

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

**CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DA PROTEASE LÍTICA
PRODUZIDA POR *Cellulomonas cartae* 191 E ESTUDO DA LISE
ENZIMÁTICA DE LEVEDURAS.**

PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por Luciana Ferracini dos Santos, aprovada pela Comissão Julgadora em 16 de março de 2000.

Campinas, 16 de março de 2000.

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

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos para a obtenção do Título de Mestre em Ciência de Alimentos.

Luciana Ferracini dos Santos - Engenheira de Alimentos

Orientadora - Profa. Dra. Hélia Harumi Sato

Campinas, Março de 2000.



UNIDADE	B c
N.º CHAMADA:	UNICAMP
	Sa 59c
V.	Ex.
TOMBO BC/	40788
PROC.	278/00
C	☐
D	☒
PREÇO	\$ 99,00
DATA	3/10/00
N.º CPD	

CM-00138975-9

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

Santos, Luciana Ferracini dos
Sa59c Caracterização bioquímica da protease lítica produzida por
Cellulomonas cartae 191 e estudo da lise enzimática de leveduras
/ Luciana Ferracini dos Santos. – Campinas, SP: [s.n.], 2000.

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

1. Cellulomonas Cartae. 2. Enzimas proteolíticas. I.Sato, Hélia Harumi.
II. Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia
de Alimentos. III.Título.

BANCA EXAMINADORA.


.....

Profa. Dra. Hélia Harumi Sato

Orientadora


.....

Profa. Dra. Gláucia Maria Pastore

Membro


.....

Profa. Dra. Lúcia Regina Durrant

Membro

.....

Prof. Dr. Yong Kun Park

Membro

Campinas, de Março de 2000.

**Ao meu marido, Cassiano Ricardo, à
minha filha, Thaís Carolina, e aos meus
pais, Arnaldo e Maria Lurdes, pelo amor,
compreensão e apoio em todos os
momentos.**

Dedico.

AGRADECIMENTOS.

À Profa. Hélia, pela orientação cuidadosa deste trabalho e por sua amizade sempre sincera e valiosa.

À minha amiga Lilian pelo exemplo de dedicação à pesquisa e pelos conhecimentos transmitidos.

Aos membros da banca examinadora, Profa. Dra. Gláucia Maria Pastore, Profa. Dra. Lúcia Regina Durrant e Prof. Dr. Yong Kun Park, por participarem da realização de mais uma etapa de minha vida.

À minha amiga Margarida, pela ajuda valiosa durante a parte experimental deste trabalho e por sua presença sempre agradável.

Ao meu marido, Cassiano Ricardo, por seu amor e à minha filha, Thaís Carolina, pela aceitação de minha ausência nos momentos mais importantes dos seus primeiros anos de vida.

Aos amigos Jamila, Marcelo, Giselle, Bia, Dora, Ana Maria, Ana Lúcia, Élen, Severino, Masaharu, Luciana, Fabiana, Ivanilton, Heinz, Mercedes, pelas constantes conversas e momentos agradáveis.

À Capes, pela concessão da bolsa de estudos e a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

ÍNDICE GERAL.

RESUMO.	i
SUMMARY.	iii
INTRODUÇÃO.	1
<u>CAPÍTULO 1</u> - LISE ENZIMÁTICA DA PAREDE CELULAR DE LEVEDURAS - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.	3
Composição da Parede Celular de Leveduras.	3
Microrganismos que Lisam a Parede Celular de Leveduras.	7
Modo de Ação das Enzimas Líticas.	14
Aplicação de Enzimas Líticas.	17
Referências Bibliográficas.	19
<u>CAPÍTULO 2</u> - CARACTERIZAÇÃO DA PROTEASE LÍTICA BRUTA DE <i>Cellulomonas cartae</i> 191.	25
Introdução.	25
Material e Métodos.	27
Reagentes.	27
Material Específico.	27
Microrganismo.	27
Produção da Protease Lítica.	27
Obtenção do Extrato Enzimático Bruto.	28
Determinação da Atividade de Protease.	28
Determinação da Cinética de Crescimento e Produção da Protease Lítica.	29
Determinação da Temperatura Ótima de Atividade da Protease Lítica Bruta.	29

Determinação do pH Ótimo de Atividade da Protease Lítica Bruta.	29
Efeito do Tratamento Térmico na Estabilidade da Protease Lítica Bruta.	30
Estabilidade da Protease Lítica Durante o Congelamento.	30
Efeito do pH na Estabilidade da Protease Lítica Bruta.	31
Efeito de Inibidores na Atividade da Protease Lítica Bruta.	31
Resultados.	32
Produção da Protease Lítica Bruta.	32
Temperatura Ótima de Atividade da Protease Lítica.	33
pH Ótimo de Atividade da Protease Lítica.	33
Efeito do Tratamento Térmico na Estabilidade da Protease Lítica.	34
Estabilidade da Protease Lítica após Tratamento em Diferentes pH.	35
Efeito do Tempo de Congelamento na Estabilidade da Protease Lítica Bruta.	36
Efeito de Inibidores na Atividade da Protease Lítica.	37
Discussão.	38
Conclusões.	41
Referências Bibliográficas.	42
<u>CAPÍTULO 3</u> – Aplicação das Enzimas Líticas de <i>Cellulomonas cartae</i> 191 na Lise da Parede Celular de Leveduras.	44
Introdução.	44
Material e Métodos.	46
Microrganismos.	46
Manutenção.	46
Indução da Produção de Enzimas Líticas.	47
Obtenção e Conservação da Preparação Enzimática Bruta.	47

Determinação das Atividades de Protease e β -1,3-glucanase na Preparação Enzimática Bruta.	47
Obtenção da Suspensão de Células de Leveduras.	48
Determinação da Atividade Lítica.	49
Estudo da Susceptibilidade de Células de <i>S. cerevisiae</i> à Lise Enzimática em Diferentes Fases de Crescimento.	49
Planejamento Experimental para a Otimização da Lise de Células de <i>S. cerevisiae</i> .	50
Estudo da Susceptibilidade de Algumas Leveduras às Enzimas Líticas de <i>Cellulomonas cartae</i> 191.	51
Resultados.	52
Obtenção da Preparação Enzimática Bruta.	52
Estudo da Susceptibilidade de Células de <i>S. cerevisiae</i> à Lise Enzimática em Diferentes Fases de Crescimento.	52
Planejamento Experimental para a Otimização da Lise de Células de <i>S. cerevisiae</i> .	53
Estudo da Susceptibilidade de Algumas Leveduras às Enzimas Líticas de <i>Cellulomonas cartae</i> 191.	56
Discussão.	58
Conclusões.	59
Referências Bibliográficas.	60
CONCLUSÕES FINAIS.	63
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.	65

ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura 2.1 - Cinética de Crescimento e Atividade da Protease Lítica Bruta.	32
Figura 2.2 - Temperatura Ótima de Atividade da Protease Lítica Bruta.	33
Figura 2.3 - pH Ótimo de Atividade da Protease Lítica Bruta.	34
Figura 2.4 - Estabilidade da Protease Lítica após 15 Minutos de Tratamento Térmico.	35
Figura 2.5 - pH de Estabilidade da Protease Lítica.	36
Figura 3.1 - Susceptibilidade de Células de Levedura <i>S. cerevisiae</i> KL 88 à Lise Enzimática em Diferentes Fases de Crescimento.	52
Figura 3.2 - Relação entre os Valores Obtidos Experimentalmente e os Valores Preditos pelo Modelo.	55
Figura 3.3 - Superfície de Resposta.	55

ÍNDICE DE TABELAS.

Tabela 1.1 - Composição da Parede Celular de Leveduras.	4
Tabela 2.1 - Estabilidade da Protease Lítica Bruta após Congelamento.	36
Tabela 2.2 - Efeito de Inibidores na Atividade da Protease Lítica Bruta.	37
Tabela 3.1 - Níveis das Variáveis Independentes Estudados.	50
Tabela 3.2 - Ensaios do Planejamento Experimental Realizado.	51
Tabela 3.3 - Resultados dos Ensaios Realizados - Planejamento Experimental.	53
Tabela 3.4 - Análise de Variância.	54
Tabela 3.5 - Atividade Lítica em Diferentes Leveduras.	56

RESUMO.

A lise enzimática de células de microrganismos é um método brando de degradação que tem se tornado atrativo para o uso na digestão de polissacarídeos e proteínas da parede celular de leveduras, produção de enzimas intracelulares, isolamento de produtos de recombinação de DNA, no tratamento de doenças provocadas por fungos e como um insumo essencial para a fusão, transformação e engenharia genética de leveduras.

A célula pode ser rompida por métodos mecânicos ou não mecânicos, como os métodos químicos ou enzimáticos. Atualmente, o método industrial mais utilizado é a ruptura mecânica de células de levedura. Mas, nas condições extremas de pressão e temperatura requeridas, as proteínas e outros produtos podem ser desnaturados ou perdidos.

Em comparação com a lise mecânica, a lise enzimática de células de levedura é um método brando e altamente seletivo.

A parede celular de leveduras consiste de duas camadas: uma externa de mananaproteína e uma camada interna de glucana. As duas camadas da estrutura da parede sugerem um processo de dois passos para a lise enzimática de leveduras, onde a camada mais externa é atacada primeiro por proteases, o que expõe a camada interna de glucana que é então atacada por glucanases.

Todavia, o custo da purificação enzimática torna o processo dispendioso. Dessa forma, o uso de extratos enzimáticos brutos consistindo de ambas as enzimas protease e glucanase, como o que é produzido por *Cellulomonas cartae*, é extremamente atrativo.

A linhagem do actinomiceto *Cellulomonas cartae* 191, capaz de lisar células viáveis de levedura *S. cerevisiae*, foi isolada de lodo de indústria de fermentação alcoólica.

Neste trabalho foram estudadas as características da protease lítica bruta produzida

por este microrganismo que apresentou pH ótimo de atividade 8,0 e temperatura ótima de atividade 50°C.

A protease lítica bruta apresentou alta estabilidade durante o congelamento e em temperaturas menores que 35°C. Cerca de 13% de sua atividade foi perdida após tratamento a 50°C por 30 minutos e toda a atividade foi perdida a 70°C por 10 minutos. A protease teve sua atividade parcialmente inibida por fenilmetanosulfonilfluoreto e por EDTA na concentração final de 1 mM.

Foram estudadas também as melhores condições de pH e temperatura para a lise de células de levedura *Saccharomyces cerevisiae* pelas enzimas líticas produzidas por *Cellulomonas cartae*, para isso utilizou-se um planejamento experimental. A melhor atividade lítica ocorreu em pH 7,0 a 7,5 e temperatura de 30 a 35°C.

As lises de outras leveduras dos gêneros: *Saccharomyces*, *Candida*, *Debaromyces*, *Kluyveromyces*, *Pichia* e *Hansenula* foram estudadas nas condições otimizadas, e apresentaram atividade lítica variável. Essas enzimas líticas não foram capazes de lisar células de *Rhodotorula rubra*.

SUMMARY.

Enzymatic lysis of microbial cells is a mild disruption method which is becoming increasingly attractive for the digestion of yeast cell wall polysaccharides and proteins, production of intracellular enzymes, isolation of recombinant DNA products, in the treatment of fungal diseases and as an essential tool for cell fusion, transformation and gene engineering of yeast.

The cell can be ruptured by mechanical or non-mechanical means, such as the chemical or enzymatic methods. Currently, the most used industrial method is the mechanical rupture of the yeast cells. However, due to the extreme conditions of high pressure and temperature proteins and other products may be lost.

Compared to mechanical rupture, enzymatic lysis of yeast cells is a gentle and highly selective method.

The yeast cell wall consists of two layers: an outer mannan-protein layer and an inner glucan layer. Both wall structure layers suggest a two-step process for the enzymatic lysis of yeast where the outer layer is first attacked by protease, which exposes the inner glucan layer, and after that is attacked by glucanase.

However, the cost of enzyme purification makes the process expensive. Thus, the use of crude enzymatic systems consisting of both protease and glucanase, such as that produced by *Cellulomonas cartae*, is extremely attractive.

Cellulomonas cartae 191 is an isolated actinomycete of sludge of alcoholic industries, capable of disrupting yeast viable cells *Saccharomyces cerevisiae*.

During the presente work, the characteristics of the crude lytic protease produced by this microorganism have been studied. It presented optimum pH value for activity 8,0 and

optimum temperature for activity 50°C.

The crude lytic protease presented high stability during freezing as well as temperature lower than 35°C. Around 13% of its activity was lost after treatment at 50°C for 30 minutes and the activity was lost at 70°C for 10 minutes. Protease had its activity partially inhibited by phenylmethylsulfonyl fluoride and by EDTA at final concentration of 1mM.

The optimum pH and temperature for yeast cell disruption *Saccharomyces cerevisiae* by the lytic enzymes produced by *Cellulomonas cartae* 191 has also been studied, for such an experimental design has been used. The best lytic activity occurred at pH 7,0 - 7,5 and 30°C -35°C.

