alta atividade lítica contra células vivas de bactérias cariogênicas, entre elas: *Streptococcus mutans*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus sanguis*, *Lactobacillus acidophilus* e *Actinomyces viscosus*.

YAMAMOTO *et al.* (1974) utilizaram as enzimas líticas de *Arthrobacter luteus* para a preparação de extrato de levedura. Foi obtido extrato com um bom balanço de aminoácidos exceto aminoácidos sulfurados. O extrato de levedura foi adequado para o crescimento de *Lactobacillus arabinosus* e *Streptococcus faecalis*. FUJINO (1974) também estudou as enzimas líticas de *Arthrobacter luteus* para a mesma finalidade: produção de extrato de levedura.

KOBAYASHI *et al.* (1982) estudaram a produção e aplicação de enzimas, em escala comercial, do microrganismo *Rhizoctonia* sp. que lisam parede celular de leveduras. Os autores verificaram que após tratamento de células de leveduras com as enzimas líticas, a digestibilidade das mesmas na ração animal foi aumentada em 1,4 a 2 vezes; o tratamento enzimático prévio das leveduras aumentou a eficiência de um desintegrador mecânico para extração de substâncias celulares cerca de 35 a 50%, e também a extração de proteína celular foi facilitada duas a três vezes.

OKAGBUE & LEWIS (1983) utilizaram o microrganismo lítico *Bacillus circulans* WL-12 para extração do pigmento vermelho astaxantina de *Phaffia rhodozyma*. A cultura mista dos microrganismos em diferentes fontes de carbono resultou em bom rendimento de astaxantina.

Uma grande quantidade de produtos podem ser isolados e purificados da célula microbiana com o auxílio da lise enzimática, como por exemplo, peptídeos,

polissacarídeos, proteínas recombinantes, ácidos nucleicos, pigmentos, enzimas, lipídeos, etc. Além do potencial de aplicação na preparação de protoplastos, fusão celular e transformação de leveduras, pode-se ressaltar sua aplicação na produção de enzimas intracelulares, preparação do polissacarídeo glucana, extração alcalina de proteínas de leveduras, pré-tratamento para lise mecânica de células em Dyno-Mill, produção de extrato de levedura, extração de pigmentos de leveduras vermelhas e lise de microrganismos que provocam a cárie dentária (ASENJO *et al.*, 1985).

O uso das enzimas líticas para a preservação de alimentos, foi sugerido por ANDREWS & ASENJO em 1987 (b). As enzimas atuam sobre leveduras e bactérias para o controle desses patógenos presentes em produtos alimentícios, prevenindo assim, conseqüente deterioração dos mesmos.

Segundo NAKAJIMA *et al.* (1988), as leveduras podem ser usadas como fonte de proteína unicelular ("single cell protein") por animais e humanos, desde que a insolubilidade da parede celular seja diminuída pela ação de enzimas líticas.

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, como enzimas líticas de *Oerskovia xanthineolytica*, suportes osmóticos e estabilizantes de esferoplastos. Usando esta técnica produtos como proteínas e enzimas podem ser liberadas de locais específicos das células em diferentes estágios do processo. As proteínas associadas com a parede e as enzimas líticas foram liberadas primeiro, em seguida os produtos do citossol foram liberados por um tratamento suave e finalmente as proteínas das organelas foram solubilizadas. Em cada estágio, proteínas específicas foram liberadas, enquanto outras foram mantidas no interior de diferentes compartimentos celulares.

RICHTER (1992) propôs a utilização de misturas enzimáticas líticas para o aumento do valor alimentício de cereais quando se utiliza altas proporções de polissacarídeos sem amido.

JI & KUC (1996) descreveram a atividade antifúngica de β -1,3 glucanase e

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

Em 1996, MORMENEO *et al.* estudaram estruturas moleculares presentes na parede celular de *Candida albicans*, utilizando-se de tratamentos com etilenodiamina (EDA), Zymolyase e quitinase. Os autores verificaram que os polissacarídeos e proteínas da parede celular de *C. albicans* foram solubilizados em maior quantidade quando a parede celular foi tratada previamente com Zymolyase (complexo composto principalmente por β -glucanase) ou com quitinase, antes do tratamento com EDA.

KIM & HWANG (1997) purificaram uma β -1,3 glucanase de raiz de pimenta para testarem sua atividade inibitória contra *Phytophthora capsici*. A enzima inibiu o crescimento das hifas do fungo *P. capsici* (quitina-negativo), porém não mostrou atividade antifúngica contra *Alternaria mali*, *Colleotricum gloeosporioides*, *Magnaporthe grisea* e *Fusarium oxysporum* var. *cucumerinum*. O tratamento do *P. capsici* com maior quantidade de β -1,3 glucanase causou lise das hifas e dos zoósporos. O efeito sinérgico da β -1,3 glucanase e de uma quitinase também produzida pela pimenta, ocasionou inibição do crescimento das hifas de *F. oxysporum* var. *cucumerinum* e *P. capsici*.

O gênero *Cellulomonas* vem sendo relatado desde a década de sessenta até os dias atuais, como boa produtora de glucanases, entre elas: β -glicosidases, celulasas, hemicelulasas, xilanases, endoglucanases e exoglucanases. As principais aplicações desse gênero bacteriano é na produção dessas enzimas, as quais são utilizadas para a

hidrólise de diferentes carboidratos e obtenção de protoplastos (CAUDHARY *et al.*, 1997).

As β -1,3 glucanases e as proteases líticas tem sido utilizadas na elucidação da estrutura, composição e mecanismo da síntese da parede celular de leveduras (KOLLAR *et al.* 1995, 1997; SOUTHARD *et al.*, 1999; MRSA *et al.*, 1999a; MRSA & TANNER, 1999b; KAPTEYN *et al.* 1999 a e b; POPOLO & VAI, 1999; SANTOS & SNYDER, 2000).

WIWAT *et al.* (1999) produziram quitinase a partir de *Bacillus circulans* n°41 para uso como suplemento de bioinseticida de *B. thuringiensis* para o controle de larvas de lepidópteros.

Em 2000, ZHANG & YUEN utilizaram um sistema lítico composto por quitinase, protease, β -1,3 glucanase e lipase para o biocontrole de manchas nas folhas de centeio causadas pelo *Biopolaris sorokiniana*.

As enzimas quitinolíticas apresentam inúmeras aplicações biotecnológicas no ramo da indústria e agricultura. As quitinases podem ser utilizadas no controle de fungos patógenos de plantas e insetos. Há também, uma crescente apreciação na produção de quitinooligossacarídeos biologicamente ativos através da utilização das quitinases. Essas enzimas podem ainda ser aplicadas na produção de fonte de proteína unicelular, preparação de enzimas micolíticas e na formação de protoplastos fúngicos (PATIL *et al.*, 2000).

As β -1,3 e β -1,4 glucanases bacterianas são importantes em biotecnologia, fermentação e indústrias de ração animal. Durante a formação do malte, as β -1,3 e β -1,4 glucanases endógenas são inativadas pelo calor, e muitas β -glucanas de alto peso molecular sobram na mistura causando sérios problemas como: redução de extratos, baixas taxas de filtração e aparência gelatinosa de precipitados na cerveja pronta. Desta forma, o nível de atividade de glucana-hidrolase atingido durante a germinação e a quantidade de substratos são fatores importantes para uma formação de malte de boa qualidade. As β -1,3 e β -1,4 glucanases bacterianas, que são termoestáveis, são frequentemente adicionadas ao processo para reduzir a

viscosidade do produto final. Em rações animais, especialmente de frangos e porcos, a adição de preparações enzimáticas contendo β -glucanases bacterianas, melhora a digestibilidade (PLANAS, 2000).

ESQUERRÉ-TUGAYÉ *et al.* (2000) utilizaram glucanases e pectinases microbianas para a degradação, respectivamente, de β -glucana e de substâncias pécicas de plantas, visando estabelecer uma relação molecular entre plantas e patógenos.

Atividades antioxidantes e antimutagênicas foram atribuídas às mananas de diferentes gêneros de levedura, como a glucomanana extracelular e glucomanana de *Candida utilis*, manana de *Saccharomyces cerevisiae* e manana de *Candida albicans*. Esses componentes reduziram as alterações induzidas por ofloxacina e acridina laranja em DNA de cloroplastos de *Euglena gracilis*. O efeito antimutagênico dos tipos de mananas está baseado na habilidade de reaproveitar radicais de oxigênio reativos. As características importantes de mananas isoladas de parede celular de leveduras, como a boa solubilidade em água, peso molecular relativamente pequeno (15 ~30 kDa), o efeito antimutagênico, parecem ser boas promessas para o seu uso como protetor natural (KRIZKOVÁ *et al.*, 2001).

No mesmo ano, EL-KATATNY relatou o controle do fitopatógeno *Sclerotium rolfsii* devido à ação de quitinases e β -1,3 glucanases produzidas por *Trichoderma harzianum* Rifai T24.

YIN *et al.* (2001) relataram a utilização de β -glucanases e xilanases em alimentos de porcos contendo cevada descascada com alto e baixo teor de β -glucana e xilose. Os autores verificaram resultados benéficos nos porcos alimentados com cevada descascada com alto teor de glucana pré-tratada com as enzimas, como: redução da concentração de nitrogênio no plasma sanguíneo e aumento na digestão de componentes energéticos e de aminoácidos.

3- MATERIAIS E MÉTODOS

3.1- MATERIAIS

Reagentes: Caseína Hammarsten e ácido tricloroacético (Merck), biotina, tiamina (Sigma), cisteína, β - mercaptoetanol, ácidos, bases, sais e minerais (Merck, Riedel, Ecibra ou equivalente).

Material específico: laminarina de *Laminaria digitata* (Sigma); parede celular bruta de levedura *Saccharomyces cerevisiae* extraída mecanicamente em Dyno-Mill liofilizada; levedura autoclavada, lavada e liofilizada; glucana de levedura insolúvel em NaOH, levedura seca instantânea e quitina.

Microrganismos:

Microrganismos que lisam a parede celular de leveduras:

As linhagens de bactérias B1, B22, B26, FXX, *Oerskovia* sp. n^o4 e *Cellulomonas cartae* n^o191 foram isoladas de resíduos de usina de fermentação alcoólica, no Laboratório de Bioquímica de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos (FERRO, 1997). As linhagens *Oerskovia* sp. n^o4, *Cellulomonas cartae* n^o191 foram identificadas pelo Korean Institute of Bioscience & Biotechnology.

Leveduras :

As linhagens de leveduras *Kluyveromyces lodderi*, *Saccharomyces cerevisiae* (levedura de panificação Fleischmann), *Saccharomyces cerevisiae* (levedura de panificação Itaiquara) e as linhagens produtoras de fator “killer” *Saccharomyces cerevisiae* KL-88, *Saccharomyces diastaticus* NCYC 713, *Saccharomyces cerevisiae* NCYC 1001, *Candida glabrata* NCYC 388, *Kluyveromyces marxianus* NCYC 587 e *Hansenula mrakii* NCYC 500 (NASCIMENTO, 1994), foram utilizadas nos testes de atividade lítica.

3.2- MÉTODOS

3.2.1- Manutenção dos microrganismos.

Os microrganismos que lisam leveduras estão sendo mantidos em tubos inclinados com meio ágar TYM descrito por YAMAMOTO *et al.* (1993b), composto de 5,0 g de Trypticase Peptona; 3,0 g de Extrato de Levedura; 3,0 g de Extrato de Malte; 5,8 g de K_2HPO_4 ; 1,15 g de $NH_4H_2PO_4$; 0,264 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ e 0,5% de parede celular de levedura extraída mecanicamente por litro de água destilada. As culturas vêm sendo conservadas a 4°C sob camada de vaselina esterilizada e repicadas a cada três ou quatro meses de armazenamento.

As leveduras estão sendo cultivadas em tubos inclinados contendo meio YEPD composto de 1% de extrato de levedura, 2% de peptona, 2% de glicose e 2% de ágar e mantidas a 4°C sob camada de vaselina esterilizada e repicadas a cada três ou quatro meses de armazenamento.

3.2.2- Obtenção e preparação dos indutores.

3.2.2.1- Parede celular de levedura extraída mecanicamente em Dyno-Mill.

A suspensão de 2 Kg de levedura comercial para panificação em 8 L de água destilada a 5°C, foi submetida a tratamento em Dyno-Mill utilizando-se 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 foi centrifugada a 10.000 rpm a 5°C por 15 minutos. O precipitado foi lavado com água destilada a 5°C e liofilizado.

3.2.2.2- Levedura autoclavada, lavada e liofilizada.

A suspensão de 250 g de levedura comercial para panificação em 1 L de água destilada foi autoclavada a 121,1°C/1,3Kg/cm² por 30 minutos, esfriada e centrifugada a 10.000 rpm a 5°C por 15 minutos. A massa obtida foi lavada três vezes com água destilada e centrifugada. Posteriormente, a massa celular foi liofilizada e utilizada como indutor.

3.2.2.3- Glucana insolúvel em meio alcalino.

A suspensão de 400 g de levedura comercial para panificação em 320 ml de NaOH 6% foi aquecida a 90°C por 1 hora. Foi adicionado 1.200 ml de água destilada, deixada à temperatura ambiente e agitada por 1 hora, sendo o precipitado obtido por centrifugação a 10.000 rpm a 5°C por 15 minutos. O precipitado foi ressuspenso em 640 ml de NaOH 3%, e a mistura mantida em banho-maria a 75-80°C por 1 hora. Foi adicionado 1.200 ml de água destilada à mistura e deixada a temperatura ambiente por 1 hora com agitação. A suspensão foi centrifugada a 10.000 rpm a 5°C por 15 minutos, sendo a massa celular separada e submetida a três extrações. A massa celular final foi neutralizada com HCl 2N, ressuspenso em 1 L de água destilada, centrifugada nas mesmas condições anteriores e liofilizada (BACON *et al.*, 1966)

3.2.2.4- Quitina neutralizada e coloidal.

As amostras de quitina utilizadas como substrato na atividade de quitinase foram cedidas pelo professor Luís Henrique Beirão da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, SC. Durante 24 horas, a amostra ácida de quitina foi lavada em água corrente para neutralização. Em seguida a quitina foi triturada em moinho de bolas e a granulometria padronizada com peneira de 60 mesh. A quitina neutralizada foi utilizada como indutor na produção da quitinase. Para a preparação da quitina coloidal, 50g de quitina foi tratada com 200 ml de HCl concentrado por 1 hora e em seguida foi filtrada em lã de vidro. Adicionou-se 2L de água destilada, a qual foi trocada constantemente até atingir pH ao redor de 7,0. A quitina, então, foi centrifugada, seca a 50°C e a granulometria padronizada com peneira de 60 mesh, como descrito por YAMAGUCHI (2002). A quitina coloidal foi utilizada como substrato para a determinação da atividade de quitinase.

3.2.3- Estudo da produção de enzimas líticas β -1,3 glucanase, protease lítica e quitinase pelas linhagens B1, B22, B26, FXX, *Oerskovia* sp. n°4 e *Cellulomonas cartae* n°191 em meio de cultura I contendo diferentes indutores.

Preparação do Pré-Inóculo: uma alçada das culturas de 24 horas dos microrganismos em tubos inclinados de meio TYM foram inoculadas separadamente em frascos Erlenmeyer de 50 mL contendo 10 ml de meio de cultura I, descrito por SCOTT & SCHEKMAN (1980), composto de 13,6 g/l de KH_2PO_4 ; 2,0 g/l de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 4,2 g/l de KOH; 0,2 g/l de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,001 g/l de $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 1 mg/l de tiamina, 1 mg/l de biotina e 1% de indutor, e os frascos foram incubados a 30°C com agitação de 150 rpm por 24 horas. Para a produção de β -1,3 glucanase, protease lítica e quitinase foram utilizadas parede celular de levedura extraída mecanicamente em Dyno-Mill; levedura autoclavada, lavada e liofilizada; levedura seca instantânea; glucana insolúvel em meio alcalino e glicose.

Fermentação: alíquotas de 1 ml de pré-inóculo foram transferidas assepticamente para frascos Erlenmeyer de 50 ml contendo 9 ml do mesmo meio de cultura. Os frascos, em duplicatas, foram incubados por 24, 48 e 72 horas a 30°C com agitação de 150 rpm.

Obtenção do Extrato Enzimático Bruto: Após incubação, os meios de cultura obtidos no item anterior foram centrifugados a 10.000 rpm durante 10 minutos a 5°C e os sobrenadantes utilizados como fonte de enzima. As atividades de β -1,3 glucanase, protease e quitinase nos sobrenadantes dos meios de cultura foram determinadas como descrito no item 3.2.5.

3.2.4- Estudo da produção de enzimas líticas β -1,3 glucanase, protease lítica e quitinase pelas linhagens B1, B22, B26, FXX, *Oerskovia* sp. n °4 e *Cellulomonas cartae* n°191 nos meios de cultura II, III e IV.

A produção de β -1,3 glucanase, protease lítica e quitinase pelas linhagens B1, B22, B26, FXX, *Oerskovia* sp. n°4 e *Cellulomonas cartae* n° 191 foi também testada nos meios otimizados descritos por SANTOS (2002) para a produção de protease

lítica pela linhagem *Cellulomonas cartae* nº191, SOARES (2002) para a produção de β -1,3 glucanase pela linhagem *Cellulomonas cartae* nº191 e no meio descrito por YAMAGUCHI (2002) para a produção de quitinase pela linhagem FXX.

Meio II (SANTOS, 2002): 2,0 g/l de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,2 g/l de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 80 g/l de levedura seca instantânea utilizada como indutor em tampão fosfato 0,15M, pH 8,0.

Meio III (SOARES, 2002): 2,0 g/l de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,2 g/l de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 10 g/l de parede celular de levedura extraída mecanicamente em Dyno-Mill em tampão fosfato 0,2M, pH 7,5.

Meio IV (YAMAGUCHI, 2002): 4 g/l de extrato de levedura; 2 g/l de triptona; 4 g/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 1,2 g/l de KH_2PO_4 ; 2,8 g/l de K_2HPO_4 e 15 g/l de quitina neutralizada utilizada como indutor.

Preparação do Pré-Inóculo: uma alçada das culturas de 24 horas dos microrganismos em tubos inclinados de meio TYM foram inoculadas separadamente em frascos Erlenmeyer de 50 mL contendo 10 ml dos meios de cultura otimizados, acima descritos.

Fermentação: alíquotas de 1 ml de pré-inóculo foram transferidas assepticamente para frascos Erlenmeyer de 50 ml contendo 9 ml do mesmo meio de cultura. Os frascos, em duplicatas, foram incubados por 24, 48 e 72 horas a 30°C com agitação de 150 rpm, com exceção do meio III que foi incubado a 200 rpm.

Obtenção das Preparações Enzimáticas Brutas: Após incubação, os meios de cultura obtidos foram centrifugados a 10.000 rpm durante 10 minutos a 5°C e os sobrenadantes utilizados como preparação enzimática bruta. As atividades de β -1,3-glucanase, protease e quitinase nos sobrenadantes dos meios de cultura foram determinadas como descrito no item a seguir.

3.2.5- Determinação da atividade enzimática.

3.2.5.1- Determinação da atividade de protease lítica.

A atividade de protease foi determinada utilizando-se caseína como substrato como descrito por OBATA *et al.* (1977a), ROWLEY & BULL (1977) e SANTOS (2000). A mistura de reação contendo 1,5 mL de solução 2% de caseína, 1 mL de tampão fosfato 0,15 M (pH 7,5) e 0,5 mL de solução enzimática foi incubada a 30°C por 30 minutos. A reação foi paralisada pela adição de 3 mL de solução 0,4 M de ácido tricloroacético (TCA), seguida de filtração em papel Whatman 42. A absorbância do filtrado foi determinada a 280 nm, sendo uma unidade de atividade definida como aquela capaz de aumentar em uma unidade a absorbância do filtrado, nas condições do ensaio. Foi preparado um tubo branco para cada amostra, com a adição de TCA antes da adição da enzima.

3.2.5.2- Determinação da atividade de β -1,3 glucanase.

A atividade de β -1,3 glucanase foi determinada como descrita por SAEKI *et al.* (1994) e SANTOS (2000). A mistura de 250 μ L de solução enzimática e 250 μ L de solução 1% de laminarina em tampão acetato de sódio 0,1 M, pH 5,5 foi incubada a 55°C por 30 minutos. A reação foi interrompida por aquecimento a 100°C por 5 minutos. Os açúcares redutores foram determinados pelo método de SOMOGYI (1945) utilizando-se glicose como açúcar padrão. Para controle foram determinados os açúcares redutores presentes na solução enzimática utilizando-se água destilada no lugar da solução de laminarina. Para ajuste do espectrofotômetro foi preparado tubo branco utilizando-se água destilada no lugar da solução de laminarina. Uma unidade de atividade foi definida como a liberação de um μ mol de glicose por minuto por mL de solução enzimática.

3.2.5.3- Determinação da atividade de quitinase.

A atividade de quitinase foi determinada baseada no método usando quitina coloidal [REISSIG *et al.* (1955) e SANDHU *et al.* (1989)], de acordo com o método

otimizado por YAMAGUCHI (2002). A quitina coloidal foi preparada como descrito abaixo. A mistura de 0,5 mL de solução enzimática e 0,5 mL de suspensão de quitina coloidal 0,2% em tampão citrato de sódio 0,1 M, pH 6,0 foi incubada durante 1 hora a 45°C. A mistura de reação foi resfriada em banho de gelo e centrifugada a 10.000 rpm por 10 minutos a 5°C. A mistura de 1 mL do sobrenadante e 50 µL de borato de potássio 0,8 M foi aquecida em banho em ebulição por 3 minutos e resfriada em banho de gelo. Em seguida foi adicionado 1,5 ml de solução 10% de dimetilaminobenzaldeído em ácido acético e HCl 10 N. A mistura foi incubada em banho-maria a 37°C durante 20 minutos e a absorbância foi determinada a 585 nm. Para a preparação do tubo branco foi utilizada solução enzimática inativada através de aquecimento durante 5 minutos em banho em ebulição. Uma unidade de atividade foi definida como 1 µmol de N-acetilglicosamina formado nas condições de ensaio.

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

3.2.6- Produção de protease lítica, β -1,3 glucanase e quitinase pelas linhagens de bactérias selecionadas.

As linhagens B26 e *Cellulomonas cartae* n°191 foram utilizadas para a preparação de protease lítica. As preparações enzimáticas brutas de protease (sobrenadante do meio de cultura) foram obtidas pela fermentação das linhagens B26 e *Cellulomonas cartae* n°191 em meio de cultura II contendo 8% de levedura seca instantânea durante 24 e 48 horas de fermentação, respectivamente, como descrito no item 3.2.4.

As linhagens B1 e *Cellulomonas cartae* n°191 foram usadas para a preparação de β -1,3 glucanases. As preparações enzimáticas de β -1,3 glucanase (sobrenadante do meio de cultura) foram obtidas pela fermentação das linhagens B1 e *Cellulomonas cartae* n°191 em meio de cultivo III contendo 1% de parede celular

de levedura extraída mecanicamente em Dyno-Mill, durante 24 horas de fermentação, como descrito no item 3.2.4.

A linhagem *Cellulomonas cartae* n°191 foi utilizada para a produção de quitinase. A preparação enzimática bruta de quitinase (sobrenadante do meio de cultura) foi obtida pela fermentação da linhagem n°191 em meio de cultivo IV durante 72 horas, como descrito no item 3.2.4.

A atividade de protease, β -1,3 glucanase e quitinase das preparações enzimáticas obtidas foi determinada como descrito no item 3.2.5. A atividade de lise de levedura das preparações enzimáticas foi testada como descrito no item 3.2.8.

3.2.7- Fracionamento das preparações enzimáticas brutas de protease, β -1,3 glucanase e quitinase com sulfato de amônio.

As preparações enzimáticas brutas (sobrenadantes dos meios de cultura) foram fracionadas por precipitação com sulfato de amônio até 40, 60 e 80% de saturação. Os sobrenadantes dos meios de cultura obtidos no item anterior, foram saturados com 40% de sulfato de amônio. Após 12 horas a 5°C, os precipitados foram obtidos por centrifugação a 10.000 rpm a 5°C por 10 minutos. Os precipitados foram ressuspensos em água destilada e dialisados sob refrigeração contra água destilada. Os sobrenadantes obtidos foram saturados até 60% com sulfato de amônio e os precipitados obtidos como descrito anteriormente. Os sobrenadantes obtidos foram saturados com 80% de sulfato de amônio e após 12 horas foram centrifugados a 10.000 rpm por 10 minutos a 5°C, e os precipitados obtidos foram dialisados contra água destilada como descrito anteriormente.

