

β-1,3 GLUCANASES E QUITINASES: APLICAÇÃO NA LISE DE LEVEDURAS E INIBIÇÃO DE FUNGOS¹

β-1,3 glucanases and chitinases: application in the yeast cell lysis and fungi inhibition

Luciana Francisco Fleuri², Hélia Harumi Sato³

RESUMO

Objetivou-se, no presente trabalho, a aplicação de β-1,3 glucanases e quitinases da linhagem *Cellulosimicrobium cellulans* 191 na lise de leveduras e inibição de fungos, respectivamente. O delineamento experimental mostrou que as melhores condições para a lise de *Saccharomyces cerevisiae* KL-88 pela β-1,3 glucanase foi pH 6,5 e 35°C. As células de leveduras incubadas por 10 h em frascos sem agitação mostraram-se mais susceptíveis à lise pela ação da enzima. Foi obtido maior lise da levedura quando a suspensão de células foi submetida ao tratamento com β-1,3 glucanase e cisteína 1mM. A enzima invertase intracelular ou ligada à célula de *S. cerevisiae* KL-88 e *K. marxianus* NCYC 587 foi extraída após tratamento da suspensão celular com β-1,3 glucanase, sendo que o tratamento prévio das leveduras com a enzima aumentou a susceptibilidade das células à lise com ultra-som. A preparação de quitinase foi capaz de formar halos de inibição de alguns fungos.

Termos para indexação: β-1,3 glucanases, quitinases, lise celular, inibição.

ABSTRACT

The aim of this work was the application of β-1,3 glucanases and chitinases by *Cellulosimicrobium cellulans* 191 strain on yeast cell lysis and fungi inhibition, respectively. The experimental design study showed that the best conditions to *Saccharomyces cerevisiae* KL-88 lysis by β-1,3 glucanase extract were pH 6,5 and 35°C. This study also demonstrated that the yeast cells were more susceptible to lysis after 10 h of cultivation in flasks without agitation. Lysis activity was increased when *S. cerevisiae* KL-88 cell suspension was treated with β-1,3 glucanase and cystein 1mM. The enzyme invertase of *S. cerevisiae* KL-88 and *Kluyveromyces marxianus* NCYC 587 was extracted after treatment of cell suspension with β-1,3 glucanase and the previous treatment of yeasts with the enzyme, increased the susceptibility to lysis when ultrasonic treatment was used. The chitinase presented growth inhibition halos for some of the fungi.

Index terms: β-1,3 glucanases, chitinases, cell lysis, inhibition.

(Recebido em 5 de setembro de 2006 e aprovado em 18 de dezembro de 2007)

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, mananaproteínas e quitina, um polímero de β-1,4 N-acetilglicosamina (KIM & YUN, 2006; KLIS, 2004). A parede celular possui duas camadas principais: uma externa, composta de mananaproteínas e uma interna de glucana (CABIB et al., 2001).

As enzimas β-1,3 glucanases, β-1,6 glucanases, mananases, proteases e quitinases estão envolvidas na lise de leveduras. Em geral, somente duas enzimas são essenciais para o rompimento da célula: a protease lítica específica que degrada a camada externa de mananaproteína e a β-1,3 glucanase lítica que degrada a camada interna de glucana (ASENJO et al., 1985; SALAZAR & ASENJO,

2007); entretanto, a preparação bruta de β-1,3 glucanase da linhagem *Cellulosimicrobium cellulans* 191 é capaz de lisar a parede celular de leveduras sem a presença de proteases líticas (FLEURI & SATO, 2005).

Preparações enzimáticas comerciais como a Lyticase de *Arthrobacter luteus* e Lyticase recombinante expressa em *Escherichia coli* são utilizadas para lisar leveduras e para obtenção de protoplastos. Essas preparações são encontradas na forma bruta e parcialmente purificada e, em geral, são utilizadas em conjunto com uma protease e/ou outro agente que exerça a função de rompimento da camada externa de mananaproteína.

As enzimas que lisam a parede celular de leveduras têm aplicações biotecnológicas na preparação de protoplastos; na extração de proteínas, enzimas e pigmentos; na preparação de ração animal; na obtenção de carboidratos funcionais; no pré-tratamento para a

¹Pesquisa financiada pela FAPESP.

²Bióloga, Doutora em Ciência de Alimentos – Departamento de Ciência de Alimentos/DCA – Universidade Estadual de Campinas/UNICAMP – Rua Monteiro Lobato, 80 – Cidade Universitária – Cx. P. 6121 – 13083-862 – Campinas, SP – luciana@fea.unicamp.br

³Farmacêutica Doutora em Ciência de Alimentos, Professora Titular – Departamento de Ciência de Alimentos/DCA – Universidade Estadual de Campinas/UNICAMP – Rua Monteiro Lobato, 80 – Cidade Universitária – Cx. P. 6121 – 13083-862 – Campinas, SP – heliah@fea.unicamp.br

ruptura mecânica de células; como ferramenta para a determinação da composição da parede celular de leveduras e no estudo do mecanismo da síntese da parede celular para controle de leveduras patogênicas (FLEURI & SATO, 2005).