The disruption of yeasts cell walls belonging to other genera such as *Saccharomyces*, *Candida*, *Debaromyces*, *Kluyveromyces*, *Picchia* and *Hansenula* have been studied in optimized conditions, and have presented varying lytic activity. These lytic enzymes were not capable of disrupting the *Rhodotorula rubra* cells.

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).

O polímero de manana foi identificado como um composto de manose com ligações α -1,2, α -1,3 e α -1,6 covalentemente ligadas a peptídeos formando glicopeptídeos (YAMAMOTO & NAGASAKI, 1975).

A parede celular de leveduras possui duas camadas principais: uma externa, composta pelo complexo manana-proteína, e uma interna de glucana (ANDREWS & ASENJO, 1987).

Em 1988, HUNTER & ASENJO apresentaram um modelo que considera a lise enzimática da célula de levedura como 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.

Estudos anteriores relataram que a lise celular de leveduras na fase exponencial de crescimento é mais eficiente que na fase estacionária (KANEKO et al., 1973). Os componentes da parede celular, depois de serem depositados durante sua síntese, são rearranjados para formarem um complexo integrado. Os rearranjos podem ocorrer através de glicosiltransferases as quais introduzem ramificações nos polissacarídeos lineares (HARTLAND et al., 1994).

Os microrganismos capazes de lisar a parede celular de leveduras produzem um complexo enzimático composto principalmente por β -glucanases, proteases líticas e

quitinases. Estas enzimas têm atividade ótima em temperatura e pH diferentes, e como a lise celular é decorrente da ação conjunta das enzimas, torna-se importante o estudo das melhores condições para a lise celular que não necessariamente correspondem às condições ótimas para uma dessas enzimas individualmente.

A susceptibilidade de outros gêneros de leveduras, além de *Saccharomyces*, amplia o campo de utilização dessas enzimas líticas. 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 custo da purificação enzimática restringe o uso de enzimas líticas purificadas em larga escala (LIU et al., 1988). O uso do complexo enzimático bruto consistindo de ambas as enzimas protease e β -glucanase, para a ruptura da célula em um processo único, tem sido proposto. Esta alternativa é extremamente atrativa desde que o sistema enzimático possa ser produzido com um mínimo de purificação, devido ao seu custo elevado. Todavia, a protease permanece presente na mistura após a ruptura da célula hidrolizando proteínas de interesse em peptídeos, causando degradação nos produtos. Para um processo econômico, é necessário se ajustar as condições de operação para que as perdas sejam minimizadas (PROKOPAKIS & LIU, 1997).

O objetivo deste trabalho é a caracterização bioquímica da protease lítica bruta e a otimização das condições de pH e temperatura para a lise de leveduras utilizando-se o extrato enzimático bruto de *Cellulomonas cartae*.

CAPÍTULO 1 - LISE ENZIMÁTICA DA PAREDE CELULAR DE LEVEDURAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A parede celular de levedura é composta de mananaproteína, glucana e pequena quantidade de quitina. Muitos microrganismos produzem enzimas β -1,3-glucanases e proteases que lisam a parede celular de leveduras.

As enzimas que lisam a parede celular de leveduras tem aplicação biotecnológica na preparação de protoplastos para o melhoramento genético de linhagens industriais e no aproveitamento de massa celular de leveduras, para a 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 e na obtenção de carboidratos funcionais da parede celular como a glucana.

O conhecimento do mecanismo da lise celular assim como a composição da parede celular da levedura e as características das enzimas envolvidas na lise são importantes para a otimização do processo de lise enzimática.

Composição da Parede Celular de Leveduras.

A parede celular de leveduras promove rigidez e o transporte de nutrientes para o citoplasma proporcionando a integridade, o metabolismo e crescimento celular. A composição da parede celular de leveduras é mostrada na Tabela 1.1 abaixo.

Tabela 1.1 - Composição da Parede Celular de Leveduras.

Componente	Composição (% de peso seco da célula)	Média Ponderada (% de peso seco da célula)
Glucana	30 - 45	40
Manana	30 - 45	40
Proteína (n.6,25)	10 - 25	12
Quitina	0,5 - 1,0	1
Fosfato	0,1 - 2,0	1
Lipídeo	3 - 10	6

(MacWILLIAN, 1970)

A glucana de levedura é normalmente obtida após vários tratamentos da parede celular de levedura para a remoção química da manana e glicogênio. A maior fração (cerca de 85%) é uma glucana com ligação β -1,3 com alto peso molecular contendo 3 % de ligações glicosídicas β -1,6 entre as cadeias. Enquanto que a menor fração é a glucana com ligações β -1,6 (MANNERS et al, 1973).

A parede celular de *Saccharomyces* sp. é composta principalmente por manana, proteína e glucana. LAMPEN, já em 1968, concluiu que o polímero de manana é formado por ligações α -1,2, α -1,3 e α -1,6 de unidades de manose ligadas covalentemente a peptídeos formando glicopeptídeos (citado por YAMAMOTO & NAGASAKI, 1975).

A camada de manana-proteína pode ser removida por autoclavagem, tratamento com tiol, extração com álcali ou por proteólise, mas não é removida com mananase (BACON

et al., 1970).

A manana está ligada à proteína, e esta camada 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).

ZLOTNIK et al. (1984) propuseram um modelo para a estrutura da parede celular onde a maior parte das manoproteínas estão presentes na superfície mais externa da parede, seguida por uma camada de glucana mais interna.

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).

De acordo com HARTLAND et al. (1994), a parede celular de *Saccharomyces cerevisiae* contém: (a) β -1,3-glucana, presente em duas frações, uma solúvel em álcali e outra insolúvel; (b) β -1,6-glucana, possivelmente com poucas ligações β -1,3, sendo insolúvel em álcali e solúvel em soluções diluídas de ácido; (c) quitina, cerca de 90% localizada na cicatriz de brotamento, e o restante na parede celular e (d) manoproteínas, normalmente solúveis em álcali.

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 manoproteínas 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 celular constitui cerca de 15 a 25% do peso seco da célula. Não é uma estrutura inerte mas uma organela viva. A parede celular de leveduras tem muitas funções: proteção física, estabilidade osmótica, suporte de enzimas, adesão célula/célula e barreira de permeabilidade seletiva. Os carboidratos da parede são compostos por: β -glucanas, polissacarídeos de resíduos de glicose unidos por ligações β -1,3 e β -1,6; quitina em camadas lineares de N-acetilglucosamina unidas por ligações β -1,4; e α -manana fortemente glicosilada formando manoproteínas (STRATFORD, 1994).

As frações β -1,3 solúvel e insolúvel em álcali são consideradas como uma única fração variando apenas na extensão de ligações cruzadas com quitina. As β -1,3-glucanas têm tamanho estimado de 1500 resíduos de glicose; enquanto que as β -1,6-glucanas são menores, com 150 a 200 resíduos (STRATFORD, 1994).

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

VAN DER VAART et al. (1995) dividiu as manoproteínas em dois grupos: as manoproteínas que podem ser extraídas por sódio dodecil sulfato (SDS) e as que podem ser extraídas por glucanase, 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 à glucana.

Microrganismos 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), *Rarobacter faecitabidus* (YAMAMOTO et al., 1988), *Rarobacter incanus* (YAMAMOTO et al., 1993) produzem enzimas capazes de lisar células de leveduras. Estes microrganismos tem 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).

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 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 laminaritríose, 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 e possibilitando a lise da célula. Foi observado efeito sinérgico entre F-L e F-0 ou F-L e F-2 (OBATA et al., 1977).

Ainda no mesmo trabalho, diferenças consideráveis foram observadas entre as

estabilidades térmicas das atividades lítica e proteolítica, da fração F-L. A atividade lítica era perdida após tratamento a 60°C por 15 minutos mas a atividade proteolítica permanecia inalterada. Isto sugeria que a enzima F-L poderia consistir de dois tipos de enzimas, todavia, F-L foi considerada como uma proteína única baseada em outros resultados experimentais.

ROWLEY & BULL, em 1977, isolaram um microrganismo gram negativo com grande capacidade de lisar células vivas de *Saccharomyces fragilis*, que foi identificado como *Arthrobacter*. O complexo enzimático extracelular produzido pelo microrganismo continha β -1,3-glucanase, mananase, manoidrolase e atividade proteolítica. A produção enzimática em meio de cultura não foi somente dependente do crescimento celular mas também foi influenciada pelo crescimento do substrato limitante. A produção de protease e a atividade lítica foi estudada 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 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 de microrganismos do gênero *Arthrobacter*. A Zymolyase é um complexo enzimático, composto 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 turgidez 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 A. A Zymolyase A 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) observou o 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 mutante M13-203 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 é 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.

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).

DOI & DOI, em 1986, clonaram o gene de *Arthrobacter* responsável pela expressão de β -1,3-glucanase em *Escherichia coli*.

ANDREWS & ASENJO em 1987, publicaram que as enzimas β -1,3-glucanase e protease do sistema lítico da bactéria *Oerskovia xantineolytica* 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 xantineolytica* apresentou produtividade e concentração de enzimas maiores de 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. Em culturas de *Oerskovia* sp., a glicose pode ser utilizada como meio de crescimento com concentração relativamente baixa do indutor.

YAMAMOTO et al. (1987) isolaram uma nova bactéria que lisa leveduras (YLM). A bactéria gram positiva, motil, não esporulada, anaeróbica facultativa e no formato de bastão (0,2 x 0,3 x 0,8 a 1,0 μ m) foi isolada de lodo ativado de resíduos de tratamento de água de um total de trinta e seis linhagens de bactérias similares. Estes microrganismos aderiram-se às células viáveis de todas as espécies de *Saccharomyces* e *Hansenulla*, e algumas espécies de *Candida*, aglutinaram-se com as leveduras e as lisaram. Quando as leveduras foram autoclavadas, esses microrganismos aderiram-se a elas, mas dificilmente lisaram a parede celular das mesmas.

Quando foram inoculadas misturas de YLM e leveduras em placas de ágar nutriente, as YLM lisaram as colônias de leveduras, e então, formaram colônias satélite ao redor das colônias de leveduras lisadas mas não ao redor das colônias intactas. Esses microrganismos não aderiram ou lisaram células viáveis de *Rhodotorula*, *Cryptococcus* e *Trichosporon*.

Estes microrganismos que lisam leveduras (YLM) são capazes de crescer em meio onde a única fonte de carbono e nitrogênio é a levedura e produzem as enzimas líticas na superfície das suas células (SAITO et al., 1988).

Em 1988, YAMAMOTO et al. isolaram quatro linhagens de YLM a partir de sistemas de tratamento de água. As linhagens isoladas eram não esporuladas, gram positivas, anaeróbicas facultativas e, apresentavam a forma de bastonetes irregulares móveis. A composição de bases nitrogenadas foi de 65,7 a 66,1 mol% de guanina-citosina. A composição de aminoácidos do peptideoglicano da parede celular foi : D-alanina, L-alanina, ácido D-glutâmico, L-ornitina e D-serina (1 : 1 : 2 : 1 : 1). Os autores propuseram a identificação de *Rarobacter faecitabidus* para essas novas linhagens que lisam leveduras.

RYAN & WARD (1988) publicaram que a enzima β -1,3-glucanase de *Basidiomyceto aphyllophorales* 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. aphyllophorales* em glucana isolada de levedura foi caracterizado pela alta taxa de produção de laminaribiose.

Em 1991, STRACKEBRANT & PRAUSER sugeriram que os microrganismos do gêneros *Cellulomonas*, *Oerskovia*, *Promicronospora* e *Jonesia* formassem uma nova família denominada *Cellulomonadaceae*. A partir deste momento, vários autores passaram a

considerar o gênero *Oerskovia* como sinônimo de *Cellulomonas*.

SHIMOI et al. (1991) 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 diisopropil fluorofosfato. 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 Km 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 do solo, flores, frutos e outras fontes. As flores e os frutos se mostraram ricos em bactérias que lisam leveduras, pois elas são ricas em açúcares fermentáveis e as

A bactéria *Oerskovia xanthineolytica* cresceu em meio contendo glucana insolúvel como fonte de carbono. Seu sistema de enzimas líticas 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 tem afinidade específica por manana. A enzima se associa a manana e ataca a porção protéica da camada de manana-proteína. 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 manana-proteína que deve ser degradada anteriormente pela protease para permitir a ação da β -1,3-glucanase (SCOTT & SCHEKMAN, 1980).

A Zymolyase B, uma protease produzida por *Arthrobacter luteus*, tem ação específica na parede celular devido a afinidade a 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 YEP (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-glucanases. 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).