A atividade de protease, β -1,3 glucanase e quitinase das frações obtidas por fracionamento com sulfato de amônio foi determinada como descrito no item 3.2.5. A atividade de lise de levedura das preparações enzimáticas foi testada como descrito a seguir.

3.2.8- Estudo da atividade de lise de leveduras utilizando-se as preparações enzimáticas brutas e fracionadas com sulfato de amônio.

3.2.8.1- Estudo da lise da levedura *S.cerevisiae* KL-88 pelas preparações enzimáticas brutas.

A capacidade das preparações enzimáticas brutas (sobrenadante dos meios de cultura), de β -1,3 glucanase da linhagem B1 e 191, protease da linhagem B26 e 191 e quitinase da linhagem 191, de lisar a parede celular de leveduras foi testada com células viáveis de *Saccharomyces cerevisiae* KL-88. As suspensões de células de leveduras foram obtidas conforme o item 3.2.8.4 e a atividade de lise determinada conforme o item 3.2.8.5.

3.2.8.2- Estudo da lise da levedura *S.cerevisiae* KL-88 pelas preparações enzimáticas de β -1,3 glucanase, protease e quitinase.

Foi testada a capacidade de lise das preparações enzimáticas de β -1,3 glucanase da linhagem B1 e 191, protease da linhagem B26 e 191 e quitinase da linhagem 191, fracionadas com 60% de sulfato de amônio sobre *Saccharomyces cerevisiae* KL-88. As suspensões de células de leveduras foram obtidas conforme o item 3.2.8.4 e a atividade de lise determinada conforme o item 3.2.8.5.

3.2.8.3- Estudo da lise de diferentes leveduras pelas preparações enzimáticas de β -1,3 glucanase, protease e quitinase.

Para a continuidade dos testes de lise de leveduras foi selecionadas as enzimas β -1,3 glucanase das linhagens B1 e 191 e protease e quitinase da linhagem 191.

A preparação enzimática de β -1,3 glucanase das linhagens B1 e 191, protease e quitinase da linhagem 191, fracionadas com sulfato de amônio 60% de saturação, foram testadas na lise das leveduras *Kluyveromyces lodderi*, *Saccharomyces*

cerevisiae (levedura de panificação Fleischmann), *Saccharomyces cerevisiae* (levedura de panificação Itaiquara), *Saccharomyces cerevisiae* KL-88, *Saccharomyces diastaticus* NCYC 713, *Saccharomyces cerevisiae* NCYC 1001, *Candida glabrata* NCYC 388, *Kluyveromyces marxianus* NCYC 587 e *Hansenula mrakii* NCYC 500.

As suspensões de células de leveduras foram obtidas conforme o item 3.2.8.4 e a atividade de lise determinada conforme o item 3.2.8.5.

3.2.8.4- Obtenção das suspensões de células de leveduras.

Para a obtenção de células de leveduras, uma alçada das culturas de leveduras crescidas em tubos inclinados de meio YEPD composto de 1% de extrato de levedura, 2% de peptona, 2% de glicose e 2% de ágar, foi transferida para frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio YEPD líquido. Os frascos foram incubados em agitador rotatório a 30°C por 20 horas com agitação a 150 rpm. As células foram coletadas por centrifugação a 10.000 rpm por 10 minutos a 5°C e lavadas duas vezes com água destilada. Estas células foram ressuspensas em tampão fosfato 0,1M, pH 7,5 até obter-se uma suspensão com densidade ótica igual a 1,68 a 660 nm. As suspensões de células de leveduras foram utilizadas para o teste de lise enzimática da parede celular, como descrito a seguir.

3.2.8.5- Determinação da atividade lítica.

A atividade de lise foi determinada segundo o método de VENTOM & ASENJO (1991) modificado. A mistura para lise enzimática de células contendo 2 ml de suspensão de células de levedura com densidade ótica igual a 1,68 a 660 nm; volumes variados de solução enzimática bruta, e tampão fosfato 0,1M, pH 7,5 para completar o volume para 4 ml, foi incubada a 30°C, com agitação em intervalos de tempo regulares, durante 1 hora (OBATA *et al.*, 1977b). Simultaneamente, foi preparado, como referência, um tubo branco onde no lugar da solução enzimática bruta foi acrescentado tampão fosfato 0,1M, pH 7,5.

A atividade lítica foi calculada por modificação no método descrito por OBATA *et al.* (1977b) através das equações:

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

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

$$\text{Absorbância obtida} = Y - X$$

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

3.2.9- Produção de enzimas que lisam a parede celular de leveduras pela linhagem *Cellulomonas cartae* n°191.

A linhagem *Cellulomonas cartae* n°191 selecionada foi utilizada para a produção de β -1,3 glucanase, protease lítica e quitinase, em frascos agitados, em meio de cultura III, II e IV, respectivamente.

3.2.9.1- Estudo da relação entre tempo de fermentação, alteração do pH do meio de cultura, crescimento do microrganismo e produção das enzimas β -1,3 glucanase, protease e quitinase pela linhagem *Cellulomonas cartae* n°191 em frascos agitados a 30°C e 35°C.

A produção de β -1,3 glucanase pela linhagem *Cellulomonas cartae* n° 191 foi realizada no meio de cultura III otimizado por SOARES (2002). As proteases líticas e quitinases foram produzidas, respectivamente, em meio de cultura II (otimizado por SANTOS, 2002) e meio de cultura IV (descrito por YAMAGUCHI, 2002), como descrito no item 3.2.4.

Preparação do inóculo: a cultura da bactéria *Cellulomonas cartae* n°191 foi inoculada em frascos Erlenmeyer de 250 ml contendo 50 ml de meio de cultura III; 50 ml de meio de cultura II e 50 ml de meio de cultura IV. Os frascos foram incubados em agitador rotatório a 150 rpm a 30°C durante 24 horas, com exceção do meio III que foi incubado a 200 rpm.

Fermentação: alíquotas de 1 ml de pré-inóculo foram transferidas assepticamente para vários frascos Erlenmeyer de 50 ml contendo 9 ml de meio de cultura específico para a produção das diferentes enzimas líticas, como mencionado acima. Os frascos foram incubados em agitador rotatório a 30 e 35°C. Para a produção de β -1,3 glucanase e protease lítica pela linhagem 191, os frascos foram incubados por 5, 10, 24, 30, 48 e 72 horas a 200 e 150 rpm, respectivamente. Para a produção de quitinase pela linhagem 191, os frascos foram incubados por 24, 48, 53, 58, 72 e 78 horas a 150 rpm.

Os extratos enzimáticos brutos foram obtidos como descrito no item 3.2.4 e as atividades de β -1,3 glucanase, protease e quitinase no sobrenadante do meio de cultura foram determinados como descrito no item 3.2.5.

O crescimento celular foi estimado indiretamente através da medida de absorbância a 660 nm utilizando-se a curva padrão (absorbância x massa celular seca).

A alteração do pH do meio de cultura foi determinada com auxílio de potenciômetro.

3.2.9.2- Obtenção de β -1,3 glucanase da linhagem *Cellulomonas cartae* n°191 para a lise de leveduras.

A linhagem *Cellulomonas cartae* n°191 foi selecionada para a produção de β -1,3 glucanase. Uma alçada da cultura de 24 horas da linhagem *Cellulomonas cartae* n°191 foi transferida para frascos Erlenmeyer de 500 ml contendo 100 ml de meio de cultura III composto por 2,0 g/l de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,2 g/l de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 10 g/l de parede celular de levedura extraída mecanicamente em Dyno-Mill em tampão fosfato 0,2M, pH 7,5. Os frascos foram incubados por 24 horas a 30°C a 200 rpm. Alíquotas de 10 ml foram transferidas assepticamente para frascos Erlenmeyer de 500 ml contendo 90 ml do mesmo meio de cultura e incubados a 30°C por 24 horas. Após incubação, o meio de cultura obtido foi centrifugado a 10.000 rpm durante 10 minutos a 5°C e o sobrenadante utilizado como preparação enzimática bruta. A

preparação enzimática bruta foi fracionada com sulfato de amônio 60% de saturação, como descrito no item 3.2.7. As atividades de β -1,3 glucanase, protease e quitinase foram determinadas como descrito no item 3.2.5.

3.2.10- Aplicação da enzima na lise de leveduras.

3.2.10.1- Planejamento experimental para a análise dos efeitos de diferentes variáveis na lise de levedura.

Visando obter resultados da influência de variáveis na lise de leveduras, foi realizado um planejamento fatorial envolvendo quatro variáveis (2^4 e 3 pontos centrais) (NETO *et al.*, 2001), sendo a resposta a atividade de litase. Foram analisadas as variáveis independentes: tempo de crescimento da levedura, condições de agitação para o cultivo da levedura, pH de lise, temperatura de lise e a variável dependente, atividade lítica. Foram estudados os efeitos das variáveis independentes na lise da levedura *Saccharomyces cerevisiae* KL-88 utilizando a preparação enzimática de β -1,3 glucanase da linhagem *C. cartae* n°191 fracionada com sulfato de amônio 60% de saturação, obtida de acordo com o item 3.2.9.2.

A mistura de reação contendo 2 ml de suspensão de células de levedura com densidade ótica igual a 1,68 a 660 nm obtida da fermentação de *Saccharomyces cerevisiae* KL-88 em diferentes condições de tempo de crescimento e agitação para o cultivo da levedura; β -1,3 glucanase para a concentração final 0,11 U/ml e tampão fosfato 0,1 M em diferentes valores de pH para completar o volume para 4 ml, foi incubada a diferentes temperaturas por 1 hora e a atividade lítica foi determinada como descrito no item 3.2.8.5. Como referência, foi preparado um tubo branco onde no lugar da solução enzimática foi acrescentado tampão fosfato 0,1M em diferentes valores pH.

A análise estatística dos resultados foi realizada através do software STATISTICA 5.0 utilizando o Experimental Design, com 95% de confiança ($p \leq 0,05$).

3.2.10.2- Estudo do efeito da cisteína e β -mercaptoetanol na lise de levedura.

Foi estudado o efeito da cisteína e β -mercaptoetanol nas concentrações de 1, 10 e 100 mM na mistura de reação contendo suspensão de células da levedura *Saccharomyces cerevisiae* KL-88 e preparação enzimática de β -1,3 glucanase da linhagem *C. cartae* nº191. A suspensão de células da levedura *S. cerevisiae* KL-88 foi obtida como descrito no item 3.2.8.4, em frascos sem agitação, incubados a 30°C. A mistura de reação contendo 2 ml de suspensão de células de levedura com densidade ótica igual a 1,68 a 660 nm; β -1,3 glucanase para a concentração final 0,11 U/ml e tampão fosfato 0,1 M, pH 6,5 contendo 1, 10 ou 100 mM de cisteína ou β -mercaptoetanol para completar o volume para 4 ml, foi incubada a 35°C por 1 hora e a atividade lítica foi determinada como descrito no item 3.2.8.5. Como referência, foi preparado um tubo branco onde no lugar da solução enzimática foi acrescentado tampão fosfato 0,1M, pH 6,5.

3.2.10.3- Aplicação das enzimas líticas na lise da parede celular e extração de enzimas intracelulares.

Foi estudada a utilização da preparação enzimática de β -1,3 glucanase da linhagem *C. cartae* nº191 na lise da parede celular e na extração de enzimas intracelulares ou ligadas a célula das leveduras *Saccharomyces cerevisiae* KL-88 e *Kluyveromyces marxianus* NCYC 587. A mistura de reação contendo 2 ml de suspensão de células de levedura com densidade ótica igual a 1,68 a 660 nm; β -1,3 glucanase para concentração final 0,11 U/ml e tampão fosfato 0,1 M, pH 6,5 para completar o volume para 4 ml, foi incubada a 35°C por 1 hora. Como referência, foi preparado um tubo branco onde tampão fosfato 0,1M, pH 6,5 substituiu a solução enzimática. Posteriormente, a mistura de reação foi centrifugada a 6.000 rpm por 15 minutos e o sobrenadante utilizado como fonte de enzima. A atividade de β -

frutofuranosidase ou invertase foi determinada no sobrenadante da mistura de reação, utilizando sacarose como substrato, como descrito por OLIVEIRA (1996), e a determinação da glicose pelo método de SOMOGYI (1945). Uma unidade de atividade de invertase foi definida como a liberação de 1 μ mol de açúcar redutor por mg de massa celular seca de levedura durante 1 minuto.

3.2.10.4- Efeito do tratamento enzimático na lise da parede celular de leveduras com ultra-som.

Foi estudado o efeito do pré-tratamento da suspensão celular das leveduras *S. cerevisiae* KL-88 e *K. marxianus* NCYC 587 com a preparação enzimática de β -1,3 glucanase da linhagem *C. cartae* nº191, na lise com ultra-som. A mistura de reação contendo 2 ml de suspensão de células de levedura com densidade ótica igual a 1,68 a 660 nm; β -1,3 glucanase para concentração final 0,11 U/ml e tampão fosfato 0,1 M, pH 6,5 para completar o volume para 4 ml, foi incubada a 35°C por 1 hora. Como referência, foi preparado um tubo branco onde em substituição a solução enzimática foi acrescentado tampão fosfato 0,1M, pH 6,5. Posteriormente, a mistura de reação foi tratada em ultrasonicador Ultratip Labsonic, Lab Line, mod. 9100 a 180 watts por 10 ou 20 segundos. Após o tratamento com ultra-som, a mistura de reação foi centrifugada a 6.000 rpm por 15 minutos e o sobrenadante utilizado como fonte de enzima. Como referência, foi utilizado a mistura de reação tratada somente com ultra-som. A lise das leveduras foi determinada pela medida de proteínas liberadas (LOWRY, et al., 1951), definida como μ g de proteínas liberadas/mg de massa celular seca de levedura. A atividade de β -frutofuranosidase foi determinada como descrito no item anterior.

4- RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1- Estudo da produção das enzimas líticas protease, β -1,3 glucanase e quitinase pelas linhagens B1, B22, B26, FXX, *Oerskovia* sp. n°4 e *Cellulomonas cartae* n°191 em meio de cultura I.

A produção das enzimas líticas protease, β -1,3 glucanase e quitinase pelas linhagens B1, B22, B26, FXX, *Oerskovia* sp. n°4 e *Cellulomonas cartae* n°191 foi testada em meio de cultura I contendo diferentes indutores: parede celular de levedura extraída mecanicamente em Dyno-Mill; levedura autoclavada, lavada e liofilizada; levedura seca instantânea; glucana insolúvel em meio alcalino e glicose; como descrito no item 3.2.3.

A Tabela 1 ilustra que no meio de cultura I contendo 1% de parede celular de levedura extraída mecanicamente em Dyno-Mill as linhagens B1, B22, B26, FXX, *Oerskovia* sp. n°4 e *Cellulomonas cartae* n°191 produziram protease e β -1,3 glucanase. As linhagens B1 e 191 apresentaram maior produção de protease (ambas 0,75 U/ml) ao redor de 48 horas de fermentação; enquanto que a linhagem FXX mostrou maior produção de protease (1,06 U/ml) após 72 horas.

A linhagem B1, em meio de cultura I contendo 1% de parede celular de levedura extraída mecanicamente, apresentou maior produção de β -1,3 glucanase (0,18 U/ml) após 24 horas de fermentação; enquanto que as linhagens B22, B26, FXX, *Oerskovia* sp. n°4 e *Cellulomonas cartae* n°191 apresentaram maior produção de β -1,3 glucanase após 48 horas de fermentação a 30°C, apresentando 0,14 U/ml; 0,23 U/ml; 0,27 U/ml; 0,19 U/ml e 0,18U/ml, respectivamente.

Não houve produção de quitinase pelas linhagens bacterianas em meio de cultura I contendo 1% de parede celular de levedura obtida através de rompimento mecânico.

Tabela 1: Produção de protease, β -1,3 glucanase e quitinase pelas linhagens B1, B22, B26, FXX, Oerskovia sp. n°4 e Cellulomonas cartae n°191 em meio de cultura I contendo 1% de parede celular de levedura extraída mecanicamente em Dyno-Mill.

Linhagens	Protease (U/mL)			β -1,3 Glucanase (U/mL)			Quitinase (U/mL)		
	Tempo de fermentação			Tempo de fermentação			Tempo de fermentação		
	24h	48h	72h	24h	48h	72h	24h	48h	72h
B1	0,39	0,75	0,46	0,18	0,16	0,07	0,00	0,00	0,00
B22	0,02	0,47	0,16	0,08	0,14	0,09	0,00	0,00	0,00
B26	0,00	0,17	0,03	0,15	0,23	0,10	0,00	0,00	0,00
Fxx	0,27	0,51	1,06	0,11	0,27	0,07	0,00	0,00	0,00
4	0,37	0,47	0,48	0,12	0,19	0,09	0,00	0,00	0,00
191	0,26	0,75	0,66	0,12	0,18	0,10	0,00	0,00	0,00

A Tabela 2 ilustra que em meio de cultura I contendo 1% de levedura autoclavada, lavada e liofilizada, as linhagens que lisam a parede celular de leveduras, com exceção da B22 e FXX, apresentaram no mínimo o dobro de unidades de atividade de protease em relação aos valores de atividade de protease apresentados na Tabela 1. A linhagem B1 se destacou na produção de protease nos três tempos de fermentação, assim como a B26 e a n°4, com 48 e 72 horas. A linhagem B1 produziu 2,75 U/ml de protease após 24 horas de fermentação, enquanto que as linhagens B26 e n°4 produziram, respectivamente, 2,63 U/ml e 2,57 U/ml de protease no meio de cultura I contendo 1% de levedura autoclavada, lavada e liofilizada.

No meio de cultura I contendo 1% de levedura autoclavada, lavada e liofilizada foi obtida menor produção de β -1,3 glucanase, comparada com o meio de cultura I contendo 1% de parede celular de levedura extraída mecanicamente em Dyno-Mill. As linhagens B1 e *Oerskovia* sp. n°4 produziram 0,12 e 0,13 U/ml de β -1,3 glucanase após 24 horas de incubação, enquanto que a linhagem *Cellulomonas cartae* n°191 apresentou 0,16 U/ml de β -1,3 glucanase.

Não houve, também, produção de quitinase pelas linhagens cultivadas em meio de cultura I contendo 1% de levedura autoclavada, lavada e liofilizada.

Tabela 2: Produção de protease, β -1,3 glucanase e quitinase pelas linhagens B1, B22, B26, FXX, *Oerskovia* sp. n°4 e *Cellulomonas cartae* n°191 em meio de cultura I contendo 1% de levedura autoclavada, lavada e liofilizada.

Linhagens	Protease (U/mL)			β -1,3 Glucanase (U/mL)			Quitinase (U/mL)		
	Tempo de fermentação			Tempo de fermentação			Tempo de fermentação		
	24h	48h	72h	24h	48h	72h	24h	48h	72h
B1	2,75	2,59	2,29	0,12	0,09	0,10	0,00	0,00	0,00
B22	0,00	0,01	0,00	0,04	0,06	0,04	0,00	0,00	0,00
B26	1,70	2,55	2,63	0,04	0,06	0,04	0,00	0,00	0,00
Fxx	0,59	1,16	1,49	0,04	0,07	0,04	0,00	0,00	0,00
4	1,86	2,57	2,25	0,13	0,08	0,03	0,00	0,00	0,00
191	0,90	1,90	1,78	0,10	0,16	0,09	0,00	0,00	0,00

A Tabela 3 ilustra que em meio de cultura I contendo o indutor levedura seca instantânea, somente a linhagem n°4 após 24 horas de fermentação apresentou uma produção significativa de protease em relação aos valores de atividade de protease obtidos anteriormente. A linhagem n°4 apresentou 1,09 U/ml de protease após 24 horas de fermentação a 30°C.

No meio de cultura I contendo 1% de levedura seca instantânea a linhagem *Cellulomonas cartae* n°191 apresentou maior produção de β -1,3 glucanase, comparada com as outras linhagens testadas. Neste meio de cultivo a linhagem n°191 produziu 0,22 U/ml de β -1,3 glucanase após 24 horas de fermentação, mantendo-se relativamente estável até 72 horas de incubação.

A quitinase não foi produzida por nenhuma das linhagens no meio de cultura contendo como indutor 1% de levedura seca instantânea.

Tabela 3: Produção de protease, β -1,3 glucanase e quitinase pelas linhagens B1, B22, B26, FXX, *Oerskovia* sp. n°4 e *Cellulomonas cartae* n°191 em meio de cultura I contendo 1% de levedura seca instantânea.

Linhagens	Protease (U/mL)			β -1,3 Glucanase (U/mL)			Quitinase (U/mL)		
	Tempo de fermentação			Tempo de fermentação			Tempo de fermentação		
	24h	48h	72h	24h	48h	72h	24h	48h	72h
B1	0,17	0,19	0,14	0,09	0,09	0,00	0,00	0,00	0,00
B22	0,06	0,07	0,09	0,07	0,11	0,08	0,00	0,00	0,00
B26	0,10	0,00	0,00	0,12	0,16	0,09	0,00	0,00	0,00
Fxx	0,01	0,00	0,01	0,14	0,11	0,19	0,00	0,00	0,00
4	1,09	0,68	0,60	0,08	0,10	0,11	0,00	0,00	0,00
191	0,47	0,65	0,71	0,22	0,19	0,24	0,00	0,00	0,00

A Tabela 4 ilustra que no meio de cultura I contendo 1% de glucana insolúvel em meio alcalino não houve produção de nenhuma das enzimas líticas pelas linhagens B1, B22, B26, FXX, *Oerskovia* sp. n°4 e *Cellulomonas cartae* n°191.

Tabela 4: Produção de protease, β -1,3 glucanase e quitinase pelas linhagens B1, B22, B26, FXX, *Oerskovia* sp. n°4 e *Cellulomonas cartae* n°191 em meio de cultura I contendo 1% de glucana insolúvel em meio alcalino.

Linhagens	Protease (U/mL)			β -1,3 Glucanase (U/mL)			Quitinase (U/mL)		
	Tempo de fermentação			Tempo de fermentação			Tempo de fermentação		
	24h	48h	72h	24h	48h	72h	24h	48h	72h
B1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,06	0,00	0,00	0,00
B22	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
B26	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Fxx	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
4	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
191	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

A Tabela 5 ilustra que no meio de cultura I contendo 1% de glicose foi observada somente produção de protease, sendo que a linhagem n°4 destacou-se, apresentando maior produção de protease entre as linhagens testadas. Neste meio de

cultivo a linhagem n°4 produziu 1,21 U/ml de protease após 24 horas de fermentação a 30°C.

Tabela 5: Produção de protease, β -1,3 glucanase e quitinase pelas linhagens B1, B22, B26, FXX, Oerskovia sp. n°4 e Cellulomonas cartae n°191 em meio de cultura I contendo 1% de glicose.

Linhagens	Protease (U/mL)			β -1,3 Glucanase (U/mL)			Quitinase (U/mL)		
	Tempo de fermentação			Tempo de fermentação			Tempo de fermentação		
	24h	48h	72h	24h	48h	72h	24h	48h	72h
B1	0,09	0,04	0,04	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
B22	0,10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
B26	0,02	0,02	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Fxx	0,11	0,14	0,14	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
4	1,21	1,09	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
191	0,49	0,75	0,60	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00

4.2- Estudo da produção das enzimas líticas protease, β -1,3 glucanase e quitinase pelas linhagens B1, B22, B26, FXX, Oerskovia sp. n°4 e Cellulomonas cartae n°191 em meios de cultura II, III e IV.

A produção de protease lítica, β -1,3 glucanase e quitinase pelas linhagens B1, B22, B26, FXX, Oerskovia sp. n°4 e Cellulomonas cartae n°191 foi testada em meios de cultura otimizados para a produção de protease (SANTOS, 2002), β -1,3 glucanase (SOARES, 2002) e quitinase (YAMAGUCHI, 2002) como descrito no item 3.2.4.

A Tabela 6 ilustra que no meio de cultura II descrito por SANTOS (2002), foi obtida maior produção de protease. A linhagem B26 produziu 4,75 U/ml de protease após 24 horas de fermentação e a linhagem n°191; 3,89 U/ml de protease após 48 horas de fermentação. Foram obtidas baixas atividades de glucanase e praticamente nenhuma atividade de quitinase, com exceção da linhagem FXX (0,15 U/ml) após 24 horas de incubação.

Tabela 6: Produção de protease, β -1,3 glucanase e quitinase pelas linhagens B1, B22, B26, FXX, *Oerskovia* sp. n°4 e *Cellulomonas cartae* n°191 em meio de cultura II contendo 8% de levedura seca instantânea.