Diferentemente da parede celular das leveduras, a parede celular de fungos é composta principalmente por quitina, sendo, portanto, susceptível à ação de enzimas quitinolíticas produzidas por bactérias e outros microrganismos (SAHAI, 1993). As enzimas quitinolíticas podem ser aplicadas no biocontrole de fungos fitopatogênicos e insetos; para a produção de quitinooligossacarídeos biologicamente ativos, fonte de proteína unicelular e protoplastos fúngicos (PATIL et al., 2000).

O presente trabalho apresenta os parâmetros que influenciam a ação isolada da β -1,3 glucanase da linhagem *Cellulosimicrobium cellulans* 191 na lise de leveduras, assim como a aplicação da quitinase produzida pelo mesmo microrganismo na inibição de fungos.

MATERIAL E MÉTODOS

Microrganismos

A bactéria *Cellulosimicrobium cellulans* 191 vem sendo mantida em tubos inclinados com meio ágar TYM descrito por Yamamoto et al. (1993). A linhagem bacteriana é capaz de produzir β -1,3 glucanases e quitinases em meios de cultivo contendo diferentes indutores (FLEURI, 2003, 2006). As leveduras *Saccharomyces cerevisiae* KL-88 e *Kluyveromyces marxianus* NCYC 587 e os fungos *Rhizopus oligosporus*, *Mucor miehei*, *Penicillium* sp., *Aspergillus oryzae*, *Streptomyces phaeochromogenes*, *Aspergillus niger*, *Paecylomyces* sp. e *Trichoderma viride*, fazem parte da coleção de culturas do Laboratório de Bioquímica de Alimentos da Unicamp.

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

Obtenção das suspensões de células de leveduras

Para a obtenção de células de leveduras, uma alçada das culturas crescidas em tubos inclinados de meio YEPD, foi transferida para frascos Erlenmeyers de 250 mL, contendo 50 mL de meio YEPD líquido. Os frascos foram incubados em agitador rotatório a 30°C por 20 h, com agitação a 150 rpm. As células foram coletadas por centrifugação a 10.000 rpm por 10 min a 5°C e lavadas duas vezes com água destilada. Essas células foram ressuspendidas em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,5 até obter uma suspensão com densidade ótica igual a 1,68 a 660 nm. As suspensões de células de leveduras foram utilizadas

para o teste de lise enzimática da parede celular, como descrito a seguir.

Determinação da atividade lítica

A atividade de lise foi determinada segundo o método de Ventom & Asenjo (1991) modificado. A mistura para lise enzimática de células contendo 2,0 mL de suspensão de células de levedura, com densidade ótica igual a 1,68 a 660 nm; β -1,3 glucanase para a concentração final 0,11 U/mL, e tampão fosfato 0,1 M, pH 7,5 para completar o volume para 4,0 mL, foi incubada a 30°C, com agitação em intervalos de tempo regulares, durante 60 min. Simultaneamente, foi preparado, como referência, um tubo branco onde no lugar da solução enzimática bruta foi acrescentado tampão fosfato 0,1 M, pH 7,5. A atividade lítica foi calculada por modificação no método descrito por Obata et al. (1977) através das equações:

$$\begin{aligned} \text{Densidade Óptica do Controle (tempo}_{0\text{min}}) - \text{Densidade Óptica do Controle (tempo}_{60\text{min}}) &= X \\ \text{Densidade Óptica da Amostra (tempo}_{0\text{min}}) - \text{Densidade Óptica da Amostra (tempo}_{60\text{min}}) &= Y \\ \text{Absorbância obtida} &= Y - X. \end{aligned}$$

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

Determinação da atividade de β -1,3 glucanase

A atividade de β -1,3 glucanase da preparação utilizada na lise de levedura foi determinada como descrito por Saeki et al. (1994) utilizando laminarina como substrato. Uma unidade de atividade foi definida como a liberação de um μ mol de glicose por minuto por mL de solução enzimática.