O sistema lítico da espécie *Oerskovia xanthineolytica* foi o sistema modelo escolhido por HUNTER & ASENJO (1987) para ser estudado. 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 a ajuda de agentes tiol ou da protease lítica. A protease lítica de *Oerskovia* tem pH ótimo alcalino e peso molecular de cerca de 30.000 Da. O tratamento de células viáveis com a protease seguida pela glucanase leva à lise celular extensiva, enquanto que o tratamento na ordem inversa produz pouca ou nenhuma lise. Proteases como tripsina, pronase e quimotripsina não podem substituir a protease lítica. A protease lítica é fortemente inibida por manana solúvel, e é fracamente inibida por mananas de baixo peso molecular e mano-oligossacarídeos.

Posteriormente, em 1988, HUNTER & ASENJO apresentaram um modelo que considera a lise da célula de levedura como 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.

A protease 1 de *R. faecitabidus* se adere a porção de manana da camada de manana-proteína 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 pela bactéria (SHIMOI & TADENUMA, 1991).

PROKOPAKIS & LIU (1997) sugeriram que após a ação da protease e da glucanase sobre a parede celular da levedura, a célula se rompe devido a diferença de pressão osmótica entre o seu interior e o meio externo.

O uso do complexo enzimático bruto consistindo de ambas as enzimas protease e glucanase, de *Oerskovia* sp. ou *Cytophaga* sp., para a ruptura da célula em um processo único, foi proposto em trabalhos anteriores. Esta alternativa é extremamente atrativa desde que o sistema enzimático possa ser produzido com um mínimo de purificação, devido ao seu custo elevado. Todavia, a protease permanece presente na mistura após a ruptura da célula hidrolisando proteínas de interesse em peptídeos, causando degradação nos produtos. Para um processo econômico, é necessário ajustar as condições de operação para que as perdas sejam minimizadas (PROKOPAKIS & LIU, 1997).

Aplicação de Enzimas Líticas.

KOBAYASHI et al. (1982) estabeleceram uma metodologia para a produção e obtenção de enzimas do microrganismo *Rhizoctonia* sp. que lisam parede celular de leveduras em escala comercial. Quando as células de leveduras foram tratadas com as enzimas, a digestibilidade delas na ração animal foi aumentada em 1,4 a 2 vezes "in vitro", a eficiência de um desintegrador mecânico para extração de substâncias celulares foi aumentada em 35 a 50%, foi induzido o aumento da variação do grau de polimerização na extração de glucana solúvel, e foi facilitada em duas a três vezes a extração de proteína celular.

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).

Referências Bibliográficas.

ANDREWS, B. A., and ASENJO, J. A. Continuous-culture studies of synthesis and regulation of extracellular $\beta(1-3)$ glucanase and protease enzymes from *Oerskovia xanthineolytica*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 30, p. 628-637, 1987.

ASENJO, J. A., ANDREWS, B. A., HUNTER, J. B., and LECORRE, S. Microbial cell lytic enzyme systems: production and reaction kinetics. **Process Biochemistry**, October, p. 159-164, 1985.

BACON, J. S. D., GORDON, A. H., JONES, D., TAYLOR, I. F., and 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.

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.

DOI, K., and DOI, A. Cloning and expression in *Escherichia coli* of the gene for an *Arthrobacter* $\beta(1-3)$ -glucanase. **Journal of Bacteriology**, v. 168, nº 3, p. 1272-1276, 1986.

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.

FUNATSU, M., OH, H., AIZONO, Y., and SHIMODA, T. Protease of *Arthrobacter luteus*, properties and function on lysis of viable yeast cell. **Agricultural and Biological Chemistry**,

v. 42, n° 10, p. 1975-1977, 1978.

HARTLAND, R. P., VERMEULEN, C. A., KLIS, F. M., SIETSMA, J. H. and 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., and 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.

HUNTER, J. B., and ASENJO, J.A. Kinetics of enzymatic lysis and disruption of yeast cells: II. A simple model of lysis kinetics. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 30, p. 481-490, 1987.

HUNTER, J., B., and 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.

KANEKO, T., KITAMURA, K., and YAMAMOTO, Y. Susceptibilities of yeasts to yeast cell wall lytic enzyme of *Arthrobacter luteus*, **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 37, n° 10, p. 2295-2302, 1973.

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., and 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° 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° 3, p. 253-256, 1982b.

KOBAYASHI, R., MIWA, T., YAMAMOTO, S., and 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.

MACWILLIAM, I. C. The structure, synthesis and function of the yeast cell wall - a review. **Journal of the Institute Brewing**, v. 76, p. 524- 535, 1970.

MANNERS, D. J., MASSON, A. J. and PATTERSON, J. C. The structure of a β -(1-3)-D-glucan from yeast cell walls. **The Biochemical Journal**, v. 135, p. 19-30, 1973.

NAGASAKI, S., NISHIOKA, T., MORI, H., and 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.

OBATA, T., IWATA, H., and NAMBA, Y. Proteolytic enzyme from *Oerskovia* sp CK lysing viable yeast cell. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 41, n° 12, p. 2387-2394, 1977.

PROKOPAKIS, G. J., and LIU, L. C. Monte carlo simulation of the enzymatic lysis of yeast. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 53, n° 3, p 290-295, 1997.

ROWLEY, B. I., AND 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.

RYAN, E., and WARD, O. P. The application of lytic enzymes from *Basidiomycetes* *aphyllophorales* in production of yeast extract. **Process Biochemistry**., February, p. 12-16, 1988.

SAITO, K., HASUO, T., YAMAMOTO, N., and TADENUMA, M. Yeast-lytic enzymes of *Rarobacter faecitabidus* YLM-1. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 52, n° 7, p. 1849-1850, 1988.

SCOTT, J. H., and 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., MURANAKA, Y., SATO, S., SAITO, K., and Tadenuma, M. Purification of the enzymes responsible for the lysis of yeast cell by *Rarobacter faecitabidus*. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 55, n° 2, p. 371-378, 1991.

SHIMOI, H., and 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, 1991.

STACKEBRANT, E., and PRAUSER, H. Assignment of genera *Cellulomonas*, *Oerskovia*, *Promicronospora* and *Jonesia* to *Cellulomonadaceae* fam. nov. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 14, p. 261-265, 1991.

STRATFORD, M. Another brick in the wall. Recent developments concerning the cell envelope. **Yeast**, v. 10, p. 1741-1752, 1994.

USUI, T., and 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. and 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., and ASENJO, J. A. Characterization of yeast lytic enzymes from *Oerskovia xanthineolytica* LL-G109. **Enzymes Microbial Technology**, v. 13, p. 71-75, 1991.

YAMAMOTO, S., and NAGASAKI, S. Purification and characterization of an exo α -1,2-mannanase from *Flavobacterium dormitator* var. *glucanolyticae*. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 39, n° 10, p. 1981-1989, 1975.

YAMAMOTO, N., HASUO, T., TERAUCHI, T., SAITO, K., and 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., and TADENUMA, M. Heme requirement of novel yeast-lysing bacterium. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 51, n° 6, p. 1541-1545, 1987.

YAMAMOTO, N., SATO, S., SAITO, K., HASUO, T., TADENUMA, M., SUZUKI, K., TAMAOKA, J., and KOMAGATA, K. *Rarobacter faecitabidus* gen. nov., a yeast-lysing coryneform bacterium. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 38, n° 1, p. 7-11, 1988.

YAMAMOTO, N., SATO, S., MIKI, H., PARK, Y. and TADENUMA, M. Isolation of yeast-lysing bacteria in Brazil. **Report of Research Institute of Brewing**, v. 165, p. 37- 43, 1993.

ZLOTNIK, H., FERNANDEZ, M. P., BOWERS, B. and 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.

CAPÍTULO 2 - CARACTERIZAÇÃO DA PROTEASE LÍTICA BRUTA DE ***Cellulomonas cartae* 191.**

Cellulomonas cartae 191 é um actinomiceto que secreta um complexo enzimático capaz de lisar células viáveis de *Saccharomyces cerevisiae*. Este complexo enzimático é composto principalmente por β -glucanases, proteases líticas e quitinase. A produção das enzimas líticas foi induzida pela adição de parede celular de *Saccharomyces cerevisiae* extraída mecanicamente, ao meio de fermentação. A protease lítica apresentou atividade ótima a 50°C em pH 8,0 para o substrato caseína. Apresentou grande estabilidade nas temperaturas de congelamento e refrigeração, mantendo-se estável após tratamento a 50°C durante 30 minutos. A protease lítica teve sua atividade inibida por EDTA e fenilmetilsulfonilfluoreto.

INTRODUÇÃO.

A lise enzimática da parede celular de leveduras tem aplicação biotecnológica na preparação de protoplastos (RILKE et al., 1992) e também amplo potencial de utilização na obtenção de proteínas recombinantes, enzimas, hormônios, biopolímeros funcionais da parede celular, na degradação da parede celular de leveduras para produção de ração animal e como pré-tratamento para a ruptura mecânica de células (LIU et al., 1988).

Os complexos enzimáticos capazes de lisar a célula de levedura, estudados até hoje, são geralmente compostos por mais de uma enzima. As principais são as β -glucanases e as proteases líticas.

Para a lise celular, há a necessidade da presença de protease e β -glucanase devido a estrutura da parede celular da levedura, que é composta por duas camadas: uma

externa de mananaproteínas e uma interna de glucana. Para o acesso da enzima hidrolítica, β -glucanase, é necessária a ação prévia da protease que age na camada de manoproteína, expondo a glucana para a ação da β -glucanase.

As preparações enzimáticas para lise de leveduras e preparação de protoplastos são encontradas comercialmente na forma bruta e na forma purificada. As preparações de enzimas líticas brutas são compostas geralmente de β -1,3-glucanases, proteases e outras enzimas.

O uso do complexo enzimático bruto consistindo de ambas as enzimas protease e β -1,3-glucanase para a ruptura da célula de levedura é uma alternativa atrativa desde que o sistema enzimático possa ser produzido com um mínimo de purificação, devido ao custo elevado. Todavia, a protease permanece presente na mistura após a ruptura da célula hidrolisando proteínas de interesse em peptídeos, causando degradação nos produtos. Para um processo econômico, é necessário ajustar as condições de operação para que as perdas sejam minimizadas (PROKOPAKIS & LIU, 1997).

O custo da purificação restringe o uso de enzimas líticas em larga escala (LIU et al., 1988).

Este trabalho visa a caracterização bioquímica da protease lítica bruta de *Cellulomonas cartae* nº 191. Serão estudadas as condições ótimas de atividade e estabilidade da protease lítica em relação ao pH e temperatura e o efeito de inibidores e ativadores na atividade enzimática.

MATERIAL E MÉTODOS.

MATERIAL.

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

Material específico: Parede celular bruta de levedura *Saccharomyces cerevisiae* extraída mecanicamente em Dyno-Mill e liofilizada.

Microrganismo: *Cellulomonas cartae* 191.

MÉTODOS.

A linhagem *Cellulomonas cartae* 191 isolada de resíduos de usina de fermentação alcoólica, no Laboratório de Bioquímica de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos, foi identificada pelo Korean Institute of Bioscience & Biotechnology.

O microrganismo foi mantido em tubos inclinados com meio agar TYM descrito por YAMAMOTO et al. (1993), 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 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ por litro de água destilada. A cultura foi conservada a 4°C, sendo repicada a cada três ou quatro meses de armazenamento.

Produção da Protease Lítica.

Preparação do Pré-Inóculo: uma alçada de cultura de 24 horas de *Cellulomonas cartae* 191 foi inoculada em 10ml de meio de cultura descrito por SCOTT & SCHEKMAN (1980) composto de 13,6 g/l de KH_2PO_4 ; 2,0 g/l de $(NH_4)_2SO_4$; 4,2 g/l de KOH; 0,2 g/l de

MgSO₄.7H₂O; 0,001 g/l de Fe₂(SO₄)₃.6H₂O; 1 mg/l de tiamina, 1 mg/l de biotina e 1% de parede celular bruta de levedura e incubada a 30°C com agitação de 150 rpm por 24 horas.

Produção de Protease Lítica: 1 ml de pré-inóculo foi transferido assepticamente para frascos Erlenmeyer de 50 ml contendo 9 ml do mesmo meio de cultura. Os frascos foram incubados por 24 horas a 30°C com agitação de 150 rpm.

Obtenção do Extrato Enzimático Bruto.

Após incubação, o meio de cultura obtido no item anterior foi centrifugado a 10.000 rpm durante 10 minutos e o sobrenadante utilizado como fonte de enzima.

O extrato enzimático bruto foi conservado à -10°C ou liofilizado e armazenado à -10°C.

Determinação da Atividade de Protease.

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

Determinação da Cinética de Crescimento e Produção da Protease Lítica.

Preparou-se 10ml de pré-inóculo, como descrito anteriormente, inoculou-se 1,0ml em frascos Erlenmeyer de 50 ml contendo 9ml do mesmo meio de cultura (SCOOT & SCHEKMAN, 1980) e incubou-se a 30°C com agitação (150 rpm). Nos intervalos de tempo de 0, 3, 6, 12, 24 e 48 horas, retirou-se um frasco e determinou-se o pH do meio, a atividade de protease no sobrenadante após a centrifugação. O crescimento celular foi estimado pela medida da densidade ótica a 660 nm da suspensão das células, após serem lavadas por duas vezes com água destilada, fazendo-se as diluições necessárias.