Linhagens	Protease (U/mL)			β -1,3 Glucanase (U/mL)			Quitinase (U/mL)		
	Tempo de fermentação			Tempo de fermentação			Tempo de fermentação		
	24h	48h	72h	24h	48h	72h	24h	48h	72h
B1	0,23	2,28	2,26	0,04	0,04	0,10	0,00	0,00	0,00
B22	1,29	0,62	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
B26	4,75	0,00	0,00	0,03	0,06	0,12	0,00	0,00	0,00
Fxx	0,57	0,00	0,00	0,00	0,00	0,10	0,15	0,00	0,00
4	0,56	0,74	0,83	0,00	0,00	0,02	0,00	0,00	0,00
191	0,36	3,89	2,01	0,00	0,00	0,09	0,00	0,00	0,00

SCOTT & SCHEKMAN (1980) testaram três fontes de carbono (glucana insolúvel em meio alcalino, levedura autoclavada e glicose) para a produção de enzimas líticas pelo microrganismo *Oerskovia xanthineolytica*. Os autores obtiveram 3,00 U/ml de protease no meio contendo 1,5 % de levedura autoclavada, a 30°C e 24 horas de incubação.

Analisando-se o efeito dos indutores 1% de parede celular de levedura (Tabela 1 e Figura 3A), 1% de glucana insolúvel em meio alcalino (Tabela 4 e Figura 3D) e 1% de levedura autoclavada, lavada e liofilizada (Tabela 2 e Figura 3B), no meio de cultura I, foi verificado maior produção de protease em meio de cultivo contendo levedura seca instantânea. A Tabela 2 e Figura 3B ilustram que as linhagens B1, B26 e 4 produziram 2,75; 2,63 e 2,57 U/ml de protease em meio de cultura I contendo 1% de levedura autoclavada, lavada e liofilizada. A Tabela 6 e Figura 3E ilustram que as linhagens B26 e 191 produziram 4,75 e 3,89 U/ml de protease, respectivamente, em meio de cultura II contendo 8% de levedura seca instantânea.

A Tabela 7 mostra que a linhagem *Cellulomonas cartae* n°191 destacou-se na produção de β -1,3 glucanase sendo obtida 0,58 U/ml de atividade após 24 horas de incubação em meio de cultura III contendo 1% de levedura extraída mecanicamente em Dyno-Mill. As linhagens B1 e FXX produziram 0,38 e 0,32

U/ml de β -1,3 glucanase após 24 horas de fermentação. Neste meio de cultura não houve produção de protease e quitinase pelas linhagens testadas.

Tabela 7: Produção de protease, β -1,3 glucanase e quitinase pelas linhagens B1, B22, B26, FXX, Oerskovia sp. n°4 e Cellulomonas cartae n°191 em meio de cultura III contendo 1% de parede celular extraída mecanicamente em Dyno-Mill.

Linhagens	Protease (U/mL)			β -1,3 Glucanase (U/mL)			Quitinase (U/mL)		
	Tempo de fermentação			Tempo de fermentação			Tempo de fermentação		
	24h	48h	72h	24h	48h	72h	24h	48h	72h
B1	0,00	0,00	0,00	0,38	0,24	0,14	0,00	0,00	0,00
B22	0,00	0,00	0,00	0,29	0,16	0,12	0,00	0,00	0,00
B26	0,00	0,00	0,00	0,12	0,21	0,09	0,00	0,00	0,00
Fxx	0,00	0,00	0,00	0,32	0,22	0,16	0,00	0,00	0,00
4	0,00	0,00	0,00	0,09	0,25	0,16	0,00	0,00	0,00
191	0,00	0,00	0,00	0,58	0,39	0,28	0,00	0,00	0,00

BACON (1970) *et al.* descreveram a produção de enzimas líticas por *Cytophaga johnsonii* utilizando parede celular de levedura de panificação de *S. cerevisiae* como indutor. A preparação enzimática apresentou 0,16 U/ml de β -1,3 glucanase utilizando laminarina. No presente estudo os sobrenadantes dos meios de cultura III contendo 1% de parede celular de levedura extraída mecanicamente das linhagens *Cellulomonas cartae* n°191 e B1 apresentaram, respectivamente 0,58 e 0,38 U/ml de β -1,3 glucanase.

ASENJO *et al.* (1985) estudaram a produção de β -1,3 glucanase pela linhagem *Oerskovia* sp. em meio de cultura contendo glucana e parede celular de levedura como indutores. Os autores verificaram que no meio de cultura contendo glucana a produção de β -1,3 glucanase ocorreu em menor tempo de fermentação e foi três vezes maior do que no meio contendo parede celular de levedura.

Dois anos mais tarde, ANDREWS & ASENJO (1987) utilizaram glucana de levedura e glicose para a produção de β -1,3 glucanase em processo de fermentação contínua de *Oerskovia xanthineolytica* e obtiveram 0,18 a 0,37 U/ml de β -1,3

glucanase. Alta concentração de glucana de levedura e baixa concentração de glicose resultaram em alta atividade de β -1,3 glucanase (660 U/g de células); enquanto que baixa concentração do indutor e alta concentração de glicose, estimularam a maior produção de protease. No presente trabalho, no meio contendo 1% de glicose, somente a linhagem n°4 produziu atividade significativa de protease, ou seja, 1,2 U/ml de protease após 24 horas de incubação (Tabela 5).

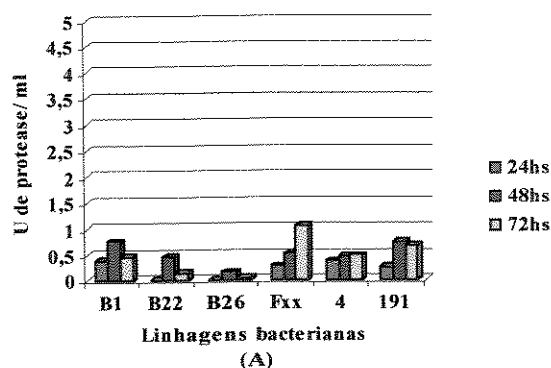
FERRO (2002) testou a produção de β -1,3 glucanase pela linhagem *Cellulomonas cellulans* YLM-B191-1 em frascos agitados a 30°C após 24 horas de fermentação em meio de cultura descrito por SISTRON modificado por SCOTT & SCHEKMAN (1980) constituído de 1,5% de levedura seca; 0,2% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 1,36% de KH_2PO_4 ; 0,42% de KOH; 0,02% de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,001% de $\text{Fe}(\text{SO}_4)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 0,0001% de biotina e 0,0001% de tiamina e obteve 0,14 U/ml de β -1,3 glucanase. A Tabela 7 e a Figura 4E mostram que a linhagem 191 cultivada a 30°C durante 24 horas de fermentação em meio III contendo 1% de parede celular de levedura extraída por método mecânico, apresentou atividade de β -1,3 glucanase (0,58 U/ml) 4,14 vezes maior do que o resultado obtido por FERRO (2002).

A Tabela 8 ilustra a produção de quitinase pelas bactérias que lisam a parede celular de leveduras em meio de cultura IV contendo 1,5 % de quitina neutralizada como indutor. A linhagem FXX produziu 1,46 U/ml de quitinase após 24 horas de fermentação. As linhagens B1, B22, B26, 4 e 191 produziram 1,28; 1,59; 1,35; 1,01 e 1,35 U/ml de quitinase, respectivamente após 72 horas de fermentação. A produção de protease e β -1,3 glucanase pelas linhagens bacterianas no meio de cultura IV contendo 1,5% de quitina neutralizada foi baixa quando comparada com os outros meios de cultura.

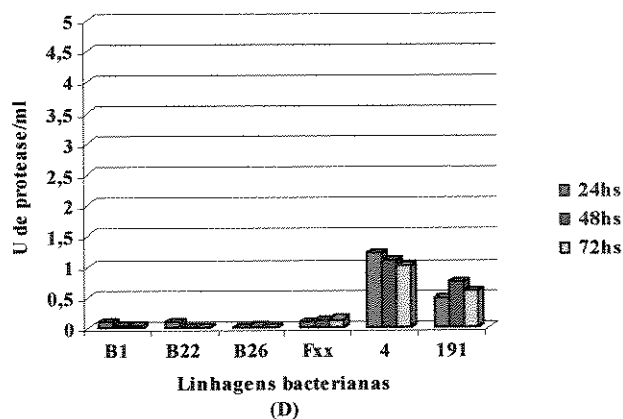
Tabela 8: Produção de protease, β -1,3 glucanase e quitinase pelas linhagens B1, B22, B26, FXX, Oerskovia sp. n°4 e Cellulomonas cartae n°191 em meio de cultura IV contendo 1,5% de quitina neutralizada.

Linhagens	Protease (U/mL)			β -1,3 Glucanase (U/mL)			Quitinase (U/mL)		
	Tempo de fermentação			Tempo de fermentação			Tempo de fermentação		
	24h	48h	72h	24h	48h	72h	24h	48h	72h
B1	0,00	0,10	0,00	0,03	0,03	0,09	0,00	0,77	1,28
B22	0,00	0,00	0,00	0,01	0,02	0,06	0,01	0,88	1,59
B26	0,00	0,00	0,21	0,01	0,01	0,03	0,04	0,82	1,35
Fxx	0,01	0,52	0,16	0,00	0,03	0,02	1,46	0,92	1,22
4	0,00	0,14	0,02	0,01	0,02	0,04	0,00	1,22	1,01
191	0,12	0,25	0,37	0,00	0,03	0,06	0,00	0,73	1,35

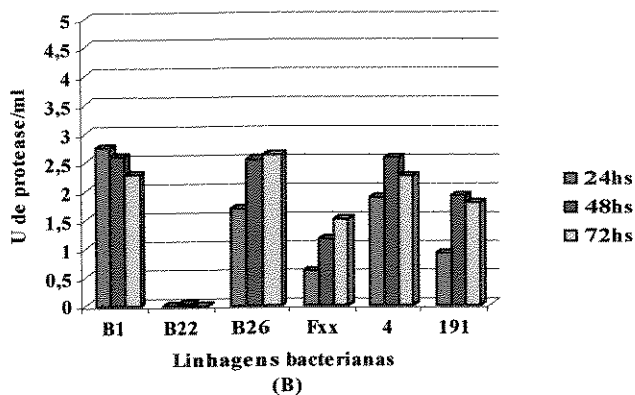
Meio I contendo 1% de parede celular de levedura extraída mecanicamente em Dyno-Mill.



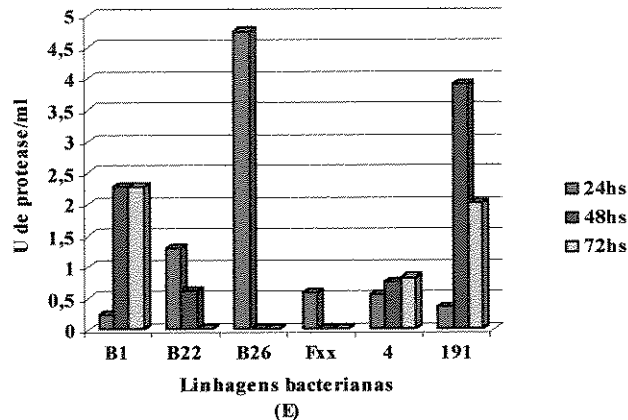
Meio I contendo 1% de glucana insolúvel em meio alcalino.



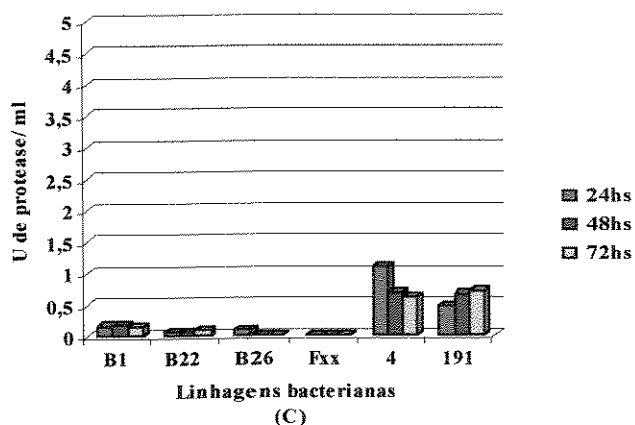
Meio I contendo 1% de levedura autoclavada, lavada e biofilmizada.



Meio II contendo 8% de levedura seca instantânea.



Meio I contendo 1% de levedura seca instantânea.



Meio IV contendo 1,5% de quitina neutralizada.

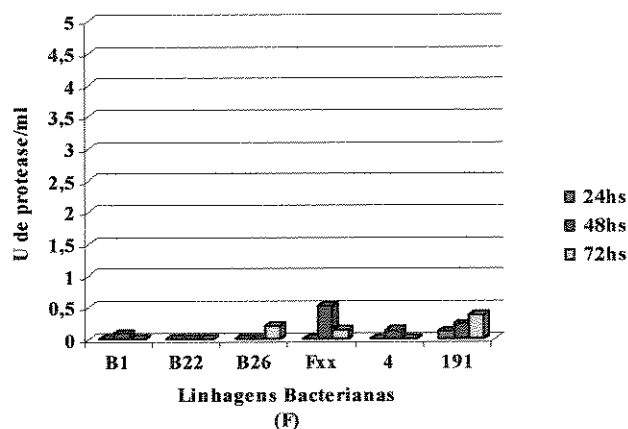
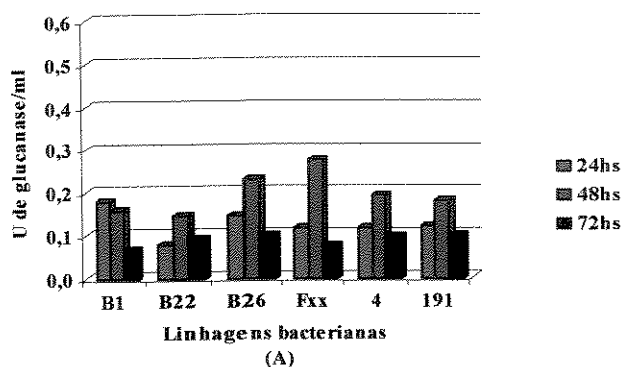
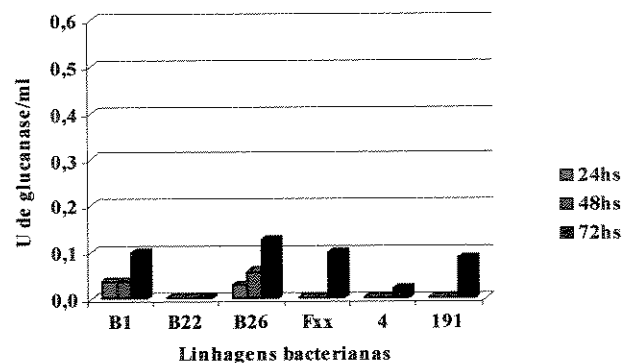


Figura 3: Produção de protease pelas linhagens B1, B22, B26, FXX, *Oerskovia* sp. n°4 e *Cellulomonas cartae* n°191 em meios de cultura contendo diferentes indutores.

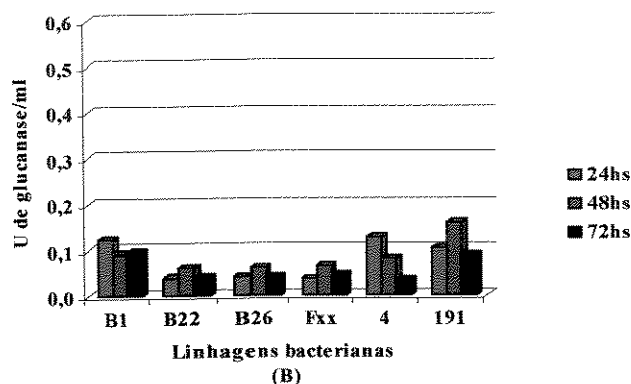
Meio I contendo 1% de levedura extraída mecanicamente em Dyno-Mill.



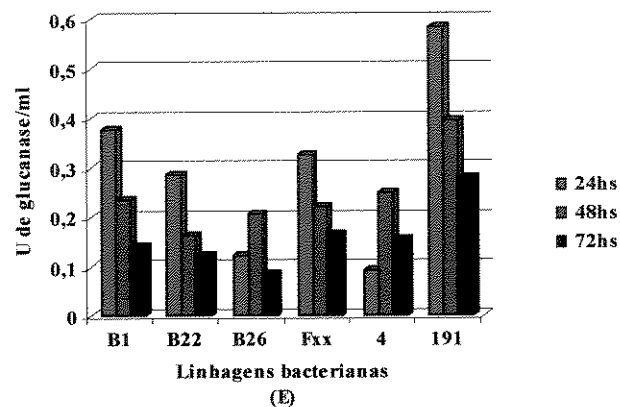
Meio II contendo 8% de parede celular de levedura seca instantânea.



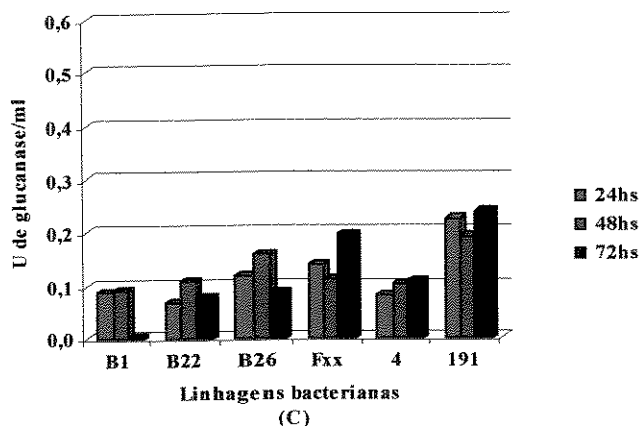
Meio I contendo 1% de levedura autoclavada, lavada e liofilizada.



Meio III contendo 1% parede celular de levedura extraída mecanicamente em Dyno-Mill.



Meio I contendo 1% de levedura seca instantânea.



Meio IV contendo 1,5% de quitina neutralizada.

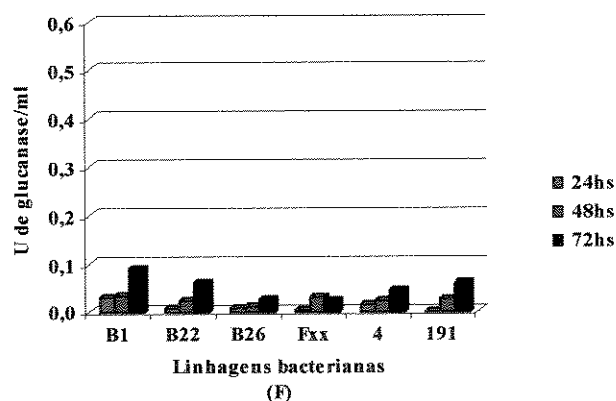


Figura 4: Produção de β -1,3 glucanase pelas linhagens B1, B22, B26, FXX, *Oerskovia* sp. n°4 e *Cellulomonas cartae* n°191 em meios de cultura contendo diferentes indutores.

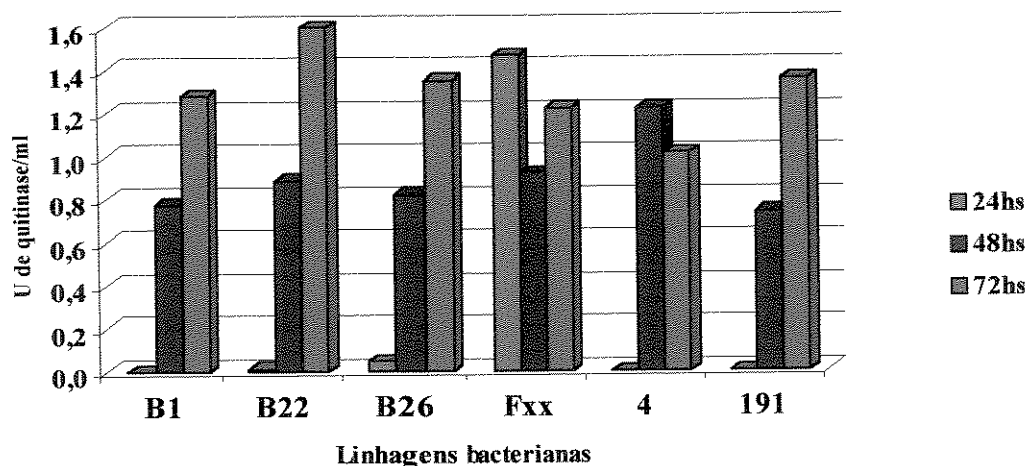


Figura 5: Produção de quitinase pelas linhagens B1, B22, B26, FXX, *Oerskovia* sp. n°4 e *Cellulomonas cartae* n°191 em meio de cultura IV contendo 1,5% de quitina neutralizada.

4.3- Estudo da produção de protease, β -1,3 glucanase e quitinase.

As linhagens B26 e *Cellulomonas cartae* n°191 foram selecionadas para a produção de protease em meio de cultivo II contendo 8% de levedura seca instantânea descrito por SANTOS (2002) como relatado no item 3.2.4.

A Tabela 9 ilustra que a linhagem B26 produziu 5,97 U/ml de protease após 24 horas de fermentação em frascos agitados a 150 rpm a 30°C. A linhagem *Cellulomonas cartae* n°191 produziu, respectivamente, 4,81 e 5,67 U/ml de protease após 24 e 48 horas de fermentação em frascos agitados a 150 rpm a 30°C.

Não foi detectada atividade de β -1,3 glucanase e quitinase no sobrenadante do meio de cultura da linhagem B26 após 24 e 48 horas de fermentação a 150 rpm a 30°C.

O sobrenadante do meio de cultura II contendo 8% de levedura seca instantânea obtido após 24 horas de fermentação da linhagem *Cellulomonas cartae* n°191, apresentou 4,81 U/ml de protease e 0,11 U/ml de β -1,3 glucanase.

Tabela 9: Produção de protease, β -1,3 glucanase e quitinase pelas linhagens B26 e Cellulomonas cartae n°191 em meio de cultura II contendo 8% de levedura seca instantânea.

Linhagens	Protease (U/mL)		β -1,3 Glucanase (U/mL)		Quitinase (U/mL)	
	Tempo de fermentação		Tempo de fermentação		Tempo de fermentação	
	24hs	48hs	24hs	48hs	24hs	48hs
B26	5,97	1,82	0,00	0,00	0,00	0,00
191	4,81	5,67	0,11	0,01	0,00	0,00

A Tabela 10 ilustra a produção de β -1,3 glucanase pelas linhagens B1, B22, B26, FXX, *Oerskovia* sp. n°4 e *Cellulomonas cartae* n°191 em meio de cultura III contendo parede celular de levedura extraída mecanicamente, descrito por SOARES (2002). A linhagem 191 apresentou maior produção de β -1,3 glucanase entre as linhagens testadas, sendo obtido 0,59; 0,45 e 0,27 U/ml após 24, 48 e 72 horas de fermentação em frascos agitados a 30°C, respectivamente. As linhagens B1, B22, B26, FXX e n°4 produziram respectivamente 0,39; 0,28; 0,12; 0,30; 0,10 U/ml de β -1,3 glucanase após 24 horas de fermentação e 0,23; 0,15; 0,20; 0,21 e 0,24 U/ml de β -1,3 glucanase após 48 horas de fermentação. As linhagens B1 e *C. cartae* n°191 foram selecionadas para a produção de β -1,3 glucanase.

No meio de cultura III contendo 1% de parede celular extraída mecanicamente em Dyno-Mill, descrito por SOARES (2002), a linhagem n°191 produziu atividade de β -1,3 glucanase (0,59 U/ml) 4,2 vezes maior quando comparada com o estudo realizado por FERRO (2002), em que foi obtido 0,14 U/ml de β -1,3 glucanase em meio de cultura descrito por SISTRON modificado por SCOTT & SCHEKMAN (1980) constituído de 1,5% de levedura seca; 0,2% de

(NH₄)₂SO₄; 1,36% de KH₂PO₄; 0,42% de KOH; 0,02% de MgSO₄.7H₂O; 0,001% de Fe(SO₄)₃. 6H₂O; 0,0001% de biotina e 0,0001% de tiamina.

No meio de cultura III contendo levedura extraída mecanicamente foi verificado que as linhagens não produziram protease nem quitinase.

Tabela 10: Produção de protease, β-1,3 glucanase e quitinase pelas linhagens B1, B22, B26, FXX, Oerskovia sp.nº4 e Cellulomonas cartae nº191 em meio de cultura III contendo 1% de parede celular de levedura extraída mecanicamente em Dyno-Mill.