Planejamento experimental para a análise dos efeitos de variáveis na lise de levedura

Foi realizado um total de 19 ensaios para o estudo de lise da levedura *Saccharomyces cerevisiae* KL-88 pela β -1,3 glucanase, tratando-se de um planejamento fatorial 2ⁿ com 3 pontos centrais, onde n é o número de variáveis independentes. As variáveis independentes analisadas foram: tempo de crescimento da levedura (10, 20 e 30 h), condições de agitação para o cultivo da levedura (0, 100 e 200 rpm), pH de lise (6,5; 7,5 e 8,5) e temperatura de lise (25, 30 e 35°C). A variável dependente analisada foi atividade lítica da levedura pela preparação de β -1,3 glucanase. A obtenção das células de leveduras e a atividade lítica foram realizadas como descrito anteriormente, entretanto os valores das variáveis analisadas seguiram as diferentes

combinações do planejamento experimental. A análise estatística dos resultados foi realizada através do programa computacional STATISTICA 5.0, utilizando o Experimental Design a 95% de confiança ($p \leq 0,05$).

Efeito da cisteína e β -mercaptoetanol na lise de levedura com a β -1,3 glucanase

Foi verificado o efeito da cisteína e β -mercaptoetanol nas concentrações de 1, 10 e 100 mM na mistura de reação contendo suspensão de células da levedura *S. cerevisiae* KL-88 e preparação enzimática de β -1,3 glucanase. A atividade lítica foi determinada como descrito anteriormente, utilizando as melhores condições selecionadas através do planejamento experimental. A análise dos dados foi realizada pelo programa MSTAT-C (1988), usando o teste de Tukey, a 95% de confiança.

Aplicação da β -1,3 glucanase na lise de leveduras e extração de enzimas intracelulares

A preparação enzimática bruta de β -1,3 glucanase foi aplicada na lise da parede celular e na extração de enzimas intracelulares ou ligadas à célula das leveduras *S. cerevisiae* KL-88 e *K. marxianus* NCYC 587. A atividade lítica foi determinada como descrito anteriormente, utilizando as melhores condições selecionadas através do planejamento experimental. Posteriormente, a mistura de reação foi centrifugada a 6.000 rpm por 15 min e o sobrenadante foi utilizado como fonte de enzima. A atividade de invertase foi determinada no sobrenadante da mistura de reação, utilizando sacarose como substrato, como descrito por Oliveira (1996), e a determinação da glicose foi realizada como descrito por Somogyi (1945). Uma unidade de atividade de invertase foi definida como a liberação de 1 μ mol de açúcar redutor por mg de massa celular seca de levedura durante 1 min.

Efeito do tratamento enzimático na lise de leveduras com ultra-som

A preparação enzimática bruta de β -1,3 glucanase foi aplicada no pré-tratamento da suspensão celular das leveduras *S. cerevisiae* KL-88 e *K. marxianus* NCYC 587 na lise com ultra-som. A atividade lítica foi determinada como descrito anteriormente, utilizando as melhores condições selecionadas através do planejamento experimental. Posteriormente, a mistura de reação foi tratada em ultra-sonicador Ultratip Labsonic, Lab Line, mod. 9100 a 180 watts, por 10 ou 20 segundos. Após o tratamento com ultra-som, a mistura de reação foi centrifugada a 6.000 rpm por 15 min e o sobrenadante utilizado como fonte de enzima. Como referência, foi utilizada a mistura de reação

tratada somente com ultra-som. A lise das leveduras foi determinada pela medida de proteínas liberadas (LOWRY et al., 1951), definida como μ g de proteínas liberadas/mg de massa celular seca de levedura. A atividade de invertase foi determinada como descrito no item anterior.

Aplicação da quitinase na inibição de fungos

Obtenção de células fúngicas

Os fungos *Rhizopus oligosporus*, *Mucor miehei*, *Penicillium* sp., *Aspergillus oryzae*, *Streptomyces phaeochromogenes*, *Aspergillus niger*, *Paecilomyces* sp. e *Trichoderma viride* foram utilizados para o estudo de inibição. Os fungos foram crescidos em placas contendo meio de cultivo ágar batata dextrose, por 10 dias a 28°C. Uma alçada de cada fungo foi transferida assepticamente para frascos Erlenmeyers de 250 mL, contendo 50 mL do meio de cultivo composto por 10 g/L de amido solúvel; 0,3 g/L de caseína livre de vitaminas; 2,0 g/L de KNO_3 ; 2,0 g/L de NaCl; 0,05 g/L de $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$; 0,01 g/L de $FeSO_4 \cdot 7 H_2O$ e 0,02 g/L de $CaCO_3$ e incubados a 28°C a 150 rpm por 20 h. O material foi centrifugado a 6.000 rpm por 6 min a 5°C. O micélio foi lavado 3 vezes com água destilada e ressuspendido em tampão fosfato 0,2 M, pH 5,8.