Determinação da Temperatura Ótima de Atividade da Protease Lítica Bruta.

A mistura para reação contendo 0,5ml de extrato enzimático bruto; 1,5ml de solução de caseína 2% e 1ml de tampão fosfato 0,15M (pH 7,5) foi incubada nas temperaturas de 20°C, 30°C, 40°C, 45°C, 50°C, 55°C, 60°C, 70°C, 80°C e 96°C (ebulição), por 30 minutos. A reação foi paralisada pelo acréscimo de 3,0ml de solução de TCA 0,4M; seguida de filtração em papel Whatman 42. A atividade da protease lítica foi determinada no filtrado como descrito anteriormente.

Determinação do pH Ótimo de Atividade da Protease Lítica Bruta.

A mistura de reação contendo 0,5ml de extrato enzimático bruto; 1,5ml de solução de caseína 2% e 1,0 ml de soluções de diferentes tampões 0,15M em diferentes pH, foi incubada a 50°C por 30 minutos, paralisada posteriormente pelo acréscimo de 3,0 ml de TCA 0,4M.

As soluções tampão utilizadas foram: citrato-fosfato pH 2,6; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0 e 7,0; fosfato pH 6,0; 7,0; 7,5 e 8,0; borato-borax pH 8,0; 8,5 e 9,0; borax-NaOH pH 9,25 e 10,0; e carbonato pH 10,0 e 10,7.

Após a reação, as amostras foram filtradas em papel Whatman 42 e a absorbância do filtrado foi medida a 280 nm, como descrito anteriormente.

Efeito do Tratamento Térmico na Estabilidade da Protease Lítica Bruta.

Para o estudo do efeito da temperatura na estabilidade da enzima, frascos contendo extrato enzimático bruto foram submetidos a tratamentos térmicos a de 5°C, 10°C, 25°C, 30°C, 35°C, 40°C, 45°C, 50°C, 60°C, 70°C, 80°C e ebulição durante 15 minutos e 48 horas. Após o tratamento térmico, alíquotas de enzima foram colocadas em banho de gelo e a atividade residual determinada como descrito a seguir.

A mistura de 0,25ml de extrato enzimático bruto previamente tratado; 0,5 ml de tampão borato 0,15M pH 8,0 e 0,75ml de solução 2% de caseína foi incubada a 50°C por 30 minutos. A reação foi paralisada pela adição de 1,5 ml de solução de TCA 0,4M. As misturas de reação foram filtradas e a absorbância do filtrado determinada como descrito anteriormente. A atividade do extrato enzimático bruto sem tratamento térmico foi considerada 100%.

Estabilidade da Protease Lítica Bruta Durante o Congelamento.

Alíquotas de extrato enzimático bruto foram congeladas e a atividade da protease lítica foi determinada após 1, 7, 15, 28 e 55 dias de congelamento.

Efeito do pH na Estabilidade da Protease Lítica Bruta.

As misturas de 3 ml de extrato enzimático bruto e 9 ml de soluções tampão de diferentes valores de pH foram incubadas a 30°C durante 1, 4 e 24 horas. Após a incubação, 1 ml das amostras de solução enzimática foram ajustadas para pH 8,0 pela adição de 3 ml de solução tampão borato 0,3M pH 8,0 e a atividade residual determinada como descrito anteriormente.

Foram utilizados tampão citrato 0,3M pH 2,6; 3,0; 4,0; 5,0 e 6,0; tampão fosfato 0,2M pH 7,0 e 8,0; tampão borato-Borax 0,2M pH 9,0; tampão borax-NaOH 0,2M pH 10,0 e tampão carbonato 0,3M pH 10,7.

Efeito de Inibidores na Atividade da Protease Lítica Bruta.

Para o estudo do efeito de sais e outros compostos inibidores na atividade da protease lítica, as misturas de reação contendo 0,5 ml de extrato enzimático bruto; 1,5 ml de solução 2% de caseína em tampão fosfato 0,1M pH 8,0 e 1 ml de solução de ZnCl₂, HgCl₂, CuSO₄, CaCl₂, MgSO₄, ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA), fenilmetilsulfonilfluoreto (PMSF), ácido cloromercuriobenzóico (PCMB), N-bromosuccinimida e manose na concentração final de 1,0mM e 0,1mM foram incubadas a 50°C durante 30 minutos.

A reação foi paralisada pela adição de 3,0 ml de solução de TCA 0,4M. Após a filtração em papel Whatman 42, a absorbância do filtrado foi medida a 280 nm como descrito anteriormente. Como controle foi determinada a atividade de protease na ausência de sais e compostos inibidores.

RESULTADOS.

Produção da Protease Lítica Bruta.

No cultivo do microrganismo *Cellulomonas cartae* 191 em frascos agitados em meio de cultura composto de parede celular de levedura e sais, descrito anteriormente, observou-se que a enzima protease é produzida durante a fase exponencial de crescimento. O início da produção de protease foi verificado após 6 horas de incubação sendo que no período de 6 a 12 horas houve aumento acentuado da produção de protease e a produção máxima foi verificada após 24 horas de crescimento. A atividade de protease manteve-se constante após 48 horas de incubação.

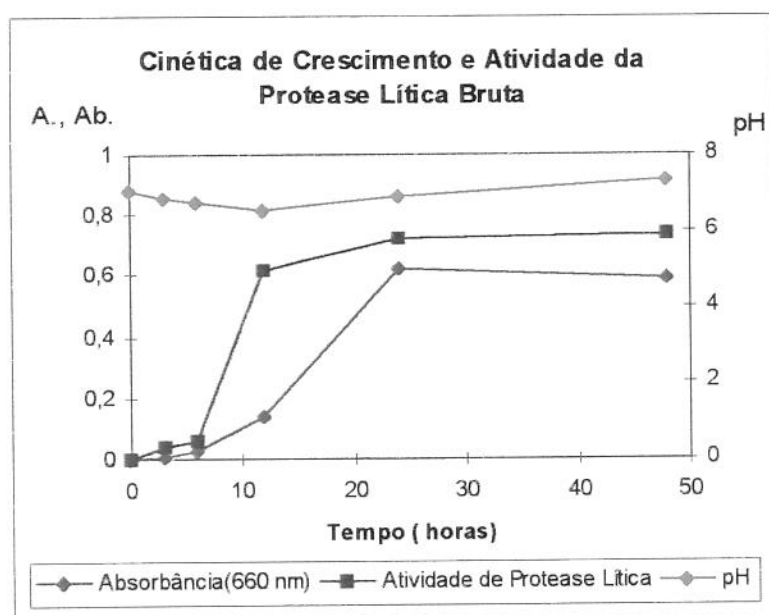


Figura 2.1: Cinética de crescimento da linhagem *Cellulomonas cartae* 191 e produção de protease lítica em meio composto de parede celular de levedura e sais a 30°C, onde A. representa a atividade da protease lítica bruta e Ab., a absorbância a 660 nm.

Temperatura Ótima de Atividade da Protease Lítica.

A protease lítica bruta de *Cellulomonas cartae* 191 apresentou atividade ótima a 50°C (Figura 2.2)

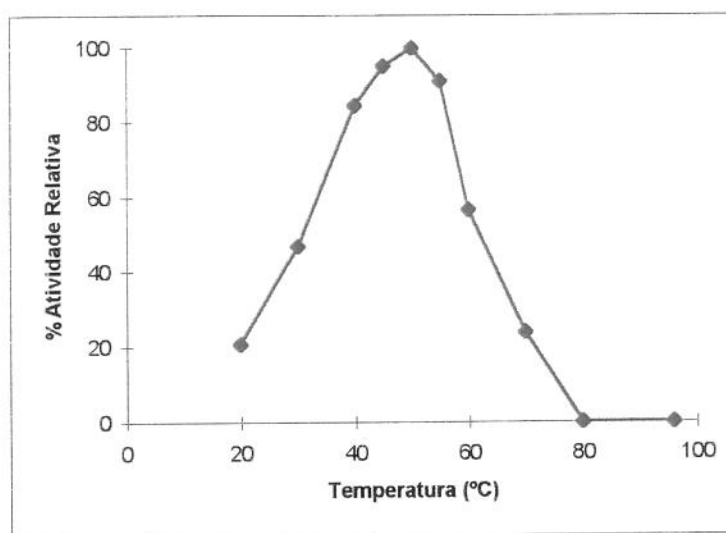


Figura 2.2: Temperatura ótima de atividade da protease lítica bruta.

pH Ótimo de Atividade da Protease Lítica.

A Figura 2.3 ilustra que a protease lítica bruta de *Cellulomonas cartae* 191 apresentou atividade ótima na faixa de pH de 7,0 a 8,0, sendo inativa em pH inferiores a 4,0.

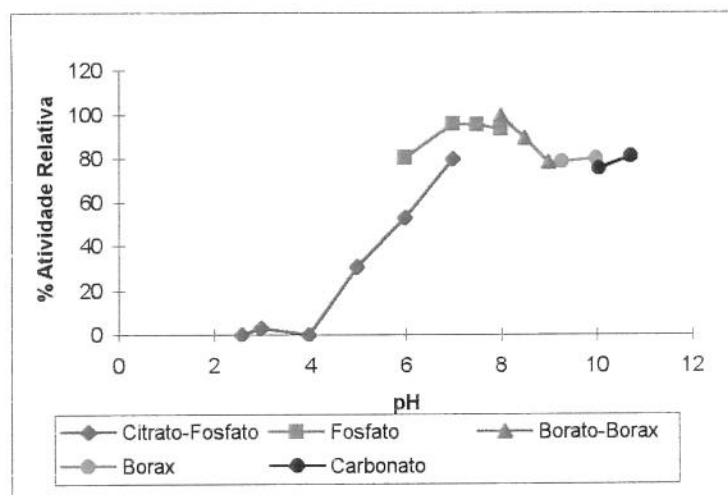


Figura 2.3: pH ótimo de atividade da protease lítica bruta.

Efeito do Tratamento Térmico na Estabilidade da Protease Lítica.

A protease lítica de *Cellulomonas cartae* 191 apresentou-se estável na faixa de 5°C a 35°C durante 48 horas de incubação, sendo que o tratamento a 40°C durante 48 horas resultou em perda de 50% da atividade.

A atividade residual da protease lítica após 30 minutos de tratamento a 50°C foi de 87%.

No estudo do efeito do tratamento térmico da protease lítica em temperaturas mais elevadas foi observado que a enzima foi completamente inativada após 30 minutos a 60°C, após 10 minutos a 70°C e após 5 minutos a 80°C.

A Figura 2.4 ilustra que a protease lítica foi inativada em temperatura superior a 50°C após 15 minutos de tratamento.

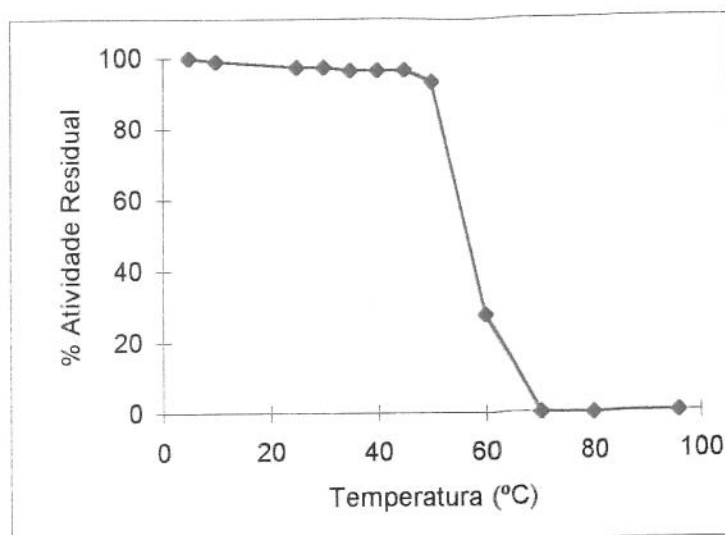


Figura 2.4: Estabilidade da protease lítica após 15 minutos de tratamento térmico.

Estabilidade da Protease Lítica após Tratamento em Diferentes pH.

A protease lítica mostrou-se instável em pH ácido, a atividade residual da enzima após uma hora de incubação a 30°C nos valores de pH 2,6; 3,0; 4,0; 5,0 e 6,0 foi respectivamente 23,1%; 39,4%; 37,3%; 58,7% e 69,7% sendo que após quatro horas de tratamento nestes valores de pH a enzima foi inativada.