Linhagens	Protease (U/mL)			β-1,3 Glucanase (U/mL)			Quitinase (U/mL)		
	Tempo de fermentação			Tempo de fermentação			Tempo de fermentação		
	24hs	48hs	72hs	24hs	48hs	72hs	24hs	48hs	72hs
B1	0,00	0,00	0,00	0,39	0,23	0,14	0,00	0,00	0,00
B22	0,00	0,00	0,00	0,28	0,15	0,12	0,00	0,00	0,00
B26	0,00	0,00	0,00	0,12	0,20	0,10	0,00	0,00	0,00
Fxx	0,00	0,00	0,00	0,30	0,21	0,16	0,00	0,00	0,00
4	0,00	0,00	0,00	0,10	0,24	0,14	0,00	0,00	0,00
191	0,00	0,00	0,00	0,59	0,45	0,27	0,00	0,00	0,00

A Tabela 11 ilustra a produção de quitinase pelas linhagens B1, B22, B26, FXX, *Oerskovia* sp. nº4 e *Cellulomonas cartae* nº191 em meio de cultura IV contendo 1,5% de quitina neutralizada, descrito por YAMAGUCHI (2002). A linhagem 191 apresentou maior produção de quitinase entre as linhagens testadas, sendo obtido 2,15 U/ml de quitinase após 72 horas de fermentação. As linhagens B1, B22, B26, FXX e nº4 apresentaram 1,24; 1,25; 1,11; 1,31 e 0,84 U/ml de quitinase após 72 horas de fermentação nesse meio de cultura.

Nos meios de culturas I contendo 1% dos indutores parede celular de levedura extraída mecanicamente em Dyno-Mill; levedura autoclavada, lavada e liofilizada; levedura seca instantânea; glucana insolúvel em meio alcalino e glicose, foi verificado que as linhagens não produziram quitinase. Comparando-se a produção de quitinase no meio II contendo 8% de levedura seca instantânea em que foi obtido 0,15 U/ml de quitinase e a produção no meio de cultura IV contendo 1,5%

de quitina neutralizada em que foi obtido 2,15 U/ml de quitinase, observou-se que neste último meio houve produção 14,3 vezes maior da enzima.

No meio de cultura IV contendo 1,5% de quitina, as linhagens B1 e FXX, produziram, respectivamente, 0,68 e 0,19 U/ml de protease lítica, enquanto que as linhagens B22, B26, 4 e 191 não apresentaram atividade de protease após 72 horas de fermentação. Neste meio de cultura as linhagens não produziram ou produziram pouca atividade de β -1,3 glucanase.

Tabela 11: Produção de protease, β -1,3 glucanase e quitinase pelas linhagens B1, B22, B26, FXX, Oerskovia sp.nº4 e Cellulomonas cartae nº191 em meio de cultura IV contendo 1,5% de quitina neutralizada.

	Protease (U/mL)	β -1,3 Glucanase (U/mL)	Quitinase (U/mL)
	Tempo de Fermentação	Tempo de Fermentação	Tempo de Fermentação
Linhagens	72hs	72hs	72hs
B1	0,68	0,03	1,24
B22	0,00	0,00	1,25
B26	0,00	0,01	1,11
Fxx	0,19	0,01	1,31
4	0,00	0,00	0,84
191	0,00	0,03	2,15

4.4- Estudo da lise da levedura *Saccharomyces cerevisiae* KL-88 pelas preparações enzimáticas brutas de β -1,3 glucanase das linhagens B1 e 191, de protease das linhagens B26 e 191 e de quitinase da linhagem 191.

A atividade de lise das preparações enzimáticas brutas (sobrenadante do meio de cultura) de β -1,3 glucanase das linhagens B1 e 191, de protease das linhagens B26 e 191 e de quitinase da linhagem 191, foi testada como descrito no item 3.2.8.1, utilizando-se a levedura *Saccharomyces cerevisiae* KL-88.

A Tabela 12 ilustra que somente as preparações brutas de β -1,3 glucanase das linhagens B1 e 191 apresentaram atividade de lise da suspensão celular de

Saccharomyces cerevisiae KL-88.

Tabela 12: Atividade de lise da levedura das preparações enzimáticas brutas de β -1,3 glucanase, protease e quitinase.

Tubo	Linhagem de Bactéria	Enzima	Unidades de atividade da enzima na suspensão celular/mL	Unidades de atividade lítica
1	B1	β -1,3 glucanase	0,1	5,57
2	191	β -1,3 glucanase	0,15	5,95
3	191	Protease 48h	1,42	0
4	191	Quitinase	0,54	0
5	B26	Protease 24h	1,50	0

4.5- Fracionamento das preparações enzimáticas com sulfato de amônio.

As preparações enzimáticas de β -1,3 glucanase, protease e quitinase (sobrenadante do meio de cultura) foram fracionadas através de precipitação com sulfato de amônio 40, 60, 80% de saturação, como descrito no item 3.2.7.

A Tabela 13 mostra que 60% de saturação com sulfato de amônio foi adequado para precipitar as proteases líticas, produzidas pelas linhagens B26 e 191, do meio de cultura contendo 8% de levedura seca instantânea. As preparações enzimáticas das linhagens B26 (fração 2) e 191 (fração 5) apresentaram, respectivamente, 10,54 U/ml de protease e 11,94 U/ml de protease, sendo que estas frações não apresentaram atividade de β -1,3 glucanase nem quitinase. A preparação de protease da linhagem 191 que apresentou maior atividade foi escolhida para os estudos de lise da parede celular de levedura.

A Tabela 13 ilustra que a fração 8 obtida do sobrenadante do meio de cultura III contendo 1% de parede celular de levedura extraída por método mecânico cultivada com a linhagem B1, através de saturação com 60% de sulfato de amônio, apresentou 0,64 U/ml de protease e 2,5 U/ml de β -1,3 glucanase, porém não apresentou atividade de quitinase.

A β -1,3 glucanase produzida pela linhagem 191 no meio de cultura III contendo 1% de parede celular de levedura extraída mecanicamente em Dyno-Mill, foi obtida através da adição de sulfato de amônio 60% de saturação. A preparação enzimática obtida (fração 11) apresentou 3,6 U/ml de β -1,3 glucanase e não mostrou atividade de protease e quitinase.

A quitinase da linhagem 191 foi obtida do sobrenadante do meio de cultura IV contendo 1,5% de quitina neutralizada, pela precipitação com sulfato de amônio 60% de saturação. A preparação da quitinase obtida (fração 14) apresentou 8,2 U/ml de quitinase; 0,37 U/ml de protease e 0,12 U/ml de β -1,3 glucanase.

Tabela 13: Unidades de atividade de protease, β -1,3 glucanase e quitinase das frações obtidas através de precipitação com sulfato de amônio.

Linhagem de Bactéria	Sobrenadante	% de Saturação com sulfato de amônio	Fração	Unidades de atividade/ml		
				Protease	β -1,3 glucanase	Quitinase
B26	Meio de cultura II contendo 8% de levedura seca instantânea	40%	1	0,00	0,09	0,00
		60%	2	10,45	0,00	0,00
		80%	3	2,49	0,00	0,00
191	Meio de cultura II contendo 8% de levedura seca instantânea	40%	4	0,10	0,30	0,00
		60%	5	11,94	0,00	0,00
		80%	6	2,57	0,00	0,00
B1	Meio de cultura III contendo 1% de levedura extraída mecanicamente	40%	7	-	-	-
		60%	8	0,64	2,50	0,00
		80%	9	0,86	0,03	0,00
191	Meio de cultura III contendo 1% de levedura extraída mecanicamente	40%	10	-	-	-
		60%	11	0,00	3,60	0,00
		80%	12	0,00	0,04	0,00
191	Meio de cultura IV contendo 1,5% de quitina neutralizada	40%	13	-	-	-
		60%	14	0,37	0,12	8,20
		80%	15	0,00	0,00	0,00

(-) não houve precipitação de proteínas

4.6- Estudo da lise da levedura *Saccharomyces cerevisiae* KL-88 pelas preparações de β -1,3 glucanase, protease e quitinase obtidas por fracionamento com sulfato de amônio 60% de saturação.

A susceptibilidade da linhagem *Saccharomyces cerevisiae* KL-88 às preparações enzimáticas de β -1,3 glucanase, protease e quitinase obtidas por fracionamento com sulfato de amônio, foi testado como descrito no item 3.2.8.2.

Os dados foram analisados pelo programa MSTAT-C (1988) para a determinação da análise de variância, utilizando o delineamento experimental inteiramente casualizado. A separação entre médias dos tratamentos foi realizada usando-se o teste de Tukey com um nível de confiança de 95% ($p \leq 0,05$).

A Tabela 14 ilustra que as preparações de protease das linhagens B26 e 191 não foram capazes de lisar as células de levedura.

Utilizando-se 0,075 U/ml e 0,15 U/ml de β -1,3 glucanase da linhagem B1 na suspensão celular de levedura foi obtido, respectivamente, 3,66 e 2,69 unidades de atividade lítica (tubos 3 e 4). A adição de maior quantidade de β -1,3 glucanase da linhagem B1, resultou na diminuição da atividade lítica, isto pode ser devido à presença de proteases que atuaram agindo sobre a β -1,3 glucanase ou a presença de outros inibidores. A preparação de β -1,3 glucanase da linhagem B1 continha 2,5 U/ml de β -1,3 glucanase e 0,64 U/ml de protease.

A adição da preparação de quitinase da linhagem 191 à suspensão de levedura contendo β -1,3 glucanase resultou em aumento da atividade de lise (tubos 6 e 7). A preparação de quitinase da linhagem 191 continha 8,2 U/ml de quitinase; 0,37 U/ml de protease e 0,12 U/ml β -1,3 glucanase. A quitinase parece contribuir para a lise da parede celular de levedura.

A preparação de β -1,3 glucanase da linhagem 191 apresentou atividade de lise da levedura. O aumento da quantidade de β -1,3 glucanase da linhagem 191 (tubos 8 e 9), resultou em diminuição na atividade lítica. A preparação enzimática de β -1,3 glucanase da linhagem 191 continha 3,6 U/ml de β -1,3 glucanase e atividade

não detectável de protease e quitinase, determinadas de acordo com os métodos descritos no item 3.2.5. A preparação de β -1,3 glucanase parece conter inibidores ou atividade de protease que não foi detectada pelo método de hidrólise de caseína e medida da absorbância do hidrolisado filtrado a 280 nm.

A adição da preparação de quitinase da linhagem 191 na suspensão de células de leveduras e β -1,3 glucanase da linhagem 191, resultou em aumento da atividade lítica (tubos 10, 11 e 12). O aumento da quantidade de β -1,3 glucanase no tubo de reação e mantendo a mesma quantidade de quitinase (tubo 11 e 12), resultou em diminuição da atividade lítica.

A preparação de quitinase da linhagem 191 apresentou menor atividade lítica (1,71 U de atividade de lise) (tubo 13), comparada com a preparação de β -1,3 glucanase da linhagem B1 (3,66 U de atividade de lise) (tubo 3) e da linhagem 191 (3,84 U de atividade de lise) (tubo 8). Esta preparação de quitinase apresentava 8,2 U/ml de quitinase; 0,12 U/ml de β -1,3 glucanase e 0,37 U/ml de protease.

A adição da preparação de β -1,3 glucanase da linhagem B1 (0,075 U de β -1,3 glucanase por ml de suspensão celular) e da preparação de β -1,3 glucanase da linhagem 191 (0,11 U de β -1,3 glucanase por ml de suspensão celular) (tubo 14) não resultou em aumento da atividade de lise quando comparada com a adição das preparações individuais de β -1,3 glucanase.

As preparações de β -1,3 glucanase obtidas das linhagens das bactérias B1 e 191 mostraram atividade de lise da parede celular de levedura. Estas preparações obtidas dos sobrenadantes dos meios de cultura fracionados com sulfato de amônio 60% de saturação parecem conter proteases que inativam a β -1,3 glucanase ou outros inibidores, que em maior concentração diminuem a atividade de lise da β -1,3 glucanase. A purificação parcial das preparações de β -1,3 glucanase através de cromatografia de troca iônica ou filtração em gel seria interessante para eliminar estes interferentes.

*Tabela 14: Atividade de lise de *Saccharomyces cerevisiae* KL-88 das preparações de β -1,3 glucanase, protease e quitinase obtidas por fracionamento com sulfato de amônio 60% de saturação.*

Tubos	Enzimas líticas [linhagem] / Unidades de atividade / ml de suspensão de levedura	Unidades de atividade de Liticase
1	Protease [191] 0,75 U/ml	0 •J
2	Protease [B26] 0,75 U/ml	0 •J
3	β -1,3 glucanase [B1] 0,075 U/ml	3.66 •D
4	β -1,3 glucanase [B1] 0,15 U/ml	2.69 •GH
5	β -1,3 glucanase [B1] 0,075 U/ml + Quitinase [191] 0,25 U/ml	2.74 •G
6	β -1,3 glucanase [B1] 0,075 U/ml + Quitinase [191] 0,5 U/ml	4.93 •A
7	β -1,3 glucanase [B1] 0,15 U/ml + Quitinase [191] 0,5 U/ml	4.51 •B
8	β -1,3 glucanase [191] 0,11 U/ml	3.84 •C
9	β -1,3 glucanase [191] 0,22 U/ml	2.58 •H
10	β -1,3 glucanase [191] 0,11 U/ml + Quitinase [191] 0,25 U/ml	3.09 •E
11	β -1,3 glucanase [191] 0,11 U/ml + Quitinase [191] 0,5 U/ml	3.91 •C
12	β -1,3 glucanase [191] 0,22 U/ml + Quitinase [191] 0,5 U/ml	3.21 •E
13	Quitinase [191] 0,5 U/ml	1.71 •I
14	β -1,3 glucanase [B1] 0,075 U/ml + β -1,3 glucanase [191] 0,11 U/ml	2.92 •F

***Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).**

4.7- Estudo da lise de leveduras utilizando preparações enzimáticas de β -1,3 glucanase da linhagem B1 e *Cellulomonas cartae* nº191 e protease e quitinase da linhagem *Cellulomonas cartae* nº191.

A susceptibilidade das linhagens *Kluyveromyces lodderi*, *Saccharomyces cerevisiae* (levedura de panificação Fleischmann), *Saccharomyces cerevisiae* (levedura de panificação Itaiquara), *Saccharomyces cerevisiae* KL-88, *Saccharomyces diastaticus* NCYC 713, *Saccharomyces cerevisiae* NCYC 1001, *Candida glabrata* NCYC 388, *Kluyveromyces marxianus* NCYC 587 e *Hansenula mrakii* NCYC 500 às preparações enzimáticas de β -1,3 glucanase das linhagens B1 e *Cellulomonas cartae* nº191 e protease e quitinase da linhagem *Cellulomonas cartae* nº191 obtidas por fracionamento com sulfato de amônio 60% de saturação, foi testada como descrito no item 3.2.8.3.

Para estabelecer comparação entre os dados obtidos foi utilizado o delineamento experimental inteiramente casualizado. Os dados foram analisados pelo programa MSTAT-C (1988) para a determinação da análise de variância. A separação entre médias dos tratamentos foi realizada usando-se o teste de Tukey com um nível de confiança de 95% ($p \leq 0,05$).

A Tabela 15 ilustra que a preparação de β -1,3 glucanase da linhagem B1 foi capaz de lisar as linhagens de *Kluyveromyces lodderi*, *S. cerevisiae* (levedura de panificação Fleischmann), *S. cerevisiae* (levedura de panificação Itaiquara), *S. cerevisiae* KL-88, *S. diastaticus* NCYC 713, *S. cerevisiae* NCYC 1001, *Candida glabrata* NCYC 388, NCYC 587 e NCYC 500, sendo que as linhagens *Kluyveromyces marxianus* NCYC 587 e *Hansenula mrakii* NCYC 500 mostraram-se mais sensíveis a β -1,3 glucanase quando comparada com a susceptibilidade da linhagem de *S. cerevisiae* KL-88. As linhagens de leveduras *S. cerevisiae* (levedura de panificação Itaiquara) e *Candida glabrata* NCYC 388 mostraram-se mais resistentes a ação das β -1,3 glucanases da linhagem de bactéria B1.

Verificou-se que a adição de quitinase da linhagem 191 na concentração final 0,5 U/ml à suspensão celular contendo 0,075 U/ml de β -1,3 glucanase da linhagem B1 não causou aumento significativo na lise da parede celular de *S. cerevisiae* KL-88 em comparação com o tratamento em que foi utilizado apenas 0,075 U/ml de β -1,3 glucanase da linhagem B1 na suspensão de levedura.

A adição de quitinase da linhagem 191 na concentração final 0,5 U/ml à suspensão celular contendo 0,075 U de β -1,3 glucanase da linhagem B1 por ml de suspensão celular, causou diminuição estatisticamente significativa da atividade lítica das leveduras *Kluyveromyces lodderi*, leveduras de panificação Fleischmann e Itaiquara, e das leveduras *Saccharomyces diastaticus* NCYC 713 e *Saccharomyces cerevisiae* NCYC 1001.

A adição de quitinase na concentração final 0,5 U/ml da linhagem 191 à suspensão celular de *Kluyveromyces marxianus* NCYC 587 contendo 0,075 U de β -1,3 glucanase da linhagem B1 por ml de suspensão celular, não alterou a atividade de lise da parede celular desta levedura, em comparação com a atividade de lise referente à utilização de somente 0,075 U de β -1,3 glucanase da linhagem B1 por ml de suspensão celular. A Tabela 15 mostra também, que a adição de quitinase na concentração final 0,5 U/ml da linhagem 191 à suspensão celular de *Hansenula mrakii* NCYC 500 e à suspensão celular de *Candida glabrata* NCYC 388, ambas contendo 0,075 U de β -1,3 glucanase por ml de suspensão celular, não tiveram efeito na atividade de lise.

O tratamento prévio das células de *Kluyveromyces marxianus* NCYC 587, *Hansenula mrakii* NCYC 500 e *Candida glabrata* NCYC 388 com protease na concentração final 0,15 U/ml, seguido do tratamento com β -1,3 glucanase não resultou em alteração na lise celular, de forma estatisticamente significativa, segundo o teste de Tukey. O tratamento prévio das células de *S. cerevisiae* KL-88 com 0,15 U de protease da linhagem 191 por ml de suspensão celular, seguido do tratamento com 0,075 U de β -1,3 glucanase por ml de suspensão celular, causou

pequeno aumento na atividade lítica. O pré-tratamento das suspensões de leveduras com protease da linhagem 191 na concentração final de 0,15 U/ml seguido do tratamento com 0,075 U de β -1,3 glucanase da linhagem B1 por ml de suspensão celular, provocou diminuição na lise da parede celular das leveduras *Kluyveromyces lodderi*, leveduras de panificação Itaiquara e Fleischmann, *Saccharomyces cerevisiae* 1001, *Saccharomyces diastaticus* NCYC 713, em relação ao tratamento individual da preparação enzimática de β -1,3 glucanase da linhagem B1, conforme o teste estatístico de comparação de médias.

Tabela 15: Estudo da lise de *Kluyveromyces lodderi*, levedura de panificação Fleischmann, levedura de panificação Itaiquara, *Saccharomyces cerevisiae* KL-88, *S. diastaticus* NCYC 713, *Saccharomyces cerevisiae* NCYC 1001, *Candida glabrata* NCYC 388, *Kluyveromyces marxianus* NCYC 587 e *Hansenula mrakii* NCYC 500 utilizando preparações enzimáticas de β -1,3 glucanase da linhagem B1, protease e quitinase da linhagem Cellulomonas cartae nº 191.

Enzimas (linhagens)		<i>K. lodderi</i>	Levedura panificação Fleischmann	Levedura. panificação Itaiquara	<i>S. cerevisiae</i> KL-88	<i>S. diastaticus</i> NCYC 713	<i>S. cerevisiae</i> NCYC 1001	<i>C. glabrata</i> NCYC 388	<i>K. marxianus</i> NCYC 587	<i>H. mrakii</i> NCYC 500
Unidades de atividade / ml de suspensão celular										
β -1,3 glucanase (B1) 0,075 U/ml		3.94 ^{*A}	5.79 ^{*A}	1.73 ^{*A}	4.19 ^{*B}	2.40 ^{*A}	2.16 ^{*A}	2.4 ^{*A}	7.36 ^{*A}	9.32 ^{*A}
β -1,3 glucanase (B1) 0,075 U/ml + Quitinase (191) 0,5 U/ml		2.41 ^{*B}	4.7 ^{*B}	1.34 ^{*B}	4.48 ^{*AB}	1.91 ^{*B}	1.36 ^{*C}	2.67 ^{*A}	7.17 ^{*A}	8.88 ^{*A}
Pré-tratamento	β -1,3 glucanase (B1) 0,075 U/ml	0.53 ^{*C}	4.38 ^{*C}	0.96 ^{*C}	4.83 ^{*A}	0.64 ^{*C}	1.73 ^{*B}	1.4 ^{*A}	7.06 ^{*A}	9.05 ^{*A}
Protease (191) 0,15 U/ml										
Pré-tratamento	β -1,3 glucanase (B1) 0,075 U/ml	0.26 ^{*D}	2.08 ^{*D}	0.84 ^{*D}	1.75 ^{*C}	0.23 ^{*D}	1.75 ^{*B}	0.0 ^{*B}	4.26 ^{*B}	7.79 ^{*B}
Protease (191) 0,75 U/ml										

* Médias seguidas da mesma letra, na mesma coluna, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey

($p \leq 0,05$).

O pré- tratamento das leveduras com maior quantidade de protease da linhagem 191 na concentração final 0,75 U/ml seguido da adição de 0,075 U de glucanase da linhagem B1 por ml de suspensão celular, causou uma diminuição mais acentuada da atividade lítica, em comparação com as leveduras somente tratadas com 0,075 U de β -1,3 glucanase da linhagem B1 por ml de suspensão celular (Tabela 15). A diminuição da lise de levedura após pré-tratamento da suspensão celular de levedura com protease na concentração final 0,75 U/ml pode ser devido à hidrólise da β -1,3 glucanase pela protease. A concentração ou proporção de protease e β -1,3 glucanase utilizada na lise da parede celular de leveduras parece ser importante, uma vez que o tratamento prévio com alta concentração de protease resultou em grande diminuição da lise de levedura.

A Tabela 16 ilustra que a preparação de β -1,3 glucanase da linhagem *Cellulomonas cartae* nº191, da mesma forma que a preparação de β -1,3 glucanase da linhagem B1, foi capaz de lisar as linhagens de *Kluyveromyces lodderi*, *S. cerevisiae* (levedura de panificação Fleischmann), *S. cerevisiae* (levedura de panificação Itaiquara), *S. cerevisiae* KL-88, *S. diastaticus* NCYC 713, *S. cerevisiae* NCYC 1001, *Candida glabrata* NCYC 388, NCYC 587 e NCYC 500, sendo que as linhagens *Kluyveromyces marxianus* NCYC 587 e *Hansenula mrakii* NCYC 500 mostraram-se mais sensíveis a β -1,3 glucanase quando comparada com a susceptibilidade da linhagem de *S. cerevisiae* KL-88. As linhagens de leveduras *S. cerevisiae* (levedura de panificação Itaiquara) e *Candida glabrata* NCYC 388 mostraram-se mais resistentes a ação das β -1,3 glucanases da linhagem *Cellulomonas cartae* nº191.

A Tabela 16 mostra que a adição de quitinase da linhagem nº191 na concentração final 0,5 U/ml à suspensão celular de *S. cerevisiae* KL-88 contendo β -1,3 glucanase (0,11 U/ml) da linhagem 191 e o pré-tratamento da suspensão celular de *S. cerevisiae* KL-88 com protease da linhagem 191 (0,15 U/ml de suspensão

celular de levedura), seguido da adição de β -1,3 glucanase da linhagem 191 (0,11 U/ml de suspensão celular de levedura), aumentou a atividade de lise celular da levedura em relação à atuação de somente β -1,3 glucanase da linhagem 191 (0,11 U/ml de suspensão celular de levedura) sobre a linhagem de levedura. O pré-tratamento da suspensão de levedura *S. cerevisiae* KL-88 com alta concentração de protease da linhagem 191 (0,75 U/ml de suspensão celular de levedura), seguido da adição de 0,11 U de β -1,3 glucanase da linhagem 191 por ml de suspensão de levedura, ocasionou diminuição na atividade de lise da levedura (1,96 U de liticase) comparada com o valor de lise utilizando somente β -1,3 glucanase (0,11 U/ml de suspensão de levedura), em que foi obtido 3,89 U de liticase.

A atividade de lise das células de *S. cerevisiae* (levedura de panificação Fleischmann) e *Kluyveromyces marxianus* NCYC 587 aumentou com a adição da quitinase (0,5 U/ml de suspensão de levedura) da linhagem nº191 à mistura de suspensão celular com β -1,3 glucanase (0,11 U/ml de suspensão de levedura) da linhagem nº191.

A adição de quitinase da linhagem nº191 (0,5 U/ml de suspensão de levedura) à suspensão de leveduras contendo 0,11 U de β -1,3 glucanase da linhagem nº191 por ml de suspensão de levedura, causou diminuição da lise das linhagens *Kluyveromyces lodderi*, *S. cerevisiae* (levedura de panificação Itaiquara), *S. diastaticus* NCYC 713 e *S. cerevisiae* 1001, em comparação com o tratamento individual de 0,11 U de β -1,3 glucanase da linhagem nº191 por ml de suspensão de levedura (Tabela 16).

A Tabela 16 ilustra também que a combinação de β -1,3 glucanase (0,11 U/ml de suspensão de levedura) e quitinase (0,5 U/mL de suspensão de levedura) não alteraram a atividade de lise das células de *Candida glabrata* NCYC 388 e *Hansenula mrakii* NCYC 500, em relação à ação isolada da β -1,3 glucanase (0,11 U/ml de suspensão de levedura).

O pré- tratamento das células de *Kluyveromyces marxianus* NCYC 587 e *Hansenula mrakii* NCYC 500 com 0,15 U de protease por ml de suspensão de levedura seguido da adição de 0,11 U de β -1,3 glucanase por ml de suspensão de levedura, não causou alteração na lise das leveduras em comparação à ação isolada de 0,11 U de β -1,3 glucanase por ml de suspensão de levedura.

Tabela 16: Estudo da lise de *Kluyveromyces lodderi*, levedura de panificação Fleischmann, levedura de panificação Itaiquara, *Saccharomyces cerevisiae* KL-88, *Saccharomyces diastaticus* NCYC 713, *Saccharomyces. cerevisiae* NCYC 1001, *Candida glabrata* NCYC 388, *Kluyveromyces marxianus* NCYC 587 e *Hansenula. mrakii* NCYC 500 utilizando preparações enzimáticas de β -1,3 glucanase, protease e quitinase da linhagem *Cellulomonas cartae* n° 191.

Enzimas (linhagens)		<i>K. lodderi</i>	Levedura de panificação Fleischmann	Levedura de panificação Itaiquara	<i>S. cerevisiae</i> KL-88	<i>S. diastaticus</i> NCYC 713	<i>S. cerevisiae</i> NCYC 1001	<i>C. glabrata</i> NCYC 388	<i>K. marxianus</i> NCYC 587	<i>H. mrakii</i> NCYC 500
Unidades de atividade / ml de suspensão celular										
β -1,3 glucanase (191) 0,11 U/ml		4.5 ^{*A}	4.78 ^{*B}	3.5 ^{*A}	3.89 ^{*B}	4.33 ^{*A}	3.88 ^{*A}	2.84 ^{*A}	7.09 ^{*B}	9.58 ^{*A}
β -1,3 glucanase (191) 0,11 U/ml + Quitinase (191) 0,5 U/ml		4.39 ^{*B}	5.64 ^{*A}	2.7 ^{*B}	4.84 ^{*A}	3.09 ^{*B}	1.81 ^{*B}	2.84 ^{*A}	7.66 ^{*A}	8.65 ^{*A}
Pré-tratamento Protease (191) 0,15 U/ml	β -1,3 glucanase (191) 0,11 U/ml	0.68 ^{*C}	3.09 ^{*D}	0.0 ^{*C}	5.07 ^{*A}	0.76 ^{*C}	0.0 ^{*C}	1.98 ^{*B}	6.76 ^{*B}	9.00 ^{*A}
Pré-tratamento Protease (191) 0,75 U/ml	β -1,3 glucanase (191) 0,11 U/ml	0.48 ^{*D}	3.19 ^{*C}	0.0 ^{*C}	1.96 ^{*C}	0.65 ^{*D}	0.0 ^{*C}	0.0 ^{*C}	4.46 ^{*C}	8.34 ^{*A}

* Médias seguidas da mesma letra ,na mesma coluna, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey (p $\leq$ 0,05).

As leveduras *K. lodderi*, levedura de panificação *Fleischmann*, *S. cerevisiae* KL-88, *S. diastaticus* NCYC 713 e *C. glabrata* NCYC 388 apresentaram menor lise quando pré-tratadas com 0,15 U de protease por ml de suspensão de levedura seguido do tratamento com 0,11 U de β -1,3 glucanase por ml de suspensão de levedura, em comparação com o tratamento somente com esta última enzima. O aumento da quantidade de protease (0,75 U/ml de suspensão de levedura) no pré-tratamento causou uma diminuição mais acentuada da lise dessas leveduras.

A levedura de panificação Itaiquara e a levedura *S. cerevisiae* NCYC 1001 apresentaram atividade lítica igual a zero quando pré-tratadas com protease na concentração final 0,15 U/ml ou 0,75 U/ml seguido do tratamento com 0,11 U/ml de β -1,3 glucanase.

Diversos pesquisadores relataram que para a lise da parede celular, a protease deve atuar primeiro (FUNATSU *et al.*,1978; KITAMURA, 1982a; OBATA,1977), ou que as enzimas líticas (proteases e β -1,3 glucanases) devem agir sinergicamente na lise da parede celular, sendo que as proteases degradam a camada externa de mananaproteína e as β -1,3 glucanases degradam a camada interna de glucana (SCOTT & SCHEKMAN,1980; ZLOTNIK *et al.*,1984; e ASENJO *et al.*,1985 e SHIMOI *et al.*,1991b)

FERRO (2002) em estudo recente, verificou que a β -1,3 glucanase purificada de *Cellulomonas cellulans* YLM-B191-1 lisou a parede celular de *S. cerevisiae* ATCC 26602 sem a necessidade de protease lítica.

4.8- Estudo da relação entre tempo de fermentação, alteração do pH do meio de cultura, crescimento do microrganismo e produção das enzimas β -1,3 glucanases, proteases líticas e quitinases pela linhagem *C. cartae* nº191 em frascos agitados a 30°C e 35°C.

O estudo da relação entre tempo de fermentação, alteração do pH do meio de cultura, produção das enzimas β -1,3 glucanase, protease e quitinase e crescimento do microrganismo da linhagem de *C. cartae* nº191 em meio de cultivo III, composto de parede celular de levedura extraída mecanicamente e sais descrito por SOARES (2002), em frascos agitados a 200 rpm e nas temperaturas de 30°C e 35°C foram realizados como descrito no item 3.2.9.1.

A Figura 6 e Tabela 17 ilustram que na fermentação da linhagem *C. cartae* nº191, em meio de cultura III em frascos agitados a 30°C, a β -1,3 glucanase foi produzida na fase exponencial de crescimento atingindo atividade máxima de 0,65 U/mL após 24 horas de fermentação. Observou-se que a atividade de β -1,3 glucanase no meio de cultura diminuiu lentamente, sendo obtido 0,61 U/mL após 72 horas de fermentação. O sobrenadante do meio de cultura obtido após 24 horas de fermentação apresentou 0,65 U/ml de β -1,3 glucanase e 0,14 U/mL de protease, sendo que não foi detectado atividade de quitinase (Tabela 17). O pH do meio de cultura não apresentou variação significativa durante a fermentação.

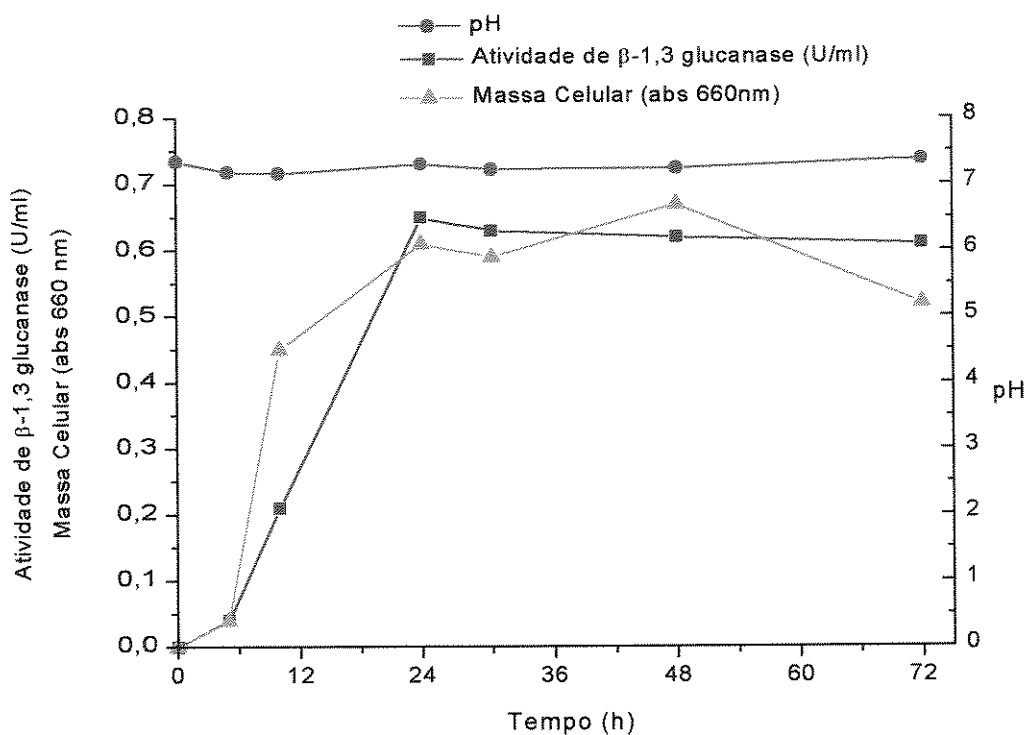


Figura 6: Estudo da produção de β -1,3 glucanase pela linhagem *Cellulomonas cartae* n°191 em meio de cultura III em frascos agitados a 30°C.

Tabela 17: Estudo da produção de β -1,3 glucanase, protease e quitinase pela linhagem *Cellulomonas cartae* n°191 em meio de cultura III em frascos agitados a 30°C.

Tempo (h)	pH	Massa Celular (abs 660 nm)	U/ml de β -1,3 glucanase	U/ml de protease	U/ml de quitinase
0	7.35	0.00	0.00	0.15	0.00
5	7.19	0.04	0.04	0.29	0.00
10	7.17	0.45	0.21	0.17	0.00
24	7.31	0.61	0.65	0.14	0.00
30	7.23	0.59	0.63	0.21	0.00
48	7.25	0.67	0.62	0.29	0.00
72	7.38	0.52	0.61	0.04	0.00

A Figura 7 e Tabela 18 ilustram que na fermentação da linhagem *C. cartae* nº191, em meio de cultura III, em frascos agitados a 35°C foi observado maior produção da β -1,3 glucanase (0,68U/mL) após 48 horas de fermentação. Não foi detectado atividade de protease e quitinase no sobrenadante do meio de cultura no período de 5 a 72 horas de fermentação (Tabela 18). O pH do meio de cultura manteve-se relativamente estável durante a fermentação.

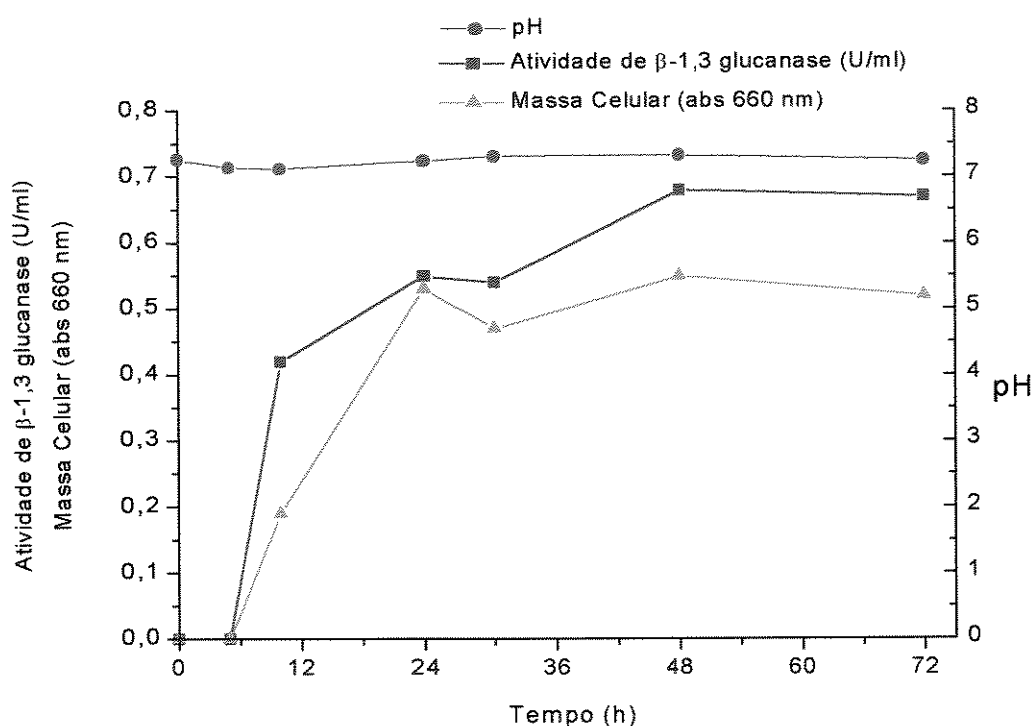


Figura 7: Estudo da produção de β -1,3 glucanase pela linhagem *Cellulomonas cartae* nº191 em meio de cultura III em frascos agitados a 35°C.

Tabela 18: Estudo da produção de β -1,3 glucanase, protease e quitinase pela linhagem *Cellulomonas cartae* n°191 em meio de cultura III em frascos agitados a 35°C.

Tempo (h)	pH	Massa Celular (abs 660 nm)	U/ml de β -1,3 glucanase	U/ml de protease	U/ml de quitinase
0	7.26	0.00	0.00	0.32	0.00
5	7.14	0.00	0.00	0.00	0.00
10	7.12	0.19	0.42	0.00	0.00
24	7.24	0.53	0.55	0.00	0.00
30	7.31	0.47	0.54	0.00	0.00
48	7.33	0.55	0.68	0.00	0.00
72	7.25	0.52	0.67	0.00	0.00

O estudo da relação entre tempo de fermentação, alteração do pH do meio de cultura, produção das enzimas β -1,3 glucanase, protease e quitinase e crescimento da linhagem de *C. cartae* n°191 em meio de cultura II, composto de levedura seca instantânea e sais, descrito por SANTOS (2002), em frascos agitados a 150 rpm e nas temperaturas de 30°e 35°C foram realizados como descrito no item 3.2.9.1.

A Figura 8 e Tabela 19 ilustram que na fermentação da linhagem *C. cartae* n°191, em meio de cultura II, em frascos agitados a 150 rpm a 30°C, a maior produção de protease lítica ocorreu, após 30 horas de fermentação, na fase estacionária. O sobrenadante do meio de cultura obtido após 30 horas de fermentação apresentou 4,25 U/mL de protease e 0,02 U/mL de β -1,3 glucanase, sendo que não apresentou atividade detectável de quitinase (Tabela 19). Não foi detectado atividade de quitinase na fermentação da linhagem *C. cartae* n°191 no meio de cultura II, em frascos agitados a 150 rpm a 30°C após 72 horas de fermentação. Durante a fermentação o pH inicial do meio de cultura diminuiu de 6,63 para 5,8 após 30 horas de fermentação.

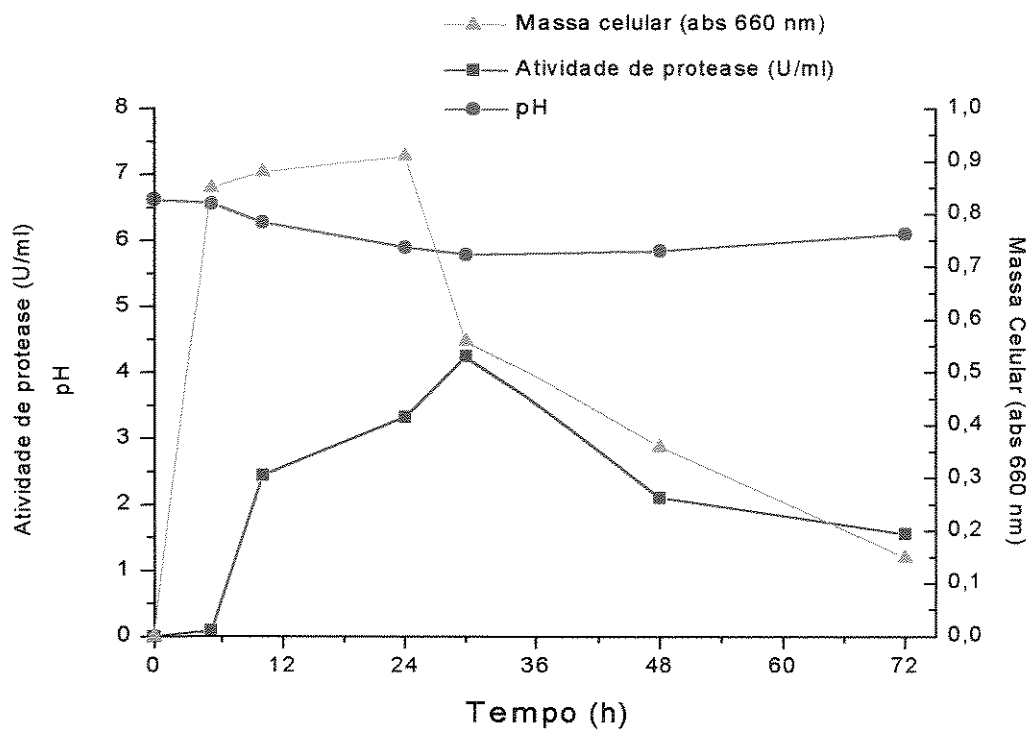


Figura 8: Estudo da produção de protease pela linhagem *Cellulomonas cartae* nº191 em meio de cultura II em frascos agitados a 30°C.

Tabela 19: Estudo da produção de protease, β -1,3 glucanase e quitinase pela linhagem *Cellulomonas cartae* nº191 em meio de cultura II em frascos agitados a 30°C.

Tempo (h)	pH	Massa Celular (abs 660 nm)	U/ml de β -1,3 glucanase	U/ml de protease	U/ml de quitinase
0	6.63	0.00	0.00	0.00	0.00
5	6.55	0.85	0.00	0.09	0.00
10	6.27	0.88	0.01	2.45	0.00
24	5.90	0.91	0.01	3.33	0.00
30	5.80	0.56	0.02	4.25	0.00
48	5.84	0.36	0.09	2.11	0.00
72	6.11	0.15	0.15	1.56	0.00

A Figura 9 e Tabela 20 ilustram que na fermentação da linhagem *C. cartae* nº191, em meio de cultura II, em frascos agitados a 150 rpm a 35°C, a maior produção de protease lítica ocorreu, após 30 horas de fermentação, após a fase estacionária. O sobrenadante do meio de cultura obtido após 30 horas de fermentação apresentou 6,34 U/mL de protease e 0,04 U/mL de β -1,3 glucanase, sendo que não apresentou atividade detectável de quitinase (Tabela 20). Não foi detectado atividade de quitinase na fermentação da linhagem *C. cartae* nº191 em meio de cultura II, em frascos agitados a 150 rpm a 35°C após 72 horas de fermentação. O pH do meio de cultura variou de 7,06 para 5,78 após 30 horas de fermentação.

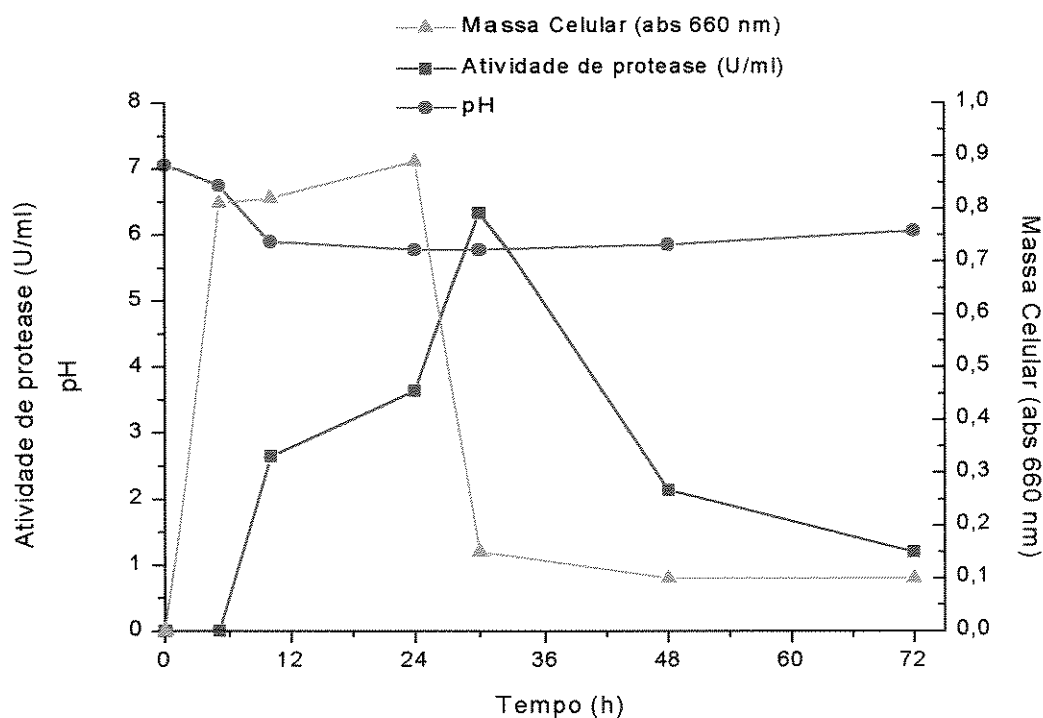


Figura 9: Estudo da produção de protease pela linhagem *Cellulomonas cartae* nº191 em meio de cultura II em frascos agitados a 35°C.

Tabela 20: Estudo da produção de protease, β -1,3 glucanase e quitinase pela linhagem *Cellulomonas cartae* nº191 em meio de cultura II em frascos agitados a 35°C.

Tempo (h)	pH	Massa Celular (abs 660 nm)	U/ml de β -1,3 glucanase	U/ml de protease	U/ml de quitinase
0	7.06	0.00	0.00	0.00	0.00
5	6.75	0.81	0.00	0.00	0.00
10	5.9	0.82	0.01	2.65	0.00
24	5.78	0.89	0.04	3.64	0.00
30	5.78	0.15	0.04	6.34	0.00
48	5.86	0.10	0.04	2.14	0.00
72	6.07	0.10	0.27	1.20	0.00

Na fermentação da linhagem *C. cartae* nº191 em meio de cultura II contendo levedura seca instantânea e sais descrito por SANTOS (2002), foi obtido maior produção de protease lítica (6,34 U/mL) na temperatura de 35°C (Figura 9), do que na fermentação a 30°C (Figura 8) em que foi obtido 4,25 U/mL.

O estudo da relação entre tempo de fermentação, alteração do pH do meio de cultura, produção das enzimas quitinase, β -1,3 glucanase e protease e crescimento da linhagem de *C. cartae* nº191 em meio de cultura IV, composto de quitina neutralizada, extrato de levedura, triptona e sais, descrito por YAMAGUCHI (2002), em frascos agitados a 150 rpm e nas temperaturas de 30°e 35°C foram realizados como descrito no item 3.2.9.1.

A Figura 10 e Tabela 21 ilustram que na fermentação da linhagem de *C. cartae* nº191 em meio de cultivo IV a 30°C a maior produção de quitinase ocorreu após 72 horas de fermentação. O sobrenadante do meio de cultura obtido após 72 horas de fermentação apresentou 0,85 U/mL de quitinase; 0,05 U/mL de β -1,3 glucanase e 0,08 U/mL de protease (Tabela 21).

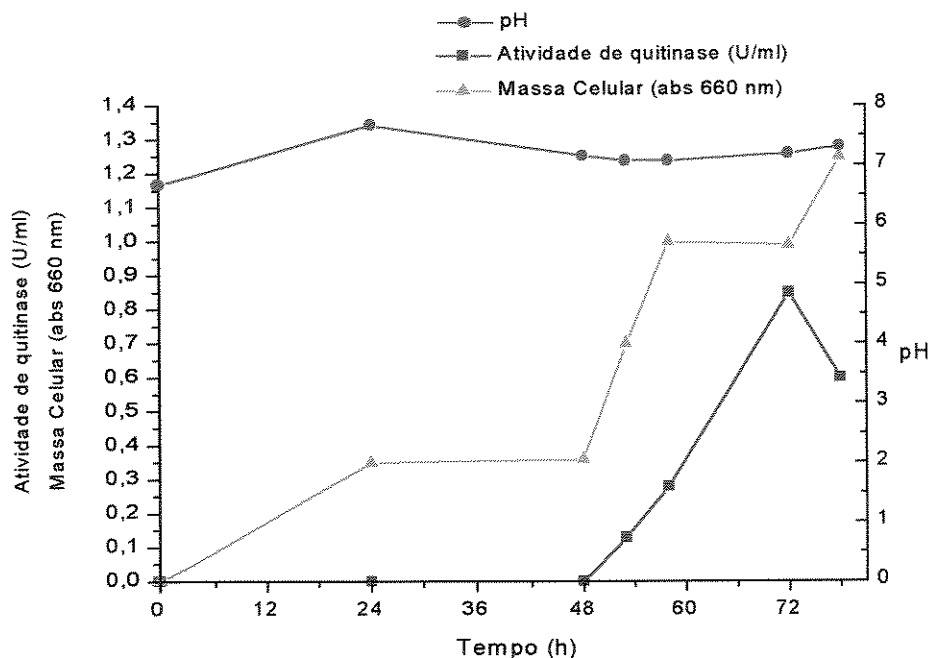


Figura 10: Estudo da produção de quitinase pela linhagem *Cellulomonas cartae* nº191 em meio de cultura IV em frascos agitados a 30°C.