A enzima apresentou maior estabilidade em pH 8,0 a 9,0. Observou-se que a atividade residual após uma hora de tratamento da enzima em pH 7,0; 8,0; 9,0; 10,0 e 10,7 a 30°C foi respectivamente 87,1%; 95,6%; 100,0%; 68,1% e 60,38% sendo que após quatro horas de tratamento em pH 8,0 a atividade residual da enzima foi de 85%.

A Figura 2.5 ilustra que a protease lítica mostrou maior estabilidade em pH 8,0 a 9,0 após uma hora de incubação a 30°C.

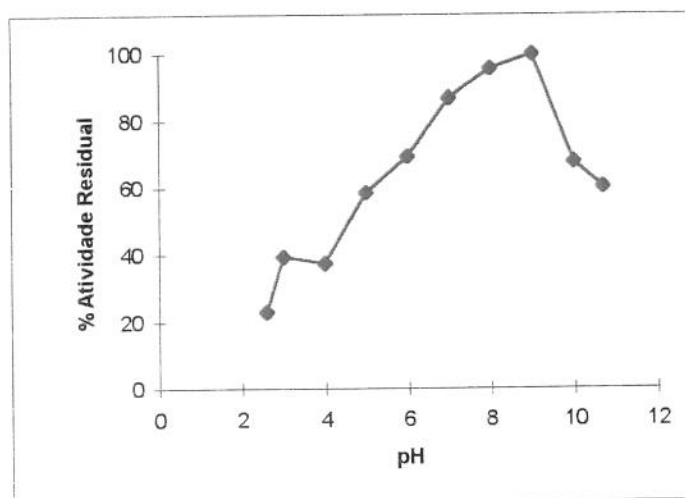


Figura 2.5: pH de estabilidade da protease lítica.

Efeito do Tempo de Congelamento na Estabilidade da Protease Lítica Bruta.

A protease lítica bruta mostrou-se estável após vários dias de congelamento, como mostra a Tabela 2.1.

Tempo de Congelamento (Dias)	Atividade Residual (%)
0	100,0
1	96,5
7	100,6
15	99,9
28	93,9
55	96,8

Tabela 2.1: Estabilidade da protease lítica bruta após congelamento.

Efeito de Inibidores na Atividade da Protease Lítica.

A protease lítica de *Cellulomonas cartae* 191 não foi inibida na presença de CaCl_2 e N-Bromosuccinimida na concentração de 1mM. Nesta concentração os compostos ZnCl_2 , MgCl_2 , CuSO_4 , ácido p-cloromercuriobenzóico e manose inibiram ligeiramente a protease lítica. Os reagentes EDTA, fenilmetilsulfonilfluoreto e HgCl_2 na concentração final de 1mM inibiram consideravelmente a protease sendo que a atividade residual foi respectivamente 49,3%; 50,6% e 80,5%.

Compostos	% Atividade Residual da Protease Lítica Bruta	
	1 mM	0,1 mM
Controle	100,0	100,0
ZnCl_2	90,5	95,7
MgCl_2	99,0	97,0
HgCl_2	80,5	101,3
CaCl_2	100,0	97,4
CuSO_4	97,4	99,3
Fenilmetilsulfonilfluoreto	50,6	84,4
Ácido p-Cloromercuriobenzóico	96,7	101,6
N-Bromosuccinimida	103,3	100,4
Ácido Etilenodiaminotetraacético	49,3	92,9
Manose	98,7	99,5

Tabela 2.2: Efeito de inibidores na atividade da protease lítica bruta.

DISCUSSÃO.

Diversas linhagens de microrganismos produzem proteases e β -1,3-glucanases que lisam a parede celular de leveduras (OBATA et al., 1977; FUNATSU et al., 1978; SCOOT & SECHEKMAN, 1980; KITAMURA, 1982 e USUI & OGUCHI, 1986).

A linhagem *Cellulomonas cartae* 191, utilizada neste estudo, produz β -1,3-glucanase e protease que lisam a parede celular de leveduras. Esta linhagem possui várias características similares ao microrganismo *Oerskovia xanthineolytica*. Estudos anteriores de DNA (STACKEBRANDT et al., 1980), análise de 16S-RNA, a comparação do tipo de peptidoglicano e a composição de ácidos graxos, levaram pesquisadores a proporem que o microrganismos do gênero *Oerskovia* e *Cellulomonas* fossem identificados como um único gênero denominado *Cellulomonas* (STACKEBRANDT & PRAUSER, 1991). Por outro lado, *Oerskovia xanthineolytica* era conhecida anteriormente como *Arthrobacter luteus* (FERRER et al., 1996).

Desta forma considerando-se que linhagens de *Oerskovia xanthineolytica* e *Arthrobacter luteus* apresentam características similares e foram reclassificadas como microrganismos do gênero *Cellulomonas*, as características da protease de *Cellulomonas cartae* 191 serão comparadas com as proteases destes microrganismos descritas na literatura.

A atividade e estabilidade da protease das preparações brutas ou parcialmente purificadas são importantes para a otimização da lise da parede celular de leveduras e para a redução do custo de purificação. Essas proteases foram consideradas essenciais para a lise de leveduras, porque a camada superficial de mananaproteína limita o acesso de outras enzimas hidrolíticas, como a β -1,3-glucanase, à camada de glucana.

De acordo com a metodologia descrita por RILKE et al. (1992), para a preparação de protoplastos a suspensão de leveduras é incubada com as enzimas líticas a temperatura ambiente em pH 7,0 durante 30 minutos. A protease de *Cellulomonas cartae* 191 mostrou atividade e estabilidade ótima na faixa de pH de 7,0 a 8,0. A protease lítica de *O. xanthineolytica* apresentou pH ótimo de atividade entre 9,5 e 10,0 (VENTON & ASENJO, 1991), a protease da Zymolyase obtida de *Arthrobacter luteus* mostrou atividade ótima em pH 11,0 e 11,5 (KITAMURA, 1982) enquanto que a protease de *Oerskovia* sp CK apresentou atividade ótima em pH 9,0 (OBATA et al., 1977).

A protease lítica bruta de *Cellulomonas cartae* 191 perdeu cerca de 13% da atividade após tratamento térmico a 50°C por 30 minutos, perdeu cerca de 70% da atividade a 60°C por 15 minutos e foi inativada completamente após 30 minutos de incubação a 60°C e após 10 minutos a 70°C. A protease de *Oerskovia* sp CK, estudada por OBATA et al. (1977) mostrou-se ativa após tratamento a 60°C por 15 minutos sendo completamente inativada após tratamento térmico a 70°C durante 15 minutos.

A protease lítica de *C. cartae* 191 mostrou estabilidade em pH 8,0, sendo que a atividade residual após quatro horas de incubação neste pH a 30°C foi 85%. SCOTT & SCHEKMAN (1980) relataram que a protease lítica de *O. xanthineolytica* apresentou-se estável em pH 8,0 a -20°C.

Nas temperaturas de refrigeração e congelamento, a protease lítica bruta de *C. cartae* 191 mostrou-se bastante estável podendo ser armazenada por refrigeração por aproximadamente uma semana sem perda da atividade e na forma congelada mostrou-se estável por até dois meses.

A protease lítica bruta de *Cellulomonas cartae* 191 não foi inibida pelos íons Mg^{2+} e Ca^{2+} , resultado igualmente obtido por SAEKI et al. (1994) para a protease produzida por *Oerskovia xanthineolytica*. Os íons Zn^{2+} e Cu^{2+} inibiram fracamente a atividade da protease

de *C. cartae* 191 mas íons Zn^{2+} e Cu^{2+} , na concentração de 1mM, inibiram respectivamente 31% e 74% da atividade da protease de *O. xanthineolytica* estudada por SAEKI et al. (1994).

O íon Hg^{2+} na concentração 1mM inibiu completamente a protease de *O. xanthineolytica* (SAEKI et al., 1994) mas inibiu apenas 19,5% da atividade da protease bruta de *C. cartae* 191. Por outro lado, o reagente EDTA na concentração 1mM não inibiu a protease de *O. xanthineolytica* mas inibiu 50,7% da atividade da protease de *C. cartae* 191, na mesma concentração.

OBATA et al. (1977), KITAMURA (1982) e SHIMOI & TADENUMA (1991) relataram, respectivamente, que as proteases alcalinas de *Oerskovia* sp. CK, *Arthrobacter* e *Rarobacter faecitabidus* são serinas proteases possuindo aminoácido serina em seus sítios ativos.

As proteases líticas purificadas são inativadas completamente e irreversivelmente pelos inibidores de serina proteases DPF (diisopropilfosfofluoreto) e PMSF (fenilmetilsulfonilfluoreto) na concentração de 1 mM (LIU et al., 1988; SAEKI et al., 1994).

O reagente PMSF inibiu cerca de 50,6% a atividade da protease de *C. cartae* 191, na concentração final de 1mM. O extrato enzimático bruto parece conter frações de protease que são inibidas pelo inibidor de serina protease PMSF.

CONCLUSÕES.

1- A linhagem *Cellulomonas cartae* 191 que lisa células viáveis de *S. cerevisiae* produziu protease lítica após seis horas de fermentação em meio de cultura 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 parede celular bruta de levedura como fonte de carbono a 30°C com agitação de 150 rpm, sendo que a produção máxima de foi verificada após 24 horas de fermentação.

2- A protease lítica bruta produzida por *Cellulomonas cartae* 191 apresentou atividade ótima em pH entre 7,0 e 8,0 e temperatura de 50°C para o substrato caseína.

3- A protease lítica bruta de *Cellulomonas cartae* 191 mostrou-se estável em temperatura de refrigeração e ambiente. Sob condições de congelamento, mostrou-se estável durante dois meses.

4- A protease lítica bruta apresentou maior estabilidade em pH 8,0 a 9,0 e foi rapidamente inativada em pH ácido.

5- A atividade da protease lítica bruta de *Cellulomonas cartae* 191 foi parcialmente inibida por Ácido Etilenodiaminotetraacético e Fenilmetilsulfonilfluoreto (PMSF) na concentração final de 1mM.

Referências Bibliográficas.

- FERRER, P., HALKIER, T., HEDEGAARD, L., SAVVA, D., DIERS, I., and ASENJO, J. A. Nucleotide sequence of a β -1,3-glucanase isoenzyme II_A gene of *Oerskovia xanthineolytica* LL G109 (*Cellulomonas cellulans*) and initial characterization of the recombinant enzyme expressed in *Bacillus subtilis*. **Journal of Bacteriology**, v. 178, nº 15, p4751-4757, 1996.
- FUNATSU, M., OH, H., AIZONO, Y., and SHIMODA, T. Protease of *Arthrobacter luteus*, properties and function on lysis of viable yeast cell. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 42, nº 10, p. 1975-1977, 1978.
- KITAMURA, K. Re-examination of zymolyase purification. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 46, nº 4, p 963-969, 1982.
- LIU, L. C., PROKOPAKIS, G. J., ASENJO, J. A. Optimization of enzymatic lysis of yeast. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 32, p. 1113-1127, 1988.
- OBATA, T., IWATA, H., and NAMBA, Y. Proteolytic enzyme from *Oerskovia* sp CK lysing viable yeast cell. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 41, nº 12, p. 2387-2394, 1977.
- RILKE, O., BAUM, A., WEISS, J., HOMMEL, R. and KLEBER, H.-P. Kinetics of enzymatic lysis, formation and regeneration of protoplasts of *Candida (Torulopsis) apicola*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 8, p. 14-20, 1992.
- ROWLEY, B. I., AND 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.
- SAEKI, K., IWATW, J., YAMAZAKI, S., WATANABE, Y., TAMAI, Y. Purification 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.

SCOTT, J. H., and 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., and 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, 1991.

STACKEBRANDT, E., HÄRINGER, M., SCHLEIFER, K. H. Molecular genetic evidence for the transfer of *Oerskovia* species into the genus *Cellulomonas*. **Archives of Microbiology**, v. 127, p. 179-185, 1980.

STACKEBRANDT, E. and PRAUSER, H. Assignment of the genera *Cellulomonas*, *Oerskovia*, *Promicromonospora* and *Jonesia* to *Cellulomonadaceae* fam. nov. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 14, p. 261-265, 1991.

USUI, T., and OGUCHI, M. Purification of protease from *Rhizoctonia solani* lysing yeast cell walls. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 50, n° 2, p. 535-537, 1986.

VENTOM, A. M., and ASENJO, J. A. Characterization of yeast lytic enzymes from *Oerskovia xanthineolytica* LL-G109. **Enzymes Microbial Technology**, v. 13, p. 71-75, 1991.

YAMAMOTO, N., SATO, S., MIKI, H., PARK, Y. and TADENUMA, M. Isolation on yeast lysing bacteria, and a new species *Rarobacter incanus*. **Journal of General Applied Microbiology**, v. 39, p. 261-272, 1993.

CAPÍTULO 3 - APLICAÇÃO DAS ENZIMAS LÍTICAS DE *Cellulomonas* *Cartae* 191 NA LISE DA PAREDE CELULAR DE LEVEDURAS.