Tabela 21: Estudo da produção de quitinase, β -1,3 glucanase e protease pela linhagem *Cellulomonas cartae* nº191 em meio de cultura IV em frascos agitados a 30°C.

Tempo (h)	pH	Massa Celular (abs 660 nm)	U/ml de β -1,3 glucanase	U/ml de protease	U/ml de quitinase
0	6.67	0.00	0.00	0.00	0.00
24	7.68	0.35	0.02	0.00	0.00
48	7.16	0.36	0.03	0.00	0.00
53	7.08	0.70	0.03	0.00	0.13
58	7.08	1.00	0.05	0.00	0.28
72	7.02	0.99	0.05	0.08	0.85
78	7.32	1.25	0.08	0.10	0.60

A Figura 11 e Tabela 22 ilustram que a produção máxima de quitinase pela linhagem de *C. cartae* nº191 em meio de cultura IV ocorreu após 72 horas de

fermentação a 35°C. O sobrenadante do meio de cultura obtido após 72 horas de fermentação apresentou 1,0 U/mL de quitinase; 0,05 U/mL de β -1,3 glucanase e 0,08 U/mL de protease (Tabela 22). Comparando-se a produção de quitinase no meio de cultivo IV nas temperaturas de 30°C (Figura 10 e Tabela 21) e 35°C (Figura 11 e Tabela 22), foi obtido maior produção de enzima a 35°C.

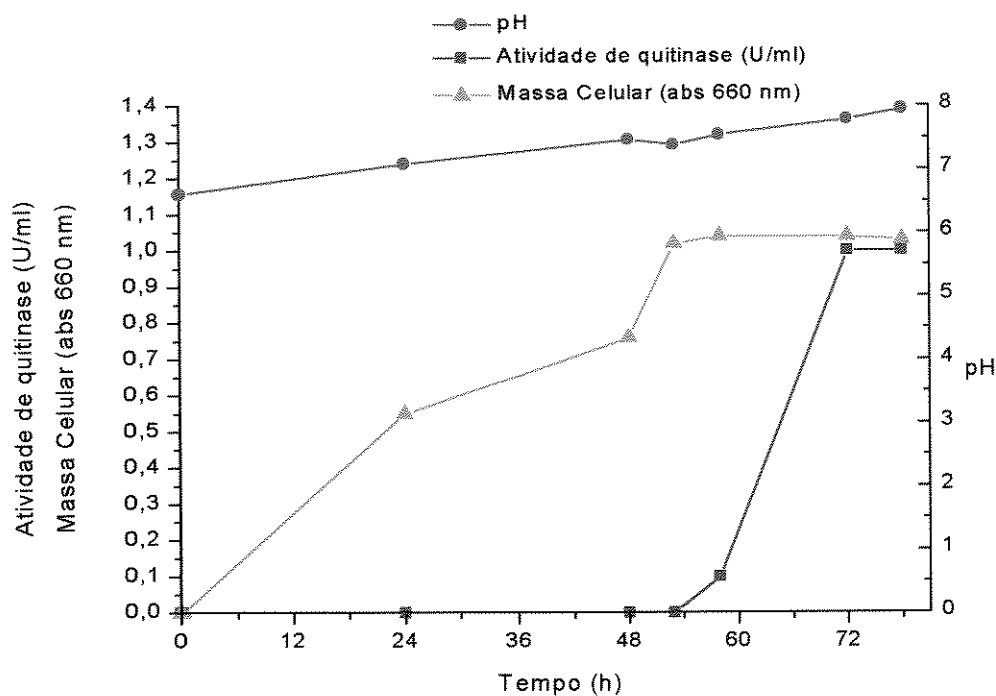


Figura 11: Estudo da produção de quitinase pela linhagem *Cellulomonas cartae* n°191 em meio de cultura IV em frascos agitados a 35°C.

*Tabela 22: Estudo da produção de quitinase, β -1,3 glucanase e protease pela linhagem *Cellulomonas cartae* nº191 em meio de cultura IV em frascos agitados a 35°C.*

Tempo (h)	pH	Massa Celular (abs 660 nm)	U/ml de β -1,3 glucanase	U/ml de protease	U/ml de quitinase
0	6.61	0.00	0.00	0.02	0.00
24	7.09	0.55	0.01	0.09	0.00
48	7.47	0.76	0.01	0.10	0.00
53	7.39	1.02	0.05	0.24	0.00
58	7.55	1.04	0.05	0.16	0.10
72	7.79	1.04	0.05	0.08	1.00
78	7.95	1.03	0.05	0.10	1.00

4.9- Obtenção da preparação enzimática de β -1,3 glucanase da linhagem *C. cartae* nº191 para a lise de leveduras.

A preparação enzimática de β -1,3 glucanase da linhagem *Cellulomonas cartae* nº191 para a lise de leveduras foi preparada como descrito no item 3.2.9.2. A preparação enzimática de β -1,3 glucanase foi fracionada com sulfato de amônio 60% de saturação e apresentou 0,75 U/ml de β -1,3 glucanase e atividade não detectável de protease e quitinase.

4.10- Aplicação da β -1,3 glucanase da linhagem *C. cartae* nº191 fracionada com sulfato de amônio 60% de saturação na lise de leveduras.

4.10.1- Planejamento experimental para a análise dos efeitos de diferentes variáveis na lise de levedura.

O planejamento fatorial completo para a análise da influência das variáveis independentes (tempo de crescimento da levedura, condições de agitação para cultivo da levedura, pH para a lise e temperatura para a lise) na lise da levedura *Saccharomyces cerevisiae* KL-88 foi realizado como descrito no item 3.2.10.1.

A Tabela 23 ilustra os valores reais das variáveis utilizadas no planejamento fatorial completo.

Tabela 23: Valores reais ou decodificados utilizados no planejamento fatorial completo.

Variáveis independentes \ Níveis	Níveis		
	-1	0	1
Temperatura (°C)	25	30	35
pH	6.5	7.5	8.5
Tempo (h)	10	20	30
Agitação (rpm)	0	100	200

Como mostra a Tabela 24 foram realizados 16 ensaios com diferentes combinações entre as variáveis estudadas e 3 repetições no ponto central, totalizando 19 experimentos.

*Tabela 24: Planejamento experimental completo codificado do estudo da lise da levedura *S. cerevisiae* KL-88 utilizando a β -1,3 glucanase da linhagem *C. cartae* n°191.*

Ensaio	Temperatura (°C)	pH	Tempo de Fermentação da levedura	Condições de agitação para crescimento da levedura	Atividade lítica (U/ml)
1	-1	-1	-1	-1	4.54
2	1	-1	-1	-1	7.08
3	-1	1	-1	-1	2.94
4	1	1	-1	-1	4.26
5	-1	-1	1	-1	0.83
6	1	-1	1	-1	2.12
7	-1	1	1	-1	1.11
8	1	1	1	-1	3.06
9	-1	-1	-1	1	2.75
10	1	-1	-1	1	4.08
11	-1	1	-1	1	2.13
12	1	1	-1	1	3.49
13	-1	-1	1	1	1.16
14	1	-1	1	1	2.21
15	-1	1	1	1	2.01
16	1	1	1	1	2.12
17	0	0	0	0	3.42
18	0	0	0	0	3.12
19	0	0	0	0	3.39

A Tabela 24 ilustra que quando a levedura *S. cerevisiae* KL-88 foi submetida à ação da enzima lítica β -1,3 glucanase nas condições do ensaio 2 (10 horas de crescimento estático da levedura e pH 6,5 e 35°C na determinação da atividade lítica), foi obtida a maior atividade lítica (7,08 U/ml), dentre as condições relatadas no planejamento experimental.

A Tabela 25 apresenta os efeitos das variáveis (temperatura para a lise da levedura, pH para a lise da levedura, tempo de fermentação para a obtenção da massa celular de levedura para a lise, condições de agitação para obtenção da massa celular de levedura para a lise) sobre a atividade lítica.

A temperatura apresentou efeito positivo significativo na lise da levedura *S. cerevisiae* KL-88, desta forma verificou-se maior atividade lítica quando a temperatura foi aumentada de 25°C para 35°C.

As variáveis pH para a lise da levedura, tempo de fermentação para a obtenção da massa celular de levedura para a lise, condições de agitação para obtenção da massa celular de levedura para a lise apresentaram efeito significativo na lise da levedura, no entanto, o efeito foi negativo. Desta forma verificou-se que as condições para maior atividade de lise de levedura dentre os valores estudados foram os níveis inferiores das variáveis pH para a lise da levedura, tempo de fermentação para a obtenção da massa celular de levedura para a lise, condições de agitação para obtenção da massa celular de levedura para a lise, ou seja, pH 6,5; 10 horas para cultivo da levedura e obtenção da massa celular sem agitação dos frascos.

A interação das variáveis temperatura para a lise da levedura e agitação dos frascos para obtenção de massa celular de levedura provocaram um efeito negativo significativo; enquanto que a combinação das variáveis pH para a lise de levedura e tempo de fermentação para a obtenção da massa celular de levedura para a lise e também a combinação das variáveis tempo de fermentação para a obtenção da massa

celular de levedura para a lise e condições de agitação para obtenção da massa celular de levedura, resultaram em um efeito positivo estatisticamente na lise da levedura *S. cerevisiae* KL-88 pela preparação enzimática de β -1,3 glucanase.

Tabela 25: Estimativa dos efeitos para a atividade lítica.

	Efeito	Desvio	t(2)	P	Lim.	Lim
	U/ml	Padrão			Conf.-	Conf.+
					95%	95%
Média	2.93	0.03	78.04	0.000	2.77	3.09
1 Temperatura (L)*	1.36	0.08	16.68	0.003	1.01	1.72
2 pH (L)*	-0.45	0.08	-5.52	0.031	-0.80	-0.10
3 Tempo (L)*	-2.08	0.08	-25.37	0.001	-2.43	-1.72
4 Agitação (L)*	-0.74	0.08	-9.11	0.011	-1.10	-0.39
1L x 2L	-0.18	0.08	-2.29	0.148	-0.54	0.16
1L x 3L	-0.27	0.08	-3.29	0.081	-0.62	0.08
1L x 4L*	-0.40	0.08	-4.96	0.038	-0.76	-0.05
2L x 3L*	0.94	0.08	11.57	0.007	0.59	1.30
2L x 4L	0.34	0.08	4.19	0.052	-0.00	0.69
3L x 4L*	0.84	0.08	10.28	0.009	0.49	1.19

*Fatores estatisticamente significativos (95% de confiança).

A Tabela 26 e 27 apresentam, respectivamente, o coeficiente de regressão, o desvio padrão e os limites de confiança para a atividade lítica, e a análise de variância (ANOVA).

A Tabela 27 mostra que foi obtido coeficiente de correlação de 0,92, e o teste F foi 7,05 vezes maior que o valor tabelado, para 95% de confiança. Os parâmetros temperatura x pH, temperatura x tempo de crescimento e pH x agitação, não foram estatisticamente significativos, assim sendo, foram eliminados do modelo e adicionados à falta de ajuste.

Tabela 26: Resultados do coeficiente de regressão, desvio padrão e limites de confiança, provenientes do planejamento fatorial completo, para a atividade lítica.

	Coef. de Regressão	Desvio Padrão	Lim. Conf.- 95%	Lim Conf.+ 95%
Média	2.93	0.03	2.77	3.09
1 Temperatura (L)*	0.68	0.04	0.50	0.86
2 pH (L)*	-0.22	0.04	-0.40	-0.05
3 Tempo (L)*	-1.04	0.04	-1.21	-0.86
4 Agitação (L)*	-0.37	0.04	-0.55	-0.19
1L x 2L	-0.09	0.04	-0.27	0.08
1L x 3L	-0.13	0.04	-0.31	0.04
1L x 4L*	-0.20	0.04	-0.38	-0.02
2L x 3L*	0.47	0.04	0.29	0.65
2L x 4L	0.17	0.04	-0.00	0.34
3L x 4L*	0.42	0.04	0.24	0.59

*Fatores estatisticamente significativos (95% de confiança).

Tabela 27: Análise de variância para a atividade de liticase.

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F calculado
Regressão	35.00	3	11.66	61.36
Resíduos	2.92	15	0.19	
Falta de Ajuste	2.86	13	0.22	
Erro Puro	0.05	2	0.02	11
Total	37.93	18		

Coeficiente de correlação: $R^2 = 0,92$

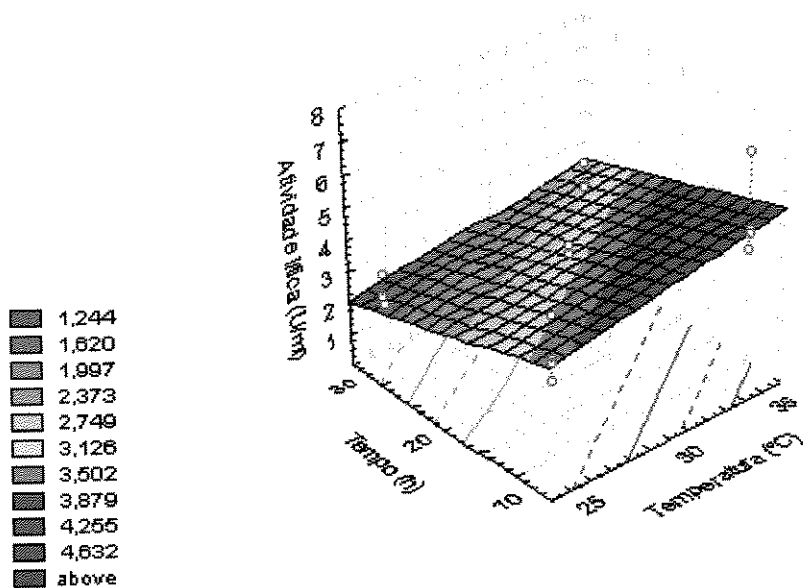
Fcalculado 0,95;3;15 = 8,7

Fcalculado/Ftabelado = 7,05

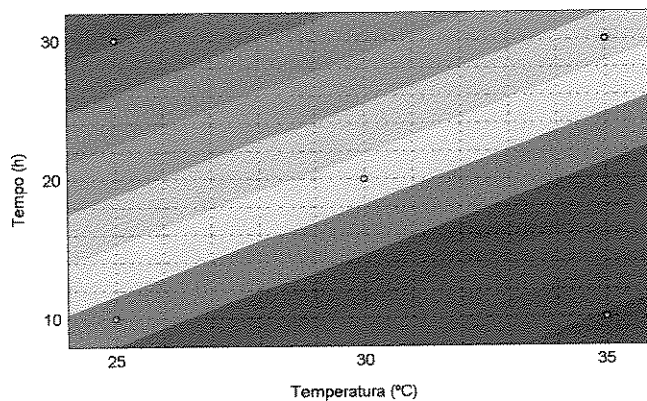
As superfícies de resposta e as curvas de contornos da resposta de atividade lítica sobre a levedura *S. cerevisiae* KL-88, foram obtidas de acordo com o modelo estatisticamente significativo a 95% de confiança, apresentado pela equação abaixo:

Equação 1:

$$\text{Atividade lítica} = 2,93 + 0,68 \cdot \text{temperatura} - 0,22 \cdot \text{pH} - 1,04 \cdot \text{tempo} - 0,37 \cdot \text{agitação} - 0,20 \cdot \text{temperatura} \cdot \text{agitação} + 0,47 \cdot \text{pH} \cdot \text{tempo} + 0,42 \cdot \text{tempo} \cdot \text{agitação}.$$



(a)



(b)

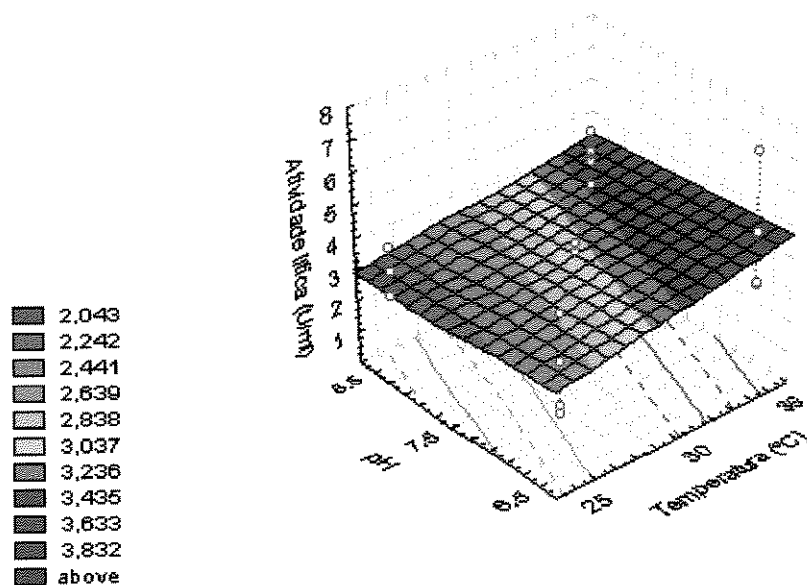
Figuras 12a e 12b: Superfícies de resposta e curvas de contorno do efeito do tempo de fermentação para a obtenção de massa celular de levedura e da temperatura da mistura de reação na lise da levedura

As Figuras 12a e 12b ilustram que foi obtido maior atividade de lise da levedura *S. cerevisiae* KL-88 pela β -1,3 glucanase, na temperatura de 35°C e utilizando-se células de levedura na fase exponencial de crescimento com 10 horas

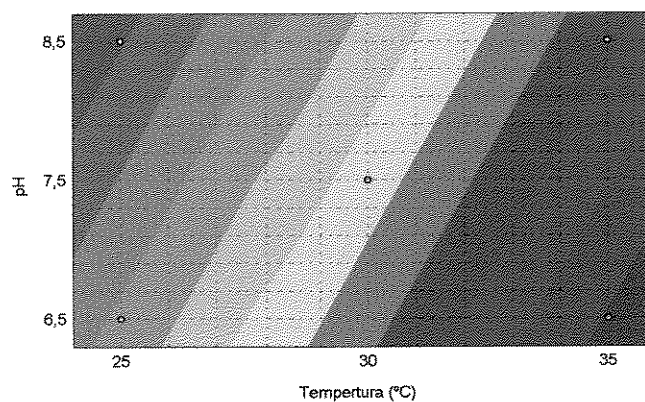
de fermentação. A Tabela 25 ilustra que a variável, tempo de fermentação para a obtenção da massa celular de levedura foi o parâmetro que exerceu maior influência na lise de leveduras (-2,08), seguido da temperatura de lise das leveduras (1,36).

KANEKO *et al.* (1973) estudaram a susceptibilidade de células de leveduras como as linhagens de *Saccharomyces* e *Candida*, à lise enzimática. Os autores verificaram que as células de leveduras são mais facilmente lisadas após tratamento térmico e que as leveduras na fase exponencial de crescimento são mais facilmente lisadas do que aquelas obtidas na fase estacionária .

Em 2002, GUILLOUX-BENATIER *et al.* estudaram a atividade de lise da β -1,3 glucanase produzida pela bactéria *Oenococcus oeni* sobre células de *Saccharomyces cerevisiae* em diferentes fases de crescimento. Os autores verificaram que a β -1,3 glucanase foi capaz de lisar células viáveis e mortas de *S. cerevisiae*, sendo que as células nas fases de crescimento exponencial e na fase estacionária, foram lisadas mais facilmente.



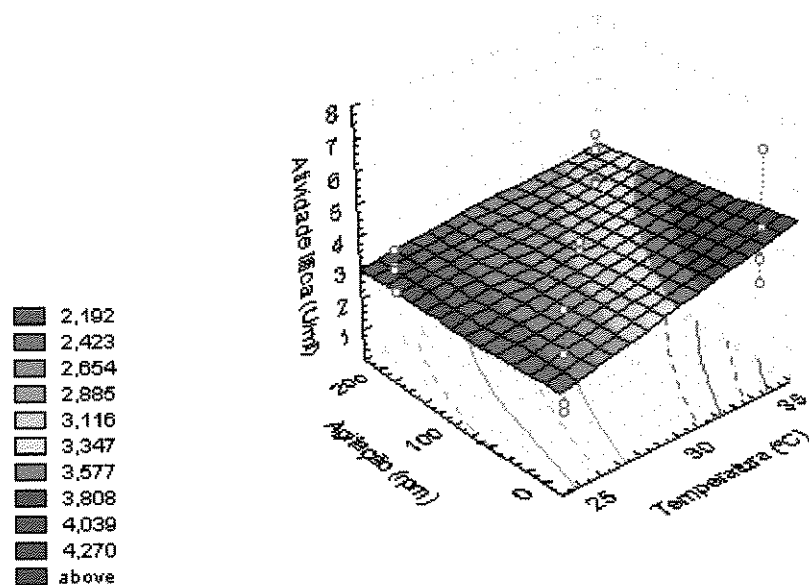
(c)



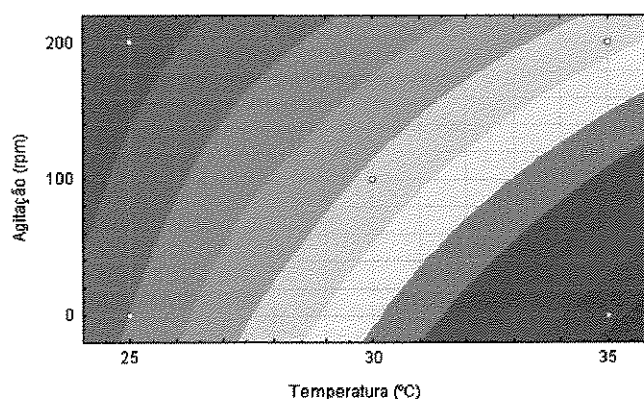
(d)

Figuras 12c e 12d: Superfícies de resposta e curvas de contorno do efeito do pH e da temperatura de mistura de reação na lise da levedura.

As Figuras 12c e 12d ilustram que a levedura *S. cerevisiae* KL-88 foi mais susceptível à lise pela β -1,3 glucanase na faixa de pH em torno de 6,5 e na temperatura ao redor de 35°C. A variável independente pH apresentou um pequeno efeito na lise da levedura estudada (-045), enquanto que a temperatura teve maior efeito na lise da parede celular do microrganismo.



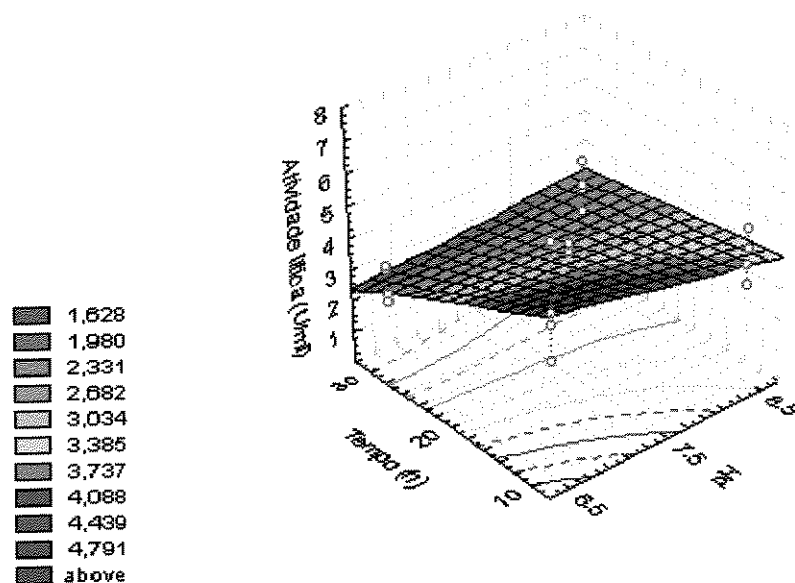
(e)



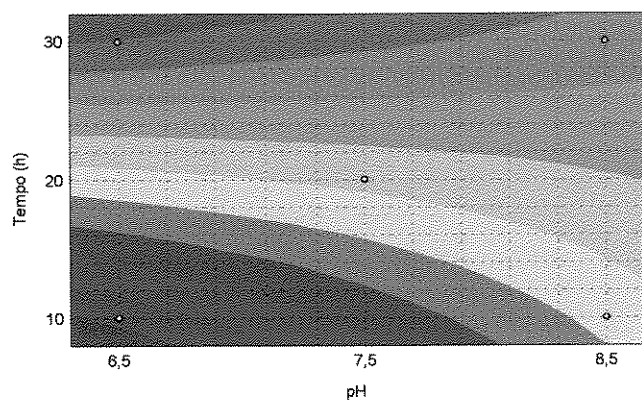
(f)

Figuras 12e e 12f: Superfícies de resposta e curvas de contorno do efeito das condições de agitação para obtenção de massa celular de levedura e da temperatura de mistura de reação na lise da levedura.