Foi estudada a otimização da lise de *Saccharomyces cerevisiae* KL 88 usando-se enzimas líticas de *Cellulomonas cartae* 191. Verificou-se que a susceptibilidade da levedura *Saccharomyces cerevisiae* KL 88 a lise celular é cerca de duas vezes maior na fase exponencial de crescimento do que na fase estacionária. As condições ótimas para a lise celular de *S. cerevisiae* KL88 pelas enzimas líticas de *Cellulomonas cartae* 191 foram em pH 7,0 - 7,5 e na temperatura de 30 -35°C.

A lise de outras leveduras dos gêneros: *Saccharomyces*, *Candida*, *Debaromyces*, *Kluyveromyces*, *Pichia* e *Hansenula* foi estudada nas condições otimizadas, e apresentaram atividade lítica relativa variando entre zero e 20,95. Essas enzimas líticas não foram capazes de lisar células de *Rhodotorula rubra* produtora de pigmento vermelho.

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). O polímero de manana foi identificado como um composto de manose com ligações α -1,2, α -1,3 e α -1,6 covalentemente ligadas a peptídeos formando glicopeptídeos (YAMAMOTO et al., 1975).

A parede celular de leveduras possui duas camadas principais: uma externa, composta pelo complexo manana-proteína, e uma interna de glucana (ANDREWS & ASENJO, 1987).

Em 1988, HUNTER & ASENJO apresentaram um modelo que considera a lise enzimática da célula de levedura como 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.

Estudos anteriores relataram que a lise celular de leveduras na fase exponencial de crescimento é mais eficiente que na fase estacionária (KANEKO et al., 1973). Os componentes da parede celular, depois de serem depositados durante sua síntese, são rearranjados para formarem um complexo integrado. Os rearranjos podem ocorrer através de glicosiltransferases as quais introduzem ramificações nos polissacarídeos lineares (HARTLAND et al., 1994).

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).

Os microrganismos capazes de lisar a parede celular de leveduras produzem um complexo enzimático composto principalmente por β -glucanases, proteases líticas e quitinases. Estas enzimas têm atividades ótimas em temperatura e pH diferentes, e a lise celular é uma ação conjunta das enzimas β -glucanases e proteases, tornando importante o estudo das melhores condições para a lise celular que não necessariamente correspondem às condições ótimas para uma dessas enzimas individualmente.

MATERIAL E MÉTODOS.

MATERIAL.

Caseína Hammarsten e ácido tricloroacético Merck; laminarina, biotina e tiamina Sigma, parede celular bruta de levedura *Saccharomyces cerevisiae* extraída mecanicamente em Dyno-Mill e liofilizada.

Microrganismos.

Cellulomonas cartae 191 isolada anteriormente de resíduos de usina de fermentação alcoólica no Laboratório de Bioquímica da Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP e identificada pelo Korean Institute of Bioscience & Biotechnology em 1997.

Leveduras: *Saccharomyces cerevisiae* KL 88, *S. diastaticus* NCYC 713, *S. capensis* NCYC 761, *Candida glabrata* NCYC 388, *Debaryomyces vanrii* NCYC 577, *Kluyveromyces marxianus* NCYC 587, *Pichia membranaefaciens* NCYC 333, *Hansenula anomala* NCYC 435, *H. mrakii* NCYC 500, *Kluyveromyces drosophilae* ATCC 15126, *Rhodotorula rubra*, *Pachysolen tannophilus* NRRL 2460 e *Trichosporon beigeli*.

Manutenção.

O actinomiceto *Cellulomonas cartae* 191 foi mantido em tubos inclinados com meio agar TYM 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 K₂HPO₄; 1,15 g de NH₄H₂PO₄; 0,264 g de MgSO₄.7H₂O por litro de água destilada (YAMAMOTO et al., 1993). E conservado à 4°C sob camada de vaselina estéril sendo repicados a cada três a quatro meses de armazenamento. As leveduras foram inoculadas para armazenamento em tubos inclinados contendo meio agar YEPD, conservadas imersas em vaselina estéril e repicadas a cada três a quatro meses.

MÉTODOS.

Indução da Produção de Enzimas Líticas.

Preparação do Pré-Inóculo: uma alçada de cultura de 24 horas de *Cellulomonas cartae* foi inoculada em 10ml de meio de cultura contendo: 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 $\mu\text{g/ml}$ de tiamina, 1 $\mu\text{g/ml}$ de biotina e 1% de parede celular bruta de levedura (SCOTT & SCHEKMAN, 1980) e incubada à 30°C com agitação de 150 rpm por 24 horas.

Produção de Protease Lítica: 5 ml de pré-inóculo foi transferido assepticamente para 45 ml do mesmo meio de cultura e incubado por 24 horas à 30°C com agitação de 150 rpm.

Obtenção e Conservação da Preparação Enzimática Bruta.

A preparação enzimática bruta foi obtida pela centrifugação do meio de cultura após 24 horas de fermentação, a 10.000 rpm por 10 minutos.

O sobrenadante do meio de cultura, utilizado como preparação enzimática bruta, foi conservado à -10°C ou liofilizado e mantido à -10°C.

Determinação das Atividades de Protease e β -1,3-Glucanase na Preparação Enzimática Bruta.

Determinação da atividade de protease lítica:

A atividade de protease lítica foi determinada utilizando-se caseína como substrato. A mistura de reação contendo 1,5 ml de solução de caseína 2%, 1 ml de tampão fosfato

0,15M (pH 7,5) e 0,5 ml de solução enzimática bruta foi incubada a 30°C por 30 minutos. A reação foi paralisada pela adição de 3 ml de solução de ácido tricloroacético (TCA) 0,4M. A mistura de reação foi filtrada em papel Whatman 42 (OBATA et al., 1977) e a absorbância do filtrado foi determinada a 280 nm, sendo a unidade de atividade definida como aquela capaz de aumentar em uma unidade a absorbância do filtrado a 280 nm, nas condições do ensaio (ROWLEY & BULL, 1977).

Determinação da atividade de β -1,3-glucanase:

A mistura de reação contendo: 250 μ l da solução enzimática bruta, 250 μ l de solução de laminarina 1% em tampão acetato 0,1M pH 4,5, foi incubada a 55°C por 30 minutos. A reação foi paralisada por aquecimento em banho de ebulição por 3 minutos (SAEKI et al., 1984). Os açúcares redutores liberados foram determinados pelo método de Somogyi & Nelson. Uma unidade de atividade foi definida como a liberação de um μ mol de glicose por minuto por ml de solução enzimática.

Obtenção da Suspensão de Células de Leveduras.

Para a obtenção de células de leveduras, uma alçada das culturas de leveduras em meio YEPD composto de 1% de extrato de levedura, 2% de peptona, 2% de glicose e 2% de agar, foi transferida para frascos de Erlenmeyer de 50 ml contendo 15 ml de meio YEPD líquido. Os frascos foram incubados a 30°C por 15 horas com agitação de 150 rpm.

As células foram coletadas por centrifugação a 10.000 rpm por 10 minutos e lavadas duas vezes com água destilada. Estas células foram ressuspensas até obter-se uma suspensão com densidade ótica igual a 1,2 a 660 nm para a utilização na lise enzimática.

Determinação da Atividade Lítica.

A mistura para lise celular enzimática contendo: 2 ml de suspensão de células de levedura com densidade ótica igual a 1,2 a 660 nm (VENTOM & ASENJO, 1991); 1,5 ml de tampão fosfato 0,1M pH 7,5 e 0,5 ml de solução enzimática bruta produzida por *Cellulomonas cartae* 191, foi incubada a 30°C , com agitação em intervalos de tempo regulares, durante 1 hora (OBATA et al., 1977).

Simultaneamente, incubou-se como referência um branco onde no lugar da solução enzimática bruta acrescentou-se tampão fosfato 0,1M pH 7,5.

A atividade lítica foi calculada através da equação:

$$\text{Atividade lítica} = \frac{(\text{DO referência} - \text{DO mistura})}{\text{DO referência inicial}} \times 100$$

(OBATA et al., 1977)

Estudo da Susceptibilidade de Células de *S. cerevisiae* à Lise Enzimática em Diferentes Fases de Crescimento.

Para a preparação do pré-inóculo, inoculou-se uma alçada de cultura de *S. cerevisiae* KL88 em frascos Erlenmeyer de 50 ml contendo 20 ml de meio YEPD. Após a incubação durante 15 horas com agitação a 150 rpm a 30°C, transferiu-se 1 ml de pré-inóculo para frascos Erlenmeyer de 50 ml contendo 19 ml de meio YEPD. Os frascos foram incubados a 30°C e 150 rpm e após 6, 15, 24, 48 e 72 horas de incubação, amostras de massa celular foram coletadas para o estudo de susceptibilidade das células de levedura às enzimas liticas de *Cellulomonas cartae* 191.

Planejamento Experimental para a Otimização da Lise de Células de *S. cerevisiae*.

Para os testes de otimização, foi usada a cultura de levedura "killer" *S. cerevisiae* KL 88 (SOARES, 1998) com 15 horas de incubação. Foram analisadas as variáveis independentes: temperatura e pH, e a variável dependente, atividade lítica.

O objetivo deste planejamento experimental foi a maximização da variável dependente atividade lítica calculada pela equação apresentada anteriormente. A análise estatística dos resultados foi realizada através do software STATISTICA utilizando-se o Experimental Design.

Os níveis estudados estão apresentados na Tabela 3.1.

Tabela 3.1: Níveis das variáveis independentes estudados.

<i>Variáveis Independentes</i>	$-\alpha$	-1	0	+1	$+\alpha$
Temperatura	20,9	25,0	35,0	45,0	49,1
pH	6,1	6,50	7,50	8,50	8,9

O valor de α foi calculado pela equação: $\alpha = (2^n)^{1/4}$, n = número de variáveis independentes.

Foram realizados um total de 11 ensaios tratando-se de um planejamento fatorial 2^2 . Estes ensaios estão apresentados na Tabela 2.2.

Tabela 3.2: Ensaios do planejamento experimental realizado.

Ensaio	X	Y	Temperatura (°C)	pH
1	-1	-1	25,0	6,5
2	-1	+1	25,0	8,5
3	+1	-1	45,0	6,5
4	+1	+1	45,0	8,5
5	- α	0	20,9	7,5
6	+ α	0	49,1	7,5
7	0	- α	35,0	6,1
8	0	+ α	35,0	8,9
9(C)	0	0	35,0	7,5
10(C)	0	0	35,0	7,5
11(C)	0	0	35,0	7,5

C: ensaio no ponto central.

Estudo da Susceptibilidade de Algumas Leveduras às Enzimas Líticas de *Cellulomonas cartae* 191.

Seguindo a mesma metodologia para a determinação da atividade lítica em *S. cerevisiae* KL88, foi determinada a atividade lítica nas seguintes leveduras: *S. diastaticus* NCYC 713, *S. capensis* NCYC 761, *Candida glabrata* NCYC 388, *Debaryomyces vanrii* NCYC 577, *Kluyveromyces marxianus* NCYC 587, *Pichia membranaefaciens* NCYC 333, *Hansenula anomala* NCYC 435, *H. mrakii* NCYC 500, *Kluyveromyces drosophilarum* ATCC 15126, *Rhodotorula rubra*, *Pachysolen tannophilus* NRRL 2460 e *Trichosporon beigeli*.

RESULTADOS.

Obtenção da Preparação Enzimática Bruta.

A preparação enzimática bruta de *Cellulomonas cartae* 191 apresentou 4,88 μmol de glicose/ ml x min para atividade de β -1,3-glucanase e 0,17 U para a atividade de protease lítica.

Estudo da Susceptibilidade de Células de *S. cerevisiae* à Lise Enzimática em Diferentes Fases de Crescimento.

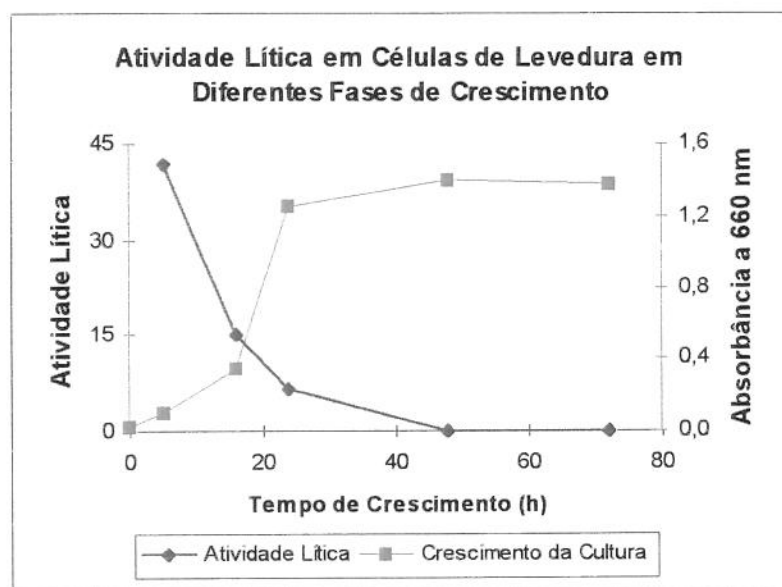


Figura 3.1: Susceptibilidade de células de levedura *S. cerevisiae* KL88 à lise enzimática em diferentes fases de crescimento.

Podemos observar que com o aumento do tempo de incubação da levedura, sua susceptibilidade à lise enzimática foi reduzida, chegando a ser nula para células de cultura com mais de 48 horas de crescimento, para a metodologia adotada. A atividade lítica nas células com 6 horas de crescimento foi bastante alta o que corresponde à fase de adaptação

da cultura ao novo meio, a fase lag. As células de cultura de 15 horas de incubação mostraram-se mais susceptíveis à lise enzimática do que as células de 24 horas de fermentação.

Planejamento Experimental para a Otimização da Lise de Células de *S. cerevisiae*.

Na Tabela 3.3 estão apresentados os resultados da variável dependente atividade lítica obtidos nos ensaios.

Tabela 3.3: Resultados dos ensaios realizados - Planejamento Experimental.

<i>Ensaio</i>	<i>Temperatura (°C)</i>	<i>pH</i>	<i>Atividade Lítica Relativa</i>
1	25,0	6,5	9,87
2	25,0	8,5	2,55
3	45,0	6,5	2,21
4	45,0	8,5	0,00
5	20,9	7,5	5,45
6	49,1	7,5	2,32
7	35,0	6,1	8,51
8	35,0	8,9	0,00
9(C)	35,0	7,5	14,83
10(C)	35,0	7,5	13,53
11(C)	35,0	7,5	13,25

C: ensaio no ponto central.

Analisando-se os efeitos das duas variáveis independentes temperatura e pH foram obtidos os valores -5,10 para a estimativa do efeito da temperatura e -4,76 para a estimativa do efeito do pH. Estes resultados indicam que quando a temperatura varia de 25°C para

45°C ocorre uma redução média na atividade lítica de 5,10 e quando o pH varia de 6,5 para 8,5 observou-se uma redução média de 4,76 na atividade lítica. O efeito da interação entre o pH e a temperatura não foi significativo considerando-se o nível de 95% de confiança.

A análise de variância dos resultados dos ensaios está apresentada na Tabela 3.4.

Tabela 3.4: Análise de variância (ANOVA).

<i>Fonte</i>	<i>Soma Quadrática</i>	<i>Graus de Liberdade</i>	<i>Média Quadrática</i>
Regressão	303,51	4	75,88
Resíduo	13,25	6	2,21
Falta de Ajuste	11,83	4	2,96
Erro Puro	1,42	2	0,71
Total	316,76	10	31,68

Adotando o nível de confiança de 95%, obtivemos os valores acima para a tabela ANOVA com valor de coeficiente de regressão (R – sqr) de 0,958.

Teste F: o valor de F calculado através da tabela ANOVA acima foi de 34,33, enquanto que o valor tabelado para os graus de liberdade de 4 para a regressão e 6 para o resíduo é 4,53. Dessa forma obtivemos um valor 7,6 vezes maior que o tabelado para F. Isto indica que o modelo é estatisticamente significativo e preditivo.

Modelo: $-298,15 + 3,38.T - 0,05.T^2 + 70,96.pH - 4,91.pH^2$, onde T é a temperatura em °C.

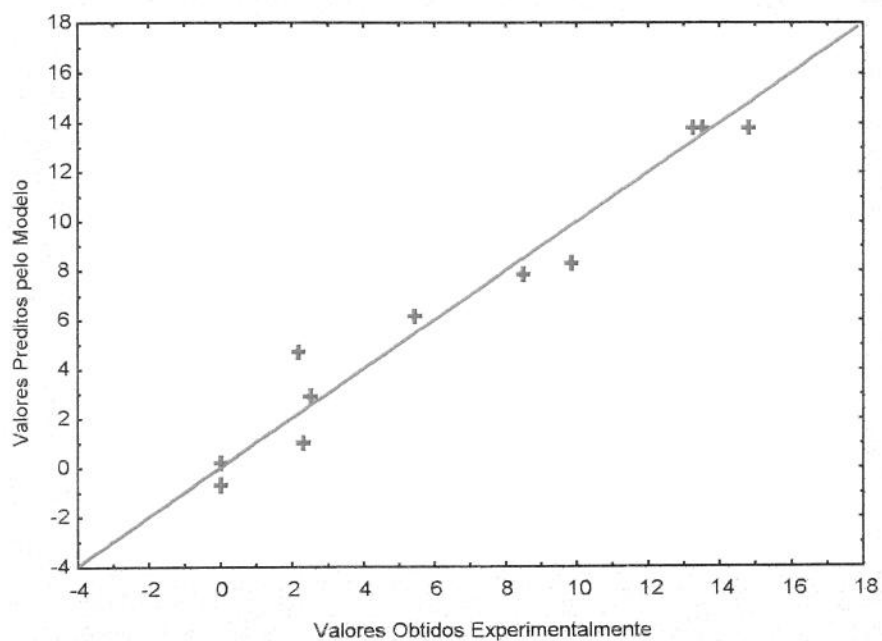


Figura 3.2: Relação entre os valores obtidos experimentalmente e os valores preditos pelo modelo.

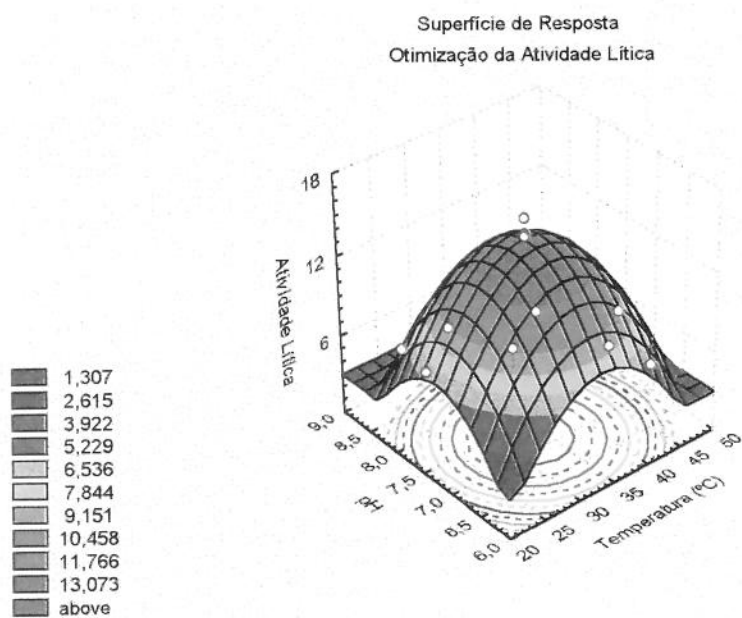


Figura 3.3: Superfície de resposta.

Pela observação da superfície de resposta, apresentada na Figura 3, concluímos que a maior atividade lítica em células de *S. cerevisiae* ocorreu numa faixa de pH de 7,0 a 7,5 e de temperatura de 30°C a 35°C.

Estudo da Susceptibilidade de Algumas Leveduras às Enzimas Líticas de *Cellulomonas cartae* 191.

A atividade lítica nas diferentes leveduras foi realizada à 30°C e pH 7,5 por 1 hora, com agitação em intervalos de tempo regulares.

Na Tabela 5 estão apresentados os valores da atividade lítica da preparação enzimática bruta de *Cellulomonas cartae* 191 em diferentes linhagens de levedura.

Tabela 3.5: Atividade Lítica em Diferentes Leveduras.

Leveduras	Atividade Lítica Relativa
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> KL 88	13,30
<i>Saccharomyces diastaticus</i> NCYC 713	9,91
<i>Saccharomyces capensis</i> NCYC 761	14,02
<i>Candida glabrata</i> NCYC 388	12,34
<i>Debaryomyces vanrij</i> NCYC 577	12,82
<i>Kluyveromyces drosophilarum</i> ATCC 15126	0,00
<i>Kluyveromyces marxianus</i> NCYC 587	20,95
<i>Kluyveromyces lactis</i>	4,45
<i>Rhodotorula rubra</i>	0,00
<i>Pachysolen tannophilus</i> NRRL2460	18,08
<i>Pichia membranaefaciens</i> NCYC 333	0,00
<i>Hansenula anomala</i> NCYC 435	6,10
<i>Hansenula mrakii</i> NCYC 500	0,00
<i>Trichosporon beigeli</i>	0,00

No estudo da atividade lítica da preparação enzimática de *Cellulomonas cartae* 191 utilizando-se as linhagens *S. cerevisiae* KL88, *S. diastaticus* NCYC 713 e *S. capensis* NCYC 761 foram obtidos os valores de atividade relativa de 13,30; 9,91 e 14,02 respectivamente, indicando que a preparação enzimática mostra alta atividade de lise sobre estas linhagens produtoras de fator "killer" (SOARES,1998).

Quanto a atividade de lise de linhagens do gênero *Kluyveromyces*, foi verificado diferente susceptibilidade, sendo que a linhagem *K. marxianus* NCYC 507 apresentou alta susceptibilidade tendo valor de atividade relativa de 20,95, enquanto que a linhagem *K. lactis* mostrou pequena susceptibilidade e *K. drosophilum* ATCC 15126 não foi susceptível à lise enzimática.

As linhagens dos gêneros *Candida* e *Debaryomyces* estudadas, apresentaram susceptibilidade equivalente às do gênero *Saccharomyces*, enquanto que a linhagem *Pichia membranaefaciens* NCYC 333 não foi lisada pelas enzimas líticas.

A não susceptibilidade de *Rhodotorula rubra* às enzimas líticas de *C. cartae* 191 era esperada pois essa levedura não apresenta glucana na parede celular (KANEKO et al., 1973).

Por outro lado, a levedura *Pachysolen tannophilus* NRRL 2460 mostrou maior susceptibilidade que as linhagens de *Saccharomyces* e a linhagem *Trichosporon beigeli* não foi susceptível à lise enzimática.

DISCUSSÃO.

A partir dos resultados obtidos concluímos que as células de *S. cerevisiae* são mais susceptíveis à lise enzimática na fase exponencial de crescimento do que na fase estacionária, confirmando os resultados obtidos por KANEKO et al. (1973).

Embora a lise enzimática ocorra pela ação conjunta das enzimas protease e β -1,3-glucanase, as condições de pH e temperatura ótimos para a lise não correspondem ao pH e temperatura ótimos de atividade das duas enzimas. As condições ideais obtidas para a lise celular foram na faixa de 30°C a 35°C e de pH de 7,0 a 7,5 após 1 hora de tratamento. A enzima β -1,3-glucanase de *C. cartae* 191 apresenta temperatura ótima de atividade 55°C e pH ótimo 4,5 enquanto que a protease mostrou atividade ótima a 50°C e pH 8,0.

Os mesmos valores acima foram obtidos por KITAMURA & YAMAMOTO (1972) para a lise de células de levedura por Zymolyase, um extrato enzimático produzido por *Arthrobacter luteus*. SCOTT & SCHEKMAN (1980) relataram que o pH ideal para a atividade lítica de enzimas produzidas por *Oerskovia xanthineolytica* foi 7,5.

RILKE et al. (1992) utilizaram 30 minutos de tratamento com enzimas líticas para a obtenção de protoplastos de leveduras. Na produção de extrato de levedura deseja-se a lise completa das células, dessa forma o tempo de reação para a lise deve ser maior (RYAN & WARD, 1988) e irá variar com a porcentagem desejada de células lisadas.

A lise enzimática de células de leveduras tem um amplo campo de utilização na obtenção de proteínas recombinantes, enzimas, hormônios, biopolímeros funcionais da parede celular, degradação da parede celular da levedura para aplicação do extrato de levedura em alimentos e ração animal, no pré-tratamento para a ruptura mecânica (LIU et al., 1988) e na produção de protoplastos (RILKE et al., 1992). A susceptibilidade de vários gêneros de leveduras à lise por enzimas produzidas por *C. cartae* amplia os campos de utilização deste extrato enzimático.

CONCLUSÕES.

1 - Células de *Saccharomyces cerevisiae* KL 88 são mais susceptíveis à lise por enzimas líticas de *Cellulomonas cartae* 191 na fase exponencial de crescimento do que na fase estacionária.

2- O extrato enzimático bruto produzido por *Cellulomonas cartae* 191 é capaz de lisar células viáveis de levedura *Saccharomyces cerevisiae* KL 88. As melhores condições para a lise enzimática são em pH 7,0 - 7,5 e temperatura de 30°C a 35°C.