As Figuras 12e e 12f ilustram que a levedura *S. cerevisiae* KL-88 obtida de meio de cultivo sem agitação foi mais susceptível à lise pela β -1,3 glucanase e que a temperatura mais adequada para a lise foi a 35°C. A Tabela 25 ilustra que o parâmetro agitação dos frascos para obtenção de massa celular de levedura apresentou um efeito de -0,74.



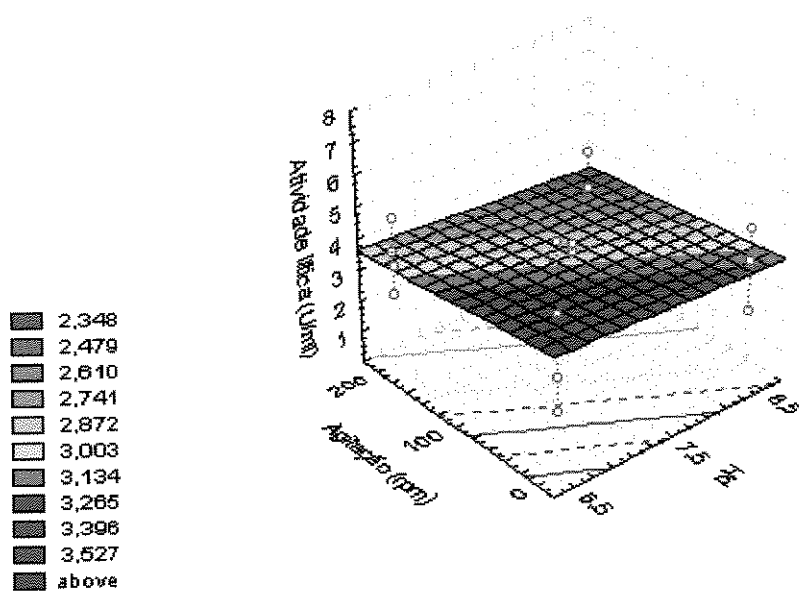
(g)



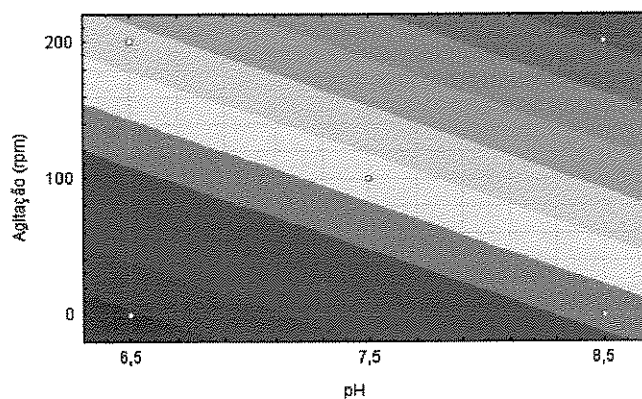
(h)

Figuras 12g e 12h: Superfícies de resposta e curvas de contorno do efeito do tempo de fermentação para a obtenção da massa celular de levedura e pH da mistura de reação na lise da levedura.

As Figuras 12g e 12h ilustram que as células de levedura obtidas na fase exponencial de crescimento são mais susceptíveis à lise pela β -1,3 glucanase e que a lise da levedura é mais eficiente em pH 6,5.



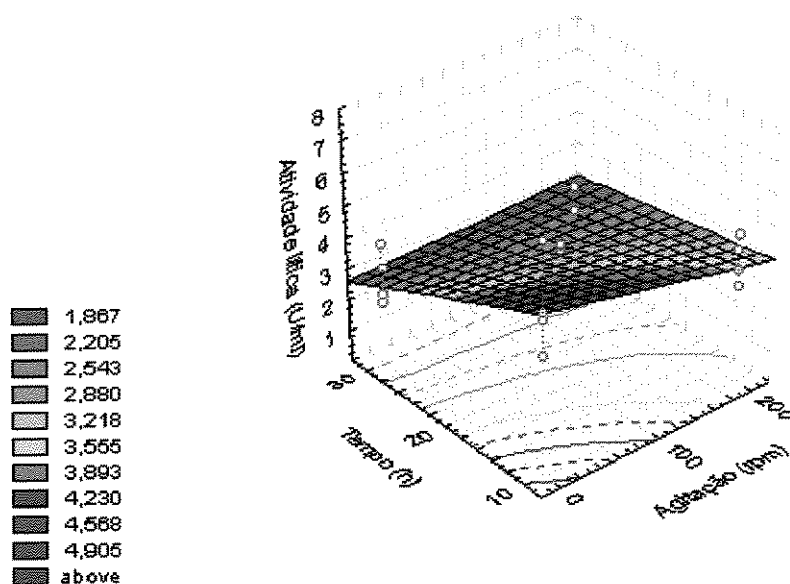
(i)



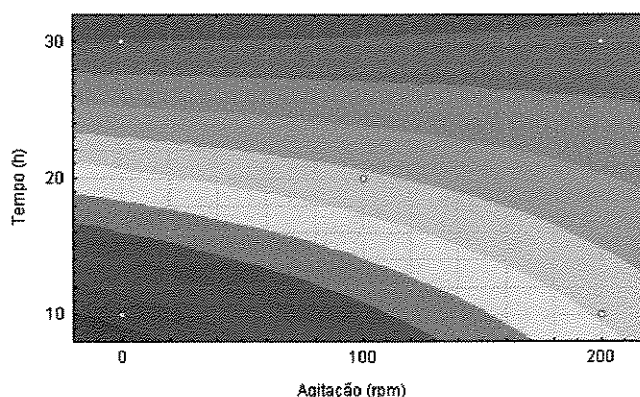
(j)

Figuras 12i e 12j: Superfícies de resposta e curvas de contorno do efeito das condições de agitação para obtenção de massa celular de levedura e do pH da mistura de reação na lise da levedura.

As Figuras 12i e 12j mostram que os níveis inferiores das variáveis agitação dos frascos para obtenção de massa celular de levedura e pH para a lise, dentre os valores estudados, apresentaram maior efeito na lise da parede celular da levedura *S. cerevisiae* KL-88 pela preparação enzimática de β -1,3 glucanase de *C. cartae* nº191.



(k)



(l)

Figuras 12k e 12l: Superfícies de resposta e curvas de contorno do efeito do tempo de fermentação para a obtenção de massa celular de levedura e das condições de agitação para a obtenção da massa celular de levedura para a lise da levedura.

As Figuras 12k e 12l ilustram que as células de leveduras obtidas após 10 h de fermentação e sem agitação dos frascos mostraram-se mais susceptíveis à lise enzimática pela preparação enzimática de β -1,3 glucanase de *C. cartae* nº191.

4.10.2- Estudo do efeito da cisteína e β -mercaptoetanol na lise da levedura *S. cerevisiae* KL-88.

Os efeitos dos compostos cisteína e β -mercaptoetanol, nas concentrações 1, 10 e 100 mM, na lise enzimática da levedura *S. cerevisiae* KL-88 pela β -1,3 glucanase da linhagem *C. cartae* nº191, foi testado como descrito no item 3.2.10.2.

A análise dos dados foram realizados pelo programa MSTAT-C (1988) usando o teste de Tukey a 95% de confiança.

Como mostra a Tabela 28 a maior atividade de lise (19,54 U/ml) ocorreu na mistura de reação contendo 1mM de cisteína e 0,11 U de β -1,3 glucanase por ml de suspensão de levedura. A aplicação de 10 mM de cisteína juntamente com 0,11 U de β -1,3 glucanase por ml de suspensão de levedura, resultou em pequeno aumento da atividade de lise da levedura em comparação com a ação individual de 0,11 U de β -1,3 glucanase por ml de suspensão de levedura. A atividade lítica da levedura pela preparação de 0,11 U de β -1,3 glucanase por ml de suspensão de levedura e 100 mM de cisteína foi nula. Altas concentrações de cisteína parecem inibir a atividade da enzima lítica β -1,3 glucanase.

A adição de 1 mM de β -mercaptoetanol na suspensão celular contendo 0,11 U/ml de β -1,3 glucanase aumentou a atividade de lise de *S. cerevisiae* KL-88, em comparação a ação isolada da enzima lítica. Concentrações maiores do reagente, como 10 e 100 mM, provocaram um acréscimo estatisticamente igual na atividade lítica do microrganismo (Tabela 28).

Segundo DOI *et al.* (1973), a β -1,3-glucanase I produzida por microrganismos do gênero *Arthrobacter* causa lise em células jovens de leveduras na presença de β -mercaptoetanol e 0,6 M de KCl.

Segundo KANEKO *et al.* (1973), as células de leveduras são mais susceptíveis à lise enzimática quando tratadas com 2-mercaptoetanol ou cisteína.

A fração A da preparação comercial Zymolyase, composta por uma β -1,3

glucanase, é capaz de causar lise da parede celular de leveduras somente na presença de 2-mercaptoetanol. Segundo KITAMURA (1982a) o 2-mercaptoetanol exerce o papel de uma protease lítica, destruindo a camada externa de mananaproteína da parede celular e permitindo o acesso da β -1,3 glucanase à camada de glucana.

No presente estudo, verificou-se que a β -1,3 glucanase da linhagem *C. cartae* nº191 foi capaz de lisar células viáveis de leveduras sem a necessidade de cisteína e β -mercaptoetanol, no entanto, a lise da levedura *S. cerevisiae* KL-88 foi aumentada em aproximadamente 10 U/ml de atividade lítica quando tratada com β -1,3 glucanase e 1 mM de cisteína.

Tabela 28: Estudo do efeito da cisteína e β -mercaptoetanol nas concentrações de 1, 10 e 100 mM, utilizando β -1,3 glucanase da linhagem *C. cartae* nº191 sobre a levedura *S. cerevisiae* KL-88.

Testes	Atividade lítica (U/ml)	Testes	Atividade lítica (U/ml)
β -1,3 glucanase (0,11 U/ml de suspensão de levedura)	9.81 *C	β -1,3 glucanase (0,11 U/ml de suspensão de levedura)	7.64 *A
1 mM de cisteína + β -1,3 glucanase (0,11 U/ml de suspensão de levedura)	19.54 *A	1 mM de β -mercaptoetanol + β -1,3 glucanase (0,11 U/ml de suspensão de levedura)	8.63 *B
10 mM de cisteína + β -1,3 glucanase (0,11 U/ml de suspensão de levedura)	10.06 *B	10 mM de β -mercaptoetanol + β -1,3 glucanase (0,11 U/ml de suspensão de levedura)	9.08 *C
100 mM de cisteína + β -1,3 glucanase (0,11 U/ml de suspensão de levedura)	0 *D	100 mM de β -mercaptoetanol + β -1,3 glucanase (0,11 U/ml de suspensão de levedura)	9.2 *C

*Médias seguidas da mesma letra, na mesma coluna, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

A Figura 13 mostra suspensões de células da levedura *S. cerevisiae* KL-88 tratadas com β -1,3 glucanase e com a ação conjunta da β -1,3 glucanase e cisteína 1 mM, após 1 hora de reação com agitação em intervalos de tempo regulares.

Verificou-se que a turbidez das suspensões de células tratadas com 0,11 U de β -1,3 glucanase por ml de suspensão de levedura e 0,11 U/ml de suspensão de levedura de β -1,3 glucanase acrescida de cisteína 1mM, é menor em relação aos seus respectivos controles, os quais não apresentam a enzima na mistura de reação.

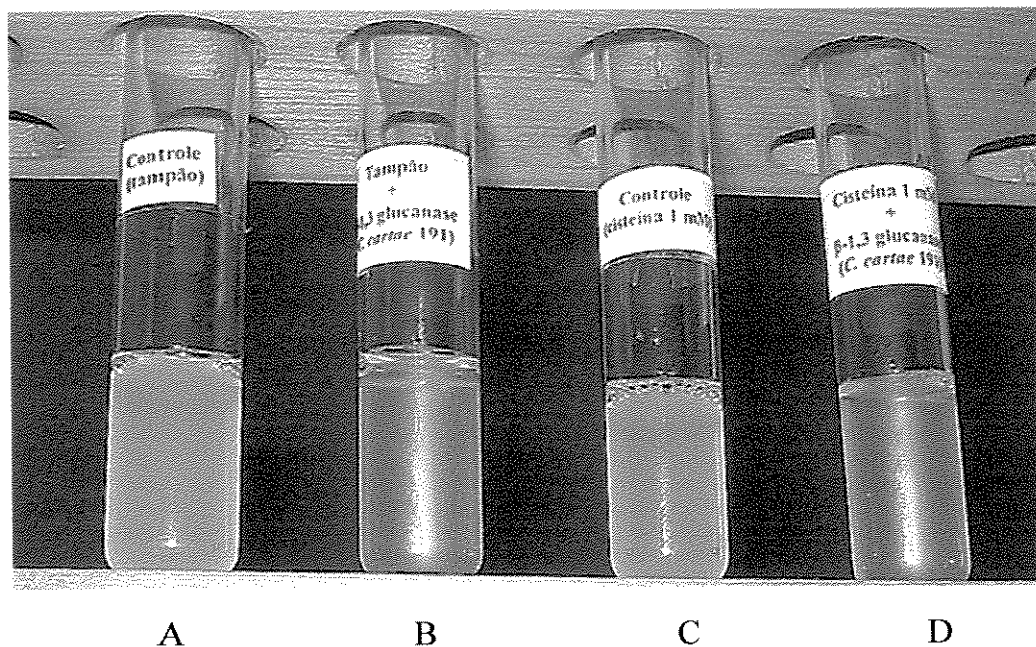


Figura 13: Lise das suspensões de células de *S. cerevisiae* KL-88 utilizando-se a enzima β -1,3 glucanase de *C. cartae* n°191 e cisteína 1 mM.

- A- Controle: Suspensão de leveduras em tampão.
- B- Teste: Suspensão de leveduras em tampão + β -1,3 glucanase de *Cellulomonas cartae* n°191.
- C- Controle: Suspensão de leveduras em tampão contendo cisteína 1mM.
- D- Teste: Suspensão de leveduras em tampão contendo cisteína 1mM + β -1,3 glucanase de *Cellulomonas cartae* n°191.

4.10.3- Extração de β -frutofuranosidase ou invertase de *Saccharomyces cerevisiae* KL-88 e *Kluyveromyces marxianus* NCYC 587.

A extração de enzimas intracelulares ou ligadas a célula através de lise enzimática de leveduras utilizando a β -1,3 glucanase de *Cellulomonas cartae* n°191 foi testada como descrito no item 3.2.10.3.

Verificou-se que a invertase ou β -frutofuranosidase de *Saccharomyces cerevisiae* KL-88 e *Kluyveromyces marxianus* NCYC 587 podem ser extraídas com o tratamento de massa celular com β -1,3 glucanase de *C. cartae* n°191.

Foi obtido 429.01 U de atividade de invertase/mg de massa celular seca de *S. cerevisiae* KL-88 e 872.64 U de atividade de invertase/mg de massa celular seca de *K. marxianus* NCYC 587, após tratamento das leveduras com a β -1,3 glucanase durante 60 minutos a 35°C.

4.10.4- Efeito do tratamento enzimático com a β -1,3 glucanase da linhagem *C. cartae* n°191 na lise de leveduras com ultra-som.

O efeito do pré-tratamento das leveduras *Saccharomyces cerevisiae* KL-88 e *Kluyveromyces marxianus* NCYC 587 com a β -1,3 glucanase, na lise da parede celular, com ultra-som, foi testado como descrito no item 3.2.10.4.

As Tabelas 29 e 30 ilustram que o pré-tratamento das leveduras *S. cerevisiae* KL-88 e *K. marxianus* NCYC 587 aumentou a susceptibilidade das leveduras ao tratamento com ultra-som. Foi obtido aumento da extração de invertase e proteínas com o tratamento prévio das leveduras.

Após tratamento ultrasônico da suspensão de *S. cerevisiae* KL-88 durante 10 e 20 segundos a 180 W foram obtidos, respectivamente 115.82 e 171.68 U de atividade de invertase/mg de massa celular seca. Após pré-tratamento com 0,11 U/ml de β -1,3 glucanase e tratamento posterior durante 10 e 20 segundos a 180 W

foram obtidos, respectivamente, 458.43 e 448.07 U de atividade de invertase/mg de massa celular seca, que correspondem a um aumento de 395.8% e 261%, respectivamente, em relação ao tratamento somente com ultra-som.

O tratamento prévio das células de *K. marxianus* NCYC 587 com a preparação enzimática de β -1,3 glucanase da linhagem *C. cartae* nº191 também aumentou a extração de invertase e proteínas das células da levedura.

Tabela 29: Aplicação da β -1,3 glucanase da linhagem C. cartae nº191 na extração de invertase de S. cerevisiae KL-88 e no tratamento das células de levedura com ultrasonicador.

Tratamentos	U de Invertase	Proteínas totais (ug/ml)
β -1,3 glucanase (0,11 U/ml de suspensão de levedura)	429.01	-
10"/180W	115.82	178.48
β -1,3 glucanase (0,11 U/ml de suspensão de levedura) + 10"/180W	458.43	404.96
20"/180W	171.68	188.4
β -1,3 glucanase (0,11 U/ml de suspensão de levedura) + 20"/180W	448.07	397.24

Tabela 30: Aplicação da β -1,3 glucanase da linhagem C. cartae nº191 na extração de invertase de K. marxianus NCYC 587 e no tratamento das células de levedura com ultrasonicador.

Tratamentos	U de Invertase	Proteínas Ttotais (ug/ml)
β -1,3 glucanase (0,11 U/ml de suspensão de levedura)	872.64	-
10"/180W	258.45	57.92
β -1,3 glucanase (0,11 U/ml de suspensão de levedura)+ 10"/180W	930.73	377.64
20"/180W	322.91	58.72
β -1,3 glucanase (0,11 U/ml de suspensão de levedura)+ 20"/180W	1088.07	379.56

5- CONCLUSÕES

As linhagens de bactérias B26 e *Cellulomonas cartae* n°191 apresentaram maior produção de protease em meio de cultura II otimizado composto de 8% de levedura seca instantânea, descrito por SANTOS (2002), entre as linhagens testadas.

As linhagens B1 e *Cellulomonas cartae* n° 191 apresentaram maior produção de β -1,3 glucanase em meio de cultura III otimizado contendo 1% de indutor parede celular de levedura obtida por rompimento mecânico, descrito por SOARES (2002), entre as linhagens testadas.

A linhagem *Cellulomonas cartae* n°191 apresentou maior produção de quitinase em meio de cultivo IV otimizado contendo 1,5% de quitina neutralizada, descrito por YAMAGUCHI (2002), entre as linhagens testadas.

Os sobrenadantes dos meios de cultura obtidos da fermentação das linhagens B1 e *Cellulomonas cartae* n°191 fermentadas em meio de cultivo III contendo 1% de levedura extraída mecanicamente em Dyno-Mill, que apresentaram alta atividade de β -1,3 glucanase, mostraram maior atividade de lise de levedura, respectivamente, 5,57 e 5,95 unidades de liticase, comparado com os sobrenadantes do meio de cultura contendo alta atividade de protease e aqueles contendo alta atividade de quitinase.

No estudo do fracionamento das enzimas líticas, a saturação do sobrenadante do meio de cultura com 60% de sulfato de amônio, foi adequada para a precipitação e obtenção de protease, β -1,3 glucanase e quitinase. A preparação de protease obtida, do sobrenadante de meio de cultura II através do fracionamento com sulfato de amônio 60% de saturação, da linhagem B26 apresentou 10,45 U/ml de protease e da linhagem 191, 11,94 U/ml de protease. A preparação de β -1,3 glucanase, obtida do sobrenadante de meio de cultura III através do fracionamento com sulfato de amônio 60% de saturação, da linhagem B1 apresentou 2,5 U/ml de β -

1,3 glucanase e 0,64 U/ml de protease e a preparação da linhagem 191 apresentou 3,6 U/ml de β -1,3 glucanase. A preparação de quitinase, obtida do sobrenadante de meio de cultura IV através do fracionamento com sulfato de amônio 60% de saturação da linhagem 191 apresentou 8,2 U/ml de quitinase, 0,12 U/ml de β -1,3 glucanase e 0,37 U/ml de protease.

As preparações de β -1,3 glucanase das linhagens B1 e *Cellulomonas cartae* n°191 obtidas do sobrenadante do meio de cultura III através de fracionamento com sulfato de amônio, apresentaram atividade de lise das leveduras *Kluyveromyces lodderi*, *Saccharomyces cerevisiae* (levedura de panificação Fleischmann), *Saccharomyces cerevisiae* (levedura de panificação Itaiquara) e sobre as linhagens “killer” *Saccharomyces cerevisiae* KL-88, *Saccharomyces diastaticus* NCYC 713, *Saccharomyces cerevisiae* NCYC 1001, *Candida glabrata* NCYC 388, *Kluyveromyces marxianus* NCYC 587 e *Hansenula mrakii* NCYC 500. As linhagens *Kluyveromyces marxianus* NCYC 587 e *Hansenula mrakii* NCYC 500 mostraram mais sensíveis a ação das β -1,3 glucanases e as linhagens de levedura Itaiquara e *Candida glabrata* NCYC 388 mostraram-se mais resistentes a ação das β -1,3 glucanases, quando comparada com a susceptibilidade das células da linhagem de *S. cerevisiae* KL-88 à preparação enzimática.

A adição da preparação de quitinase, obtida do sobrenadante do meio de cultura IV através de fracionamento com sulfato de amônio, da linhagem *Cellulomonas cartae* n°191, em alguns casos aumentou a susceptibilidade das leveduras à lise celular.

O pré-tratamento das suspensões das leveduras com a preparação de protease obtida do sobrenadante do meio de cultura II através de fracionamento com sulfato de amônio, da linhagem *Cellulomonas cartae* n°191, diminuiu a lise das leveduras principalmente quando utilizada em altas concentrações.

A maior produção de β -1,3 glucanase da linhagem *Cellulomonas cartae* n°191 em meio de cultura III (SOARES, 2002) ocorreu a 35°C após 48 horas de

fermentação a 200 rpm, apresentando 0,68 U/ml de β -1,3 glucanase no sobrenadante do meio de cultura. Entretanto, atividade de β -1,3 glucanase muito próxima (0,65 U/ml) foi obtida na fermentação do microrganismo a 30°C durante 24 horas.

A maior produção de protease da linhagem *Cellulomonas cartae* n°191 em meio de cultura II (SANTOS, 2002) ocorreu a 35°C após 30 horas de fermentação a 150 rpm, apresentando 6,34 U/ml de protease no sobrenadante do meio de cultura.

A maior produção de quitinase da linhagem *Cellulomonas cartae* n°191 em meio de cultura IV (YAMAGUCHI, 2002) ocorreu a 35°C após 72 horas de fermentação a 150 rpm, apresentando 1,00 U/ml de quitinase no sobrenadante do meio de cultura.

No estudo das superfícies de respostas e das curvas de contorno referentes ao planejamento fatorial completo, foi obtido maior atividade de lise da levedura *Saccharomyces cerevisiae* KL-88 utilizando-se a preparação enzimática de β -1,3 glucanase em pH 6,5 e a 35°C. As células de leveduras obtidas após 10 horas de fermentação em frascos sem agitação mostraram-se mais susceptíveis à lise pela β -1,3 glucanase de *C. cartae* n°191.

Foi obtido maior lise da levedura *S. cerevisiae* KL-88 quando a suspensão de células da levedura foi submetida ao tratamento com β -1,3 glucanase (0,11 U/ml de suspensão de levedura) e cisteína 1mM. Concentrações mais elevadas de cisteína e concentrações de 1, 10 e 100 mM de β -mercaptoetanol, contribuíram pouco ou não contribuíram para a lise da parede celular da levedura.

A enzima invertase intracelular ou ligada à célula de *S. cerevisiae* KL-88 e *K. marxianus* NCYC 587 foi extraída após tratamento da massa celular de levedura com β -1,3 glucanase da linhagem *C. cartae* n°191 (0,11 U/ml de suspensão de levedura), obtida por fracionamento com sulfato de amônio 60% de saturação.