3- O extrato enzimático bruto de *Cellulomonas cartae* 191 foi capaz de lisar as leveduras *Saccharomyces diastaticus* NCYC 713, *Saccharomyces capensis* NCYC 761, *Candida glabrata* NCYC 388, *Debaryomyces vanrij* NCYC 577, *Kluyveromyces marxianus* NCYC 587, *Kluyveromyces lactis*, *Hansenula anomala* NCYC 435 e *Pachysolen tannophilus* NRRL2460.

4- O extrato bruto de *Cellulomonas cartae* 191 não foi capaz de lisar as linhagens: *Kluyveromyces drosophilarum* ATCC15126, *Rhodotorula rubra*, *Pichia membranaefaciens* NCYC 333, *Hansenula mrakii* NCYC 500 e *Trichosporon beigeli*.

Referências Bibliográficas.

AMRANE, A. and PRINGENT, Y. Behaviour of yeast *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* during its autolysis. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 69, p. 267-272, 1996.

ANDREWS, B. A., and ASENJO, J. A. Continuous-culture studies of synthesis and regulation of extracellular $\beta(1-3)$ glucanase and protease enzymes from *Oerskovia xanthineolytica*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 30, p. 628-637, 1987.

BARROS NETO, B., SCARMINIO, I. S. e BRUNS, R. E. Planejamento e otimização de experimentos. 2ª edição. Campinas, SP. Editora da UNICAMP, 1996.

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.

HARTLAND, R. P., VERMEULEN, C. A., KLIS, F. M., SIETSMA, J. H. and 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.

HUNTER, J., B., and 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.

KANEKO, T., KITAMURA, K., and YAMAMOTO, Y. Susceptibilities of yeasts to yeast cell wall lytic enzyme of *Arthrobacter luteus*, **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 37, nº 10, p. 2295-2302, 1973.

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.

LIU, L. C., PROKOPAKIS, G. J., ASENJO, J. A. Optimization of enzymatic lysis of yeast. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 32, p. 1113-1127, 1988.

OBATA, T., IWATA, H., and NAMBA, Y. Proteolytic enzyme from *Oerskovia* sp CK lysing viable yeast cell. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 41, n° 12, p. 2387-2394, 1977.

RILKE, O., BAUM, A., WEISS, J., HOMMEL, R. and KLEBER, H.-P. Kinetics of enzymatic lysis, formation and regeneration of protoplasts of *Candida (Torulopsis) apicola*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 8, p. 14-20, 1992.

RYAN, E. and WARD, O. P. The application of lytic enzymes from *Basidiomycetes* *aphyllophorales* in production of yeast extract. **Process Biochemistry**, v. , p. 12-16, 1988.

SAEKI, K., IWATW, J., YAMAZAKI, S., WATANABE, Y., TAMAI, Y. Purification 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.

SCOTT, J. H., and 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.

SOARES, G. A. M. Caracterização da toxina "killer" produzida pela linhagem de

Saccharomyces cerevisiae Y500-4L. Campinas, 1998. 91 p. Tese de Mestrado - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

VENTOM, A. M., and ASENJO, J. A. Characterization of yeast lytic enzymes from *Oerskovia xanthineolytica* LL-G109. **Enzymes Microbial Technology**, v. 13, p. 71-75, 1991.

YAMAMOTO, S., and NAGASAKI, S. Purification and characterization of an exo α -1,2-mannanase from *Flavobacterium dormitator* var. *glucanolyticae*. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 39, n° 10, p. 1981-1989, 1975.

YAMAMOTO, N., SATO, S., MIKI, H., PARK, Y. and TADENUMA, M. Isolation of yeast-lysing bacteria in Brazil. **Report of Research Institute of Brewing**, v. 165, p. 37- 43, 1993.

CONCLUSÕES FINAIS.

1- A linhagem *Cellulomonas cartae* 191 que lisa células viáveis de *S. cerevisiae* produziu protease lítica após seis horas de fermentação em meio de cultura 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 parede celular bruta de levedura como fonte de carbono a 30°C com agitação de 150 rpm, sendo que a produção máxima de foi verificada após 24 horas de fermentação.

2- A protease lítica bruta produzida por *Cellulomonas cartae* 191 apresentou atividade ótima em pH entre 7,0 e 8,0 e temperatura de 50°C para o substrato caseína.

3- A protease lítica bruta de *Cellulomonas cartae* 191 mostrou-se estável em temperatura de refrigeração e ambiente. Sob condições de congelamento, mostrou-se estável durante aproximadamente dois meses.

4- A protease lítica bruta apresentou maior estabilidade em pH 8,0 a 9,0 e foi rapidamente inativada em pH ácido.

5- A atividade da protease lítica bruta de *Cellulomonas cartae* 191 foi parcialmente inibida por Ácido Etilenodiaminotetraacético e Fenilmetilsulfonilfluoreto (PMSF) na concentração final de 1mM.

6 - Células de *Saccharomyces cerevisiae* KL 88 são mais susceptíveis à lise por enzimas líticas de *Cellulomonas cartae* 191 na fase exponencial de crescimento do que na fase estacionária.

7- O extrato enzimático bruto produzido por *Cellulomonas cartae* 191 é capaz de lisar células viáveis de levedura *Saccharomyces cerevisiae* KL 88. As melhores condições para a lise enzimática são em pH 7,0 - 7,5 e temperatura de 30°C a 35°C.

8- O extrato enzimático bruto de *Cellulomonas cartae* 191 foi capaz de lisar as leveduras

Saccharomyces diastaticus NCYC 713, *Saccharomyces capensis* NCYC 761, *Candida glabrata* NCYC 388, *Debaryomyces vanrii* NCYC 577, *Kluyveromyces marxianus* NCYC 587, *Kluyveromyces lactis*, *Hansenula anomala* NCYC 435 e *Pachysolen tannophilus* NRRL2460.

9- O extrato bruto de *Cellulomonas cartae* 191 não foi capaz de lisar as linhagens: *Kluyveromyces drosophilarum* ATCC15126, *Rhodotorula rubra*, *Pichia membranaefaciens* NCYC 333, *Hansenula mrakii* NCYC 500 e *Trichosporon beigeli*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

AMRANE, A. and PRINGENT, Y. Behaviour of yeast *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* during its autolysis. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 69, p. 267-272, 1996.

ANDREWS, B. A., and ASENJO, J. A. Continuous-culture studies of synthesis and regulation of extracellular $\beta(1-3)$ glucanase and protease enzymes from *Oerskovia xanthineolytica*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 30, p. 628-637, 1987.

ASENJO, J. A., ANDREWS, B. A., HUNTER, J. B., and LECORRE, S. Microbial cell lytic enzyme systems: production and reaction kinetics. **Process Biochemistry**, October, p. 159-164, 1985.

BACON, J. S. D., GORDON, A. H., JONES, D., TAYLOR, I. F., and 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.

BARROS NETO, B., SCARMINIO, I. S. e BRUNS, R. E. Planejamento e otimização de experimentos. 2ª edição. Campinas, SP. Editora da UNICAMP, 1996.

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.

DOI, K., and DOI, A. Cloning and expression in *Escherichia coli* of the gene for an *Arthrobacter* $\beta(1-3)$ -glucanase. **Journal of Bacteriology**, v. 168, nº 3, p. 1272-1276, 1986.

FERRER, P., HALKIER, T., HEDEGAARD, L., SAVVA, D., DIERS, I., and ASENJO, J. A. Nucleotide sequence of a β -1,3-glucanase isoenzyme II_A gene of *Oerskovia xanthineolytica* LL G109 (*Cellulomonas cellulans*) and initial characterization of the recombinant enzyme expressed in *Bacillus subtilis*. **Journal of Bacteriology**, v. 178, n° 15, p4751-4757, 1996.

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.

FUNATSU, M., OH, H., AIZONO, Y., and SHIMODA, T. Protease of *Arthrobacter luteus*, properties and function on lysis of viable yeast cell. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 42, n° 10, p. 1975-1977, 1978.

HARTLAND, R. P., VERMEULEN, C. A., KLIS, F. M., SIETSMA, J. H. and 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., and 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.

HUNTER, J. B., and ASENJO, J.A. Kinetics of enzymatic lysis and disruption of yeast cells: II. A simple model of lysis kinetics. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 30, p. 481-490, 1987.

HUNTER, J., B., and 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.

KANEKO, T., KITAMURA, K., and YAMAMOTO, Y. Susceptibilities of yeasts to yeast cell wall lytic enzyme of *Arthrobacter luteus*, **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 37, n° 10, p. 2295-2302, 1973.

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., and 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° 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° 3, p. 253-256, 1982b.

KOBAYASHI, R., MIWA, T., YAMAMOTO, S., and 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.

LIU, L. C., PROKOPAKIS, G. J., ASENJO, J. A. Optimization of enzymatic lysis of yeast. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 32, p. 1113-1127, 1988.

MACWILLIAM, I. C. The structure, synthesis and function of the yeast cell wall - a review. **Journal of the Institute Brewing**, v. 76, p. 524- 535, 1970.

MANNERS, D. J., MASSON, A. J. and PATTERSON, J. C. The structure of a β -(1-3)-D-glucan from yeast cell walls. **The Biochemical Journal**, v. 135, p. 19-30, 1973.

NAGASAKI, S., NISHIOKA, T., MORI, H., and 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.

OBATA, T., IWATA, H., and NAMBA, Y. Proteolytic enzyme from *Oerskovia* sp CK lysing viable yeast cell. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 41, n° 12, p. 2387-2394, 1977.

PROKOPAKIS, G. J., and LIU, L. C. Monte carlo simulation of the enzymatic lysis of yeast. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 53, n° 3, p 290-295, 1997.

RILKE, O., BAUM, A., WEISS, J., HOMMEL, R. and KLEBER, H.-P. Kinetics of enzymatic lysis, formation and regeneration of protoplasts of *Candida (Torulopsis) apicola*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 8, p. 14-20, 1992.

ROWLEY, B. I., AND 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.

RYAN, E., and WARD, O. P. The application of lytic enzymes from *Basidiomycetes* *aphyllophorales* in production of yeast extract. **Process Biochemistry**., February, p. 12-16,

1988.

SAEKI, K., IWATW, J., YAMAZAKI, S., WATANABE, Y., TAMAI, Y. Purification 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.

SAITO, K., HASUO, T., YAMAMOTO, N., and TADENUMA, M. Yeast-lytic enzymes of *Rarobacter faecitabidus* YLM-1. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 52, n° 7, p. 1849-1850, 1988.

SCOTT, J. H., and 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., MURANAKA, Y., SATO, S., SAITO, K., and Tadenuma, M. Purification of the enzymes responsible for the lysis of yeast cell by *Rarobacter faecitabidus*. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 55, n° 2, p. 371-378, 1991.

SHIMOI, H., and 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, 1991.

SOARES, G. A. M. Caracterização da toxina "killer" produzida pela linhagem de *Saccharomyces cerevisiae* Y500-4L. Campinas, 1998. 91 p. Tese de Mestrado - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

STACKEBRANDT, E., HÄRINGER, M., SCHLEIFER, K. H. Molecular genetic evidence for the transfer of *Oerskovia* species into the genus *Cellulomonas*. **Archives of Microbiology**, v. 127, p. 179-185, 1980.

STACKEBRANDT, E., and PRAUSER, H. Assignment of genera *Cellulomonas*, *Oerskovia*, *Promicronospora* and *Jonesia* to *Cellulomonadaceae* fam. nov. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 14, p. 261-265, 1991.

STRATFORD, M. Another brick in the wall. Recent developments concerning the cell envelope. **Yeast**, v. 10, p. 1741-1752, 1994.

USUI, T., and 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. and VERRIPS, C. T. Identification of three manoproteins in the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Bacteriology**, v. 177, n°11, p 3104-3110, 1995.

VENTOM, A. M., and ASENJO, J. A. Characterization of yeast lytic enzymes from *Oerskovia xanthineolytica* LL-G109. **Enzymes Microbial Technology**, v. 13, p. 71-75, 1991.

YAMAMOTO, S., and NAGASAKI, S. Purification and characterization of an exo α -1,2-mannanase from *Flavobacterium dormitator* var. *glucanolyticae*. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 39, n° 10, p. 1981-1989, 1975.

YAMAMOTO, N., HASUO, T., TERAUCHI, T., SAITO, K., and 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., and TADENUMA, M. Heme requirement of novel yeast-lysing bacterium. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 51, n° 6, p. 1541-1545, 1987.

YAMAMOTO, N., SATO, S., SAITO, K., HASUO, T., TADENUMA, M., SUZUKI, K., TAMAOKA, J., and KOMAGATA, K. *Rarobacter faecitabidus* gen. nov., a yeast-lysing coryneform bacterium. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 38, n° 1, p. 7-11, 1988.

YAMAMOTO, N., SATO, S., MIKI, H., PARK, Y. and TADENUMA, M. Isolation of yeast-lysing bacteria in Brazil. **Report of Research Institute of Brewing**, v. 165, p. 37- 43, 1993.

ZLOTNIK, H., FERNANDEZ, M. P., BOWERS, B. and 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.