O tratamento prévio das células de *S. cerevisiae* KL-88 e *K. marxianus* NCYC 587 com a enzima β -1,3 glucanase da linhagem *C. cartae* n°191, aumentou a susceptibilidade das células de levedura à lise com ultra-som.

6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALEXANDRE, H., BLANCHET, S., CHARPENTIER, C. Identification of a 49-KDa hydrophobic cell wall mannoprotein present in velum yeast which may be implicated in velum formation. **Microbiology Letters**, v. 185, p.147-150, 2000.
- ANDREWS, B. A., ASENJO, J. A. Continuous-culture studies of synthesis and regulation of extracellular $\beta(1-3)$ glucanase and protease enzymes from *Oerskovia xanthineolytica*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 30, p.628-637, 1987a.
- ANDREWS, B. A., ASENJO, J. A. Enzymatic lysis and disruption of microbial cells. **Tibtech.**, v. 5, p.273-277, 1987b.
- ARVINDEKAR, A. U., PATIL, N. B. Glycogen-a covalently linked component of the cell wall in *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, v. 19, n°2, p.131-139, 2002.
- ASENJO, J. A., ANDREWS, B. A., HUNTER, J. B., LECORRE, S. Microbial cell lytic enzyme systems: production and reaction kinetics. **Process Biochemistry**, p.159-164, 1985.
- BACON, J. S. D, DAVIDSON, E. D., JONES, D., TAYLOR, I. F. The location of chitin in the yeast cell wall. **Biochemical Journal**, v. 101, p.36-38, 1966.
- BACON, J. S. D, FARMER V.C., JONES, D., TAYLOR, I. F. The glucan components of the cell wall of baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) considered in relation its ultrastructure. **Biochemical Journal**, v. 114, p.557-567, 1969.
- BACON, J. S. D., GORDON, A. H., JONES, D., TAYLOR, I. F., WEBLEY, D. M. The separation of β -glucanases produced by *Cytophaga johnsonii* and their role in the lysis of yeast cell walls. **The Biochemical Journal**, v. 120, p.67-78, 1970.
- BIELECKI, S., WNUK, M., SZCZESNA, M., BOBOBWICZ-LASSOCINSKA, T., ANTCHAK, T., GALAS, E. 1,3- β - Glucanases from *Streptomyces* sp.1228 lytic enzyme system. **Biotechnology Letters**, v. 11, n° 4, p.281-286, 1989.
- BIELECKI, S., GALAS, E. Synergism between 1,3-beta-glucanases in yeast-cell wall zymolysis. **ACS Sympoium Series**, v. 460, p.467-477, 1991.
- BURTSEVA, Y. V., SOVA, V. V., PIVKIN, M. V., ZVYAGINTSEVA, T. N. Enzymes of carbohydrate metabolism of mycelial from marine environments. β -1,3 glucanase of the marine fungus *Chaetomium indicum*. **Biochemistry**, v. 65, n°10, p.1175-1183, 2000.

- CABIB, E., DRGON, T., DRGONOVAA, J., FORD, R. A., KOLLAR, R. The yeast cell wall, a dynamic structure engaged in growth and morphogenesis. **Biochemical Society Transactions**, v. 25, nº1, p.200-204, 1997.
- CHAUDHARY, P., KUMAR, N. N., DEOBAGKAR, D. N. The glucanases of *Cellulomonas*. **Biotechnology Advances**, v. 15, nº 2, p. 315-331, 1997.
- DOI, K., DOI, A., FUKUI, T. Purification and properties of lytic β -glucanase from an *Arthrobacter* bacterium. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 37, nº 7, p.1619-1627, 1973.
- EL-KATATNY, M. H., GUDELJ, M., ROBRA, K. H., ELNAGHY, M. A., GUBITZ, G. M. Characterization of a chitinase and an endo- β -1,3glucanase, from *Trichoderma harzanium* Rifai T24 involved in control of the phytopathogen *Sclerotium rolfsii*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.56, nº1-2, p.137-143, 2001.
- ESQUERRÉ- TUGAYÉ, M-T., BOUDART, G., DUMAS, B. Cell wall degrading enzymes, inhibitory proteins, and oligosaccharides participate in the molecular dialogue between plants and pathogens. **Plant Physiological Biochemistry**, v. 38, p.157-163, 2000.
- FERRO, L. A., SATO, H. H., YIM, D. K., PACKER, C. N., PARK, Y. H. Isolamento de microrganismos produtores de enzimas capazes de lisar a parede celular de *S. cerevisiae* – XIX Congresso Brasileiro de Microbiologia – resumo p. 145- Rio de Janeiro – RJ- 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, 2002. 175 p. Tese de Doutorado - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
- FLEET, G. H., MANNERS, D. J. Isolation and composition of an alkali-soluble glucan from the cell walls of *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of General Microbiology**, v. 94, p.180-192, 1976.
- FLEET, G. H. Composition and structure of yeast cell wall. In McGinnis, M. R. (Ed.), **Current Topics in Medical Mycology**, v. 1, Springer-Verlag, New York, p.24-56, 1985.
- FUJII, T., SHIMOI, H., IIMURA, Y. Structure of the glucan-binding sugar chain of Tip1p, a cell wall protein of *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochimica et Biophysica Acta**, p.133-144, 1999.

- FUNATSU, M., OH, H., AIZONO, T., SHIMODA, T. Protease of *Arthrobacter luteus*, properties and functional on lysis of viable yeast cells. **Agricultural and Biological Chemistry**, v.42, n°10, p.1975-1977, 1978.
- GACTO, M., VICENTE-SOLLER, J., VILLA, T. G. Characterization of an extracellular enzyme system produced *Micromonospora chalcea* with lytic activity on yeast cells. **Journal of Applied Microbiology**, v. 88, n°6, p.961-967, 2000.
- GUILLOUX-BENATIER, M., PAGEAULT, O., MAN, A., FEUILAT, M. Lysis of yeast cells by *Oenococcus oeni* enzymes. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 25, p.193-197, 2000.
- HARTLAND, R. P., VERMEULEN, C. A., KLIS, F. M., SIETSMA, J. H., WESSELS, J. G. H. The linkage of (1-3)- β -glucan to chitin during cell wall assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, v. 10, p.1591-1599, 1994.
- HASUO, T., YAMAMOTO, N., SAITO, K., TADENUMA, M. Studies on yeast-lysing microorganism (1). Isolation of a yeast-lysing microorganism from activated sludge and its characteristics. **Journal of Brewing Society of Japan**, v. 79, p.510-516, 1984.
- HAYASHI, K., SEINO, A., KASUMI, T., KUBO, N., TSUMURA, N. Bacteriolytic enzyme produced by *Streptomyces* sp. **Journal of Fermentation Technology**, v. 59, n°4, p.319-323, 1981a.
- HAYASHI, K., SEINO, A., KASUMI, T., KUBO, N., TSUMURA, N. Purification and characterization on the lytic enzyme produced by *Streptomyces rutgeersensis* H-46. **Agricultural and Biological Chemistry**, v.45, n°10, p.2289-2300, 1981b.
- HINTON, D. M., PRESSEY, R. Glucanases in fruits and vegetables. **Journal of American Society for Horticultural Science**, v. 105, n°4, p.499-502, 1980.
- HUANG, R. B., ANDREWS, B. A., ASENJO, J. A. Differential product release (DPR) of proteins from yeast: a new technique for selective product recovery from microbial cells. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 38, p.977-9985, 1991.
- HUNTER, J. B., ASENJO, J. A. Kinetics of enzymatic lysis and disruption of yeast cells: II. A simple model of lysis kinetics. **Biotechnology ang Bioengineering**, v. 30, p.481-490, 1987.
- HUNTER, J., B., ASENJO, J. A. A structured mechanistic model of the kinetics of enzymatic lysis and disruption of yeast cell. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 31, p.929-943, 1988.

- JI, C., KUC, J. Antifungal activity of cucumber β -1,3 glucanase and chitinase. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 49, p.257-265, 1996.
- JIGAMI, Y., ODANI, T. Mannosylphosphate transfer to yeast mannan. **Biochimica et Biophysica Acta-General Subjects**, v. 1424, n^o2, p.335-345, 1999.
- KANEKO, T., KITAMURA, K., YAMAMOTO, Y. Susceptibilities of yeasts to yeast cell wall lytic enzyme of *Arthrobacter luteus*. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 37, n^o10, p.2295-2302, 1973.
- KAPTEYN, J. C., VAN EGMOND, P., SIEVI, E., VAN DEN ENDE, H., MAKAROW, M., KLIS, F. M. The contribution of the o-glycosylated Pir2p/ Hsp150 to the construction of the yeast cell wall in wild-type cells and beta 1,6-glucan-deficient mutants. **Molecular Microbiology**, v. 31, n^o6, p.1835-1844, 1999a.
- KAPTEYN, J. C., VAN DEN ENDE, H., KLIS, F. M. The contribution of cell wall proteins to the organization of the yeast cell wall. **Biochimica et Biophysica Acta-General Subjects**, v. 1426, n^o 2, p.373-383, 1999b.
- KAPTEYN, J.C. The cell wall architecture of *Candida albicans* wild-type cells and cell-wall defective mutants. **Molecular Microbiology**, v. 35, p.601-611, 2000.
- KIM, Y. J., HWANG, B. K. Isolation of a basic 34 kilodalton β -1,3 glucanase with inhibitory activity against *Phytophthora capsici* from pepper stems. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 50, p.103-115, 1997.
- 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., KANEKO, T., YAMAMOTO, Y. Lysis of viable yeast cells by enzymes of *Arthrobacter luteus*. II Purification and properties of an enzyme, zymolyase, which lyses viable yeast cells. **Journal of General Applied Microbiology**, v. 20, p.323-344, 1974.
- KITAMURA, K. A protease that participates in yeast cell wall lysis during zymolyase digestion. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 46, n^o 8, p.2093-2099, 1982a.
- KITAMURA, K. A high yeast cell wall lytic enzyme - producing mutant of *Arthrobacter luteus*. **Journal of Fermentation Technology**, v. 60, n^o 3, p.253-256, 1982b.

- KLIS, F. M. Review: Cell wall assembly in yeast. **Yeast**, v.10, p.851-869, 1994.
- KOBAYASHI, R., MIWA, T., YAMAMOTO, S., NAGASAKI, S. Preparation and evaluation of an enzyme which degrades yeast cell wall. **European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 15, p.14-19, 1982.
- KOLLAR, R., PETRAKOVA, E. ASHWELL, G., ROBBINS, P.W. , CABIB, E. Architecture of the yeast cell wall- the linkage between chitin and beta (1-3) glucan. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n° 3, p.1170-1178, 1995.
- KOLLAR, R., REINHOLD, B. B., PETRAKOVA, E., YEH, H. J. C., ASWELL, G. DRGONOVA, J., KAPTEYN, J. C., KLIS, F. M., CABIB, E. Architecture of the yeast cell wall - beta 1, 6 glucan interconnects manoprotein, beta 1,3 glucan, and chitin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n° 28, p.17762-17775, 1997.
- KOPECKÁ, M., PHAFF, H. J., FLEET, G. H. Demonstration of a fibrillar component in the cell wall of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* and its chemical nature. **The Journal of Cell Biology**, v. 62, p.66-76, 1974.
- KREGER, D. R., KOPECKÁ, M. On the nature and formation of the fibrillar nets produced by protoplasts of *Saccharomyces cerevisiae* in liquid media: An electronmicroscopic, X-ray diffraction and chemical study. **Journal General Microbiology**, v. 92, p.207-220, 1976.
- KRIZKOVÁ, L., DURACKOVÁ, Z., SANDULA, J., SASINKOVÁ, V., KRAJCOVIC, J. Antioxidative and antimutagenic activity of yeast cell wall mannans in vitro. **Mutation Research**, v. 497, p.213-222, 2001.
- LAMPEN, J. O. External enzymes of yeast: their nature and formation. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.34, p.1-18, 1968.
- LECHEVALIER, H. A., LECHEVALIER, M. P. Genus *Oerskovia*. Prauser, Lechevalier & Lechevalier, p.1489.1970 in: **Bergey's Manual of Sistematic Bacteriology**, Sneath, Mair, Sharpe & Holt, v.2, ed. Willians & Willians, 1986.
- MACWILLIAM, I.C. The structure and functions of the yeast cell wall. **Journal of the Institute Brewing**, v. 76, p.525-535, 1970.
- MADA, M., HIRAO, K., KITAMURA, Y., MACHIDA, K. Lytic enzyme of basidiomycetes acting on yeast cells. Some properties o purified lytic enzyme. **Journal of the Agricultural Chemical Society of Japan**, v. 45, n°6, p.269, 1971.
- MANNERS, D. J., MASSON, A. J., PATTERSON, J. C. The structure of a β -1,3-D-

- glucan from yeast cells walls. **Biochemistry Journal**, v. 135, p.19-30, 1973.
- MORMENEO, S., RICO, H., IRANZO, M., AGUADO, C., SENTANDREU, R. Study of supramolecular structures released from the cell wall *Candida albicans* by ethylenediamine treatment. **Arch Microbiol**, v. 166, p.327-335, 1996.
- MRSA, V., ECKER, M., CAPPELLARO, C., TEPARIC, R., TANNER, W. *Saccharomyces cerevisiae* cell wall proteins. **Food Technology and Biotechnology**, v. 37, n° 1, p.21-27, 1999a.
- MRSA, V., TANNER, W. Role of NaOH-extractable cellwall proteins Ccw5p, Ccw6p, Ccw7p and Ccw8p (members of the Pir protein family) in the stability of the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. **Yeast**, v. 15, n°10A, p.813-820, 1999b.
- MSTAT-C. A microcomputer program for the design, management and analysis of agronomic research experiments. **Norway**: MSTAT Distribution, n.p., 1998.
- NAGASAKI, S., NISHIOKA, T., MORI, H., YAMAMOTO, S. 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.
- NAKAJIMA, T., KONNO, R., NISHIHARA, H., MATSUDA, K. Cell wall mutants of *Saccharomyces cerevisiae* with increased digestibility by cell wall lytic enzymes and protein extractability. **Journal of Fermentation Technology**, v. 66. n°2, p.245-250, 1988.
- NASCIMENTO, A. M. Isolamento e seleção de leveduras produtoras de fator "killer" para a aplicação na produção de bebidas alcoólicas. Campinas, 1994. 74 p. Tese de Mestrado - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
- NETO, B. D. B., SCARMINIO, I. S., BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos: planejamento e otimização de experimentos**. 3 ed. Campinas: Editora da UNICAMP, 2001.
- NORONHA, E. F., ULHOA, C. J. Characterization of a 29-KDa β -1,3 glucanase from *Trichoderma harzianum*. **Microbiology Letters**, v. 183, p.119-123, 2000.
- OBATA, T., IWATA, H., NAMBA, Y. Proteolytic enzyme from *Oerskovia* sp CK lysing viable yeast cell. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 41, n° 12, p.2387-2394, 1977a.

- 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, p.671-677, 1977b.
- OSUMI, M. The ultrastructure of yeast: cell wall structure and formation. **Micron**, v.29, n°2-3, p.207-33, 1998.
- 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.
- PATIL, R. S., GHORMADE, V., DESHPANDE, M. V. Review: Chitinolytic enzymes: an exploration. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, p.473-483, 2000.
- 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.
- PITSON, S. M., SEVIOUR, R. J., MACDOUGAL, B. M. Production of β -glucan degrading enzymes by *Acremonium* and *Cephalosporium* species. **Mycological Research**, v. 101, n°2, p.153-158, 1997a.
- PITSON, S. M., SEVIOUR, R. J., MACDOUGAL, B. M. Purification and characterization of an extracellular β -1,3-glucosidase from the filamentous fungus *Acremonium persicinum* and its probable role in β -glucan degradation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 21, n°3, p.182-190, 1997b.
- POPOLO, L., VAI, M. The gas 1 glycoprotein, a putative wall polymer cross-linker. **Biochimica et Biophysica Acta-General Subjects**, v. 1426 n°2, p.385-400, 1999.
- PROKOPAKIS, G. J., LIU, L. C. Monte Carlo simulation of the enzymatic lysis of yeast. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 53, n° 3, p.290-295, 1997.
- RÉISSIG, J.L., STROMINGER, J.L., LELOIR, L.F. A modified colorimetric method for the estimation of N-acetyl amino sugar. **Journal Biological Chemistry**, v. 217, p.959-966, 1955.
- RICHTER, G., STOLKEN, B., HAFNER, B. Enzymes in broiler feeding. **Ökologische Aspekte Extensiver Landbewirtschaftung**, p.419-422, 1992.
- RYAN, E., WARD, O. P. The application of lytic enzymes from *Basidiomycetes* *aphyllophorales* in production of yeast extract. **Process Biochemistry**, p.12-16, 1988.

- ROWLEY, B. I., BULL, A. T. Isolation of a yeast-lysing *Arthrobacter* species and the production of the lytic enzyme complex in batch and continuous-flow fermentors. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 19, p.879-899, 1977.
- SANDULA, J., KOGAN, G., KACURAKOVÁ, M., MACHOVÁ, E. Microbial (1-3)- β -glucans, their preparation, physico-chemical, characterization and immunomodulatory activity. **Carbohydrate Polymers**, v. 38, p.247-253, 1999.
- 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.
- SAHAI, A. S., MANOCHA, M. S. Chitinase of fungi and plants: their involvement in morphogenesis and host-parasite interactions. **Microbiology Review.**, v. 11, p.317-338, 1993.
- 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.
- SANDHU, D. K., WADHWA, V., BAGGA, P. S. Use of lytic enzymes for protoplast production in *Trichoderma reesei* QM9414. **Enzymes Microbial Technology.**, v. 11, 1989.
- SANTOS, B. M., SATO, H. H. Estudo da produção de β - 1,3 glucanase e protease por microrganismos que lisam parede celular de leveduras. III Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos, Unicamp-Campinas p 75, 1999.
- SANTOS, L. F. Caracterização bioquímica da protease lítica produzida por *Cellulomonas cartae* n° 191 e estudo da lise enzimática de leveduras. Campinas, 2000. 71 p. Tese de Mestrado - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
- SANTOS, L. F. Produção e aplicação de protease lítica de *Cellulomonas cartae* 191. Campinas, 2002. Em andamento. Tese de Doutorado - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
- SANTOS, B., SNYDER, M. Sbe2p, Sbe22p, two homologous Golgi proteins involved in yeast cell wall formation. **Molecular Biology of the Cell**, v. 11, n° 2, p.435-452, 2000.

- 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.
- SHIMOI, H., TADENUMA, M. Characterization of *Rarobacter faecitabidus* protease I, a yeast-lytic serina protease having mannose-binding activity. **Journal of Biochemistry**, v. 110, p.608-613, 1991a.
- SHIMOI, H., MURANAKA, Y., SATO, S., SAITO, K., TADENUMA, M. Purification of the enzymes responsible for the lysis of yeast cell by *Rarobacter faecitabidus*. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 55, p. 371-378, 1991b.
- SOARES, G. A. M. Enzimas que lisam a parede celular de leveduras – Clonagem e sequenciamento do gene da β -1,3 glucanase lítica de *Cellulomonas cartae* 191. Campinas, 2002. 113 p. Tese de Doutorado - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
- SOMOGYI, M. A. A new reagent for the determination of sugars. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 160, p.61-68, 1945.
- SOUTHARD, S. B., SPECHT, C.A., MISHRA, C., CHEN-WEINER, J., ROBBINS, P. W. Molecular analysis of the *Candida albicans* homolog of *Saccharomyces cerevisiae* MNN9, required for glycosylation of cell wall mannoproteins. **Journal of Bacteriology**, v. 181, n°24, p.7439-7448, 1999.
- STRATFORD, M. Another brick in the wall. Recent developments concerning the cell envelope. **Yeast**, v. 10, p.1741-1752, 1994.
- USUI, T., OGUCHI, M. Purification of protease from *Rhizoctonia solani* lysing yeast cell walls. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 50, n° 2, p.535-537, 1986.
- VAN DER VAART, J. M., CARO, L. H. P., CHAPMAN, J. W., KLIS, F. M., VERRIPS, C. T. Identification of three mannoproteins in the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Bacteriology**, v. 177, n°11, p.3104-3110, 1995.
- VENTOM, A. M., ASENJO, J. A. Characterization of yeast lytic enzymes from *Oerskovia xanthineolytica* LL-G109. **Enzymes Microbial Technology**, v. 13, p.71-75, 1991.
- VRANSKÁ, M., BIELY, P., KRÁTKÝ, Z. Enzymes of yeast lytic system produced by *Arthrobacter* GJM-1 bacterium and their role in the lysis of yeast cell walls. **Z. Allg. Mikrobiol.**, v. 17, p.465-480, 1977a.
- VRANSKÁ, M., KRÁTKÝ, Z., BIELY, P. Lysis of intact yeast cell and isolated cell

- walls by an inducible enzyme system of *Arthrobacter* GJM-1. **Z. Allg. Mikrobiol.**, v. 17, p.391-402, 1977b.
- WARD, J. B., PERKINS, H. R. The purification and properties of two staphylolytic enzymes from *Streptomyces griseus*. **Biochemistry Journal**, v. 106, p.69-75, 1968.
- WIWAT, C., SIWAYAPRAHM, P., BHUMIRATANA, A. Purification and characterization of chitinase from *Bacillus circulans* n. 41. **Current Microbiology**, v. 39, p.134-140, 1999.
- YAMAGUCHI, M. M. Seleção, produção e caracterização da enzima quitinase. Campinas, 2002. Em andamento. Tese de Doutorado - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
- YAMAMOTO, Y., FUJINO, S., KITAMURA, K., KANEKO, T. Preparation of yeast extract by cell wall lytic enzyme. **Journal of Fermentation Technology**, v. 52, nº11, p.828-836, 1974.
- 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, nº 10, p.1981-1989, 1975.
- YAMAMOTO, N., HASUO, T., TERAUCHI, T., SAITO, K., TADENUMA, M. Studies on yeast-lysing microorganism (3). Habitats of yeast-lysing microorganisms in waste water treatment process of food factory. **Journal of Brewing Society of Japan**, v. 79, p.828-833, 1984.
- YAMAMOTO, N., HASUO, T., SAITO, K., TADENUMA, M. Heme requirement of novel yeast-lysing bacterium. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 51, nº 6, p.1541-1545, 1987.
- YAMAMOTO, N., SATO, S., SAITO, K., HASUO, T., TADENUMA, M., SUZUKI, K., TAMAOKA, J., KOMAGATA, K. *Rarobacter faecitabidus* gen. nov., a yeast-lysing coryneform bacterium. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 38, nº 1, p.7-11, 1988.
- YAMAMOTO, N., SATO, S., MIKI, H., PARK, Y. TADENUMA, M. Isolation on yeast lysing bacteria, and a new species *Rarobacter incanus*. **Journal of General Applied Microbiology**, v. 39, p. 261-272, 1993a.
- YAMAMOTO, N., SATO, S., MIKI, H., PARK, Y. TADENUMA, M. Taxonomic studies on yeast-lysing bacteria, and a new species *Rarobacter incanus* **Journal General Applied Microbiology** v. 39, p.261-272, 1993b.

- YEO, I. H., HAN, S. K., YU, J. H., BAI, D. H. Isolation of novel alkalophilic *Bacillus alcalophilus* subsp. YB380 and the characteristics of its yeast cell wall hydrolase. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 8, n° 5, p.501-508, 1998.
- YIN, Y-L., BAIDOO, S. K., SCHULZE, H., SIMMINS, P. H. Effects of supplementing diets containing hullless barley varieties having different levels of non-starch polysaccharides with β -1,3 glucanase and xylanase on the physiological status of the gastrointestinal tract and nutrient digestibility of weaned pigs. **Livestock Production Science**, v. 71, p.97-107, 2001.
- YOKOGAWA, K., KAWATA, S., TAKEMURA, T., YOSHIMURA, Y. Purification and properties of lytic enzymes from *Streptomyces globisporus* 1829. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 39, n°8, p.1533-1543, 1975.
- YOSHIMOTO, T., TSURU, D. Studies on bacteriolytic enzymes. **Journal of Biochemistry**, v. 72, p.379-390, 1972.
- YOSHIMOTO, T., HAYASHIDA, S., YAMASAKI, H. *Pseudomonas* lytic enzyme from *Streptomyces*. **Journal of Fermentation Technology**, v. 53, n°10, p.703-712, 1975.
- 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, n° 3, p.1018-1026, 1984.
- ZHANG, Z., YUEN, G. Y. Effects of culture fluids and preinduction of chitinase production on biocontrol of *Biopolaris* leaf spot by *Stenotrophomonas maltophilia* C3. Department of plant pathology. University of Nebraska, Lincoln, Nebraska, **Published Electronically**, 2000.