Aplicação da preparação bruta de quitinase na inibição de fungos

Para a detecção da atividade inibitória da preparação bruta de quitinase sobre fungos, uma alíquota de 0,5 mL de suspensão fúngica foi adicionada em placa de ágar batata dextrose e espalhada por toda a superfície com alça de drigalski. Num poço de 0,25 cm de diâmetro na parte central das placas foi aplicado, no 1º e 2º dia, 0,5 U de preparação bruta de quitinase. As placas foram incubadas a 28°C por 10 dias. A atividade inibitória da enzima sobre fungos foi determinada pela medida do diâmetro do halo de inibição como descrito por Roberts & Selitrennikoff (1988).

Determinação da atividade de quitinase

A atividade de quitinase foi determinada conforme a metodologia descrita por Reissig et al. (1955) e Sandhu et al. (1989) utilizando quitina coloidal como substrato (FLEURI, 2003). Uma unidade de atividade foi definida como 1 μ mol de N-acetilglicosamina formado nas condições do ensaio.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Planejamento experimental para a análise dos efeitos de variáveis na lise de levedura

Foram realizados 16 ensaios com diferentes combinações entre as variáveis estudadas e 3 repetições

no ponto central, totalizando 19 experimentos. A Tabela 1 indica que quando a levedura *S. cerevisiae* KL-88 foi submetida à ação da enzima lítica β -1,3 glucanase nas condições do ensaio 2 (10 h de crescimento estático da levedura, pH 6,5 e 35°C), foi obtida a maior atividade lítica (7,08 U/mL).

Na análise do efeito das variáveis independentes, a temperatura apresentou efeito positivo (1,36) na lise da levedura *S. cerevisiae* KL-88, indicando maior atividade lítica com o aumento da temperatura de 25°C para 35°C. As variáveis pH, tempo de fermentação e condições de agitação apresentaram efeitos negativos na resposta, respectivamente, -0,45; -2,08 e -0,74. Verificou-se, então, que as condições para maior atividade de lise de levedura entre os valores estudados, foram: pH 6,5 e temperatura de 35°C para a lise da levedura, tempo de 10 h de fermentação para a obtenção da massa celular de levedura sem agitação dos frascos. A interação das variáveis temperatura para a lise e agitação dos frascos provocou um efeito negativo (-0,40); enquanto que a combinação das variáveis pH e tempo de fermentação (efeito de 0,94) e também a

combinação das variáveis tempo de fermentação e condições de agitação (efeito de 0,84), resultaram em um efeito positivo na lise da levedura pela β -1,3 glucanase. A validade do modelo foi verificada pela Análise de Variância. O coeficiente de determinação obtido foi de 0,92. O valor do teste F calculado foi comparado ao valor do F tabelado para a distribuição de F a 95% de nível de confiança com os respectivos graus de liberdade, sendo o F calculado 7,05 vezes maior que o F tabelado, indicando que o modelo de primeira ordem é estatisticamente significativo e preditivo. Os coeficientes de regressão não estatisticamente significativos a 95% de nível de confiança foram excluídos do modelo, sendo incorporados no resíduo total. A partir da validação dos parâmetros de estudo, obteve-se o modelo linear que representa o comportamento da atividade lítica da β -1,3 glucanase sobre a levedura *S. cerevisiae* KL-88 e que descreve as respostas em função das variáveis analisadas (Equação 1).

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

Tabela 1 – Estudo da lise da levedura *S. cerevisiae* KL-88, utilizando a β -1,3 glucanase da linhagem *C. cellulans* 191, através de planejamento experimental.

Ensaio*	Temperatura (°C)	pH	Tempo de Fermentação da levedura (h)	Condições de agitação para crescimento da levedura (rpm)	Atividade lítica (U/mL)
1	-1 (25)	-1 (6,5)	-1 (10)	-1 (0)	4,54
2	1 (35)	-1 (6,5)	-1 (10)	-1 (0)	7,08
3	-1 (25)	1 (8,5)	-1 (10)	-1 (0)	2,94
4	1 (35)	1 (8,5)	-1 (10)	-1 (0)	4,26
5	-1 (25)	-1 (6,5)	1 (30)	-1 (0)	0,83
6	1 (35)	-1 (6,5)	1 (30)	-1 (0)	2,12
7	-1 (25)	1 (8,5)	1 (30)	-1 (0)	1,11
8	1 (35)	1 (8,5)	1 (30)	-1 (0)	3,06
9	-1 (25)	-1 (6,5)	-1 (10)	1 (200)	2,75
10	1 (35)	-1 (6,5)	-1 (10)	1 (200)	4,08
11	-1 (25)	1 (8,5)	-1 (10)	1 (200)	2,13
12	1 (35)	1 (8,5)	-1 (10)	1 (200)	3,49
13	-1 (25)	-1 (6,5)	1 (30)	1 (200)	1,16
14	1 (35)	-1 (6,5)	1 (30)	1 (200)	2,21
15	-1 (25)	1 (8,5)	1 (30)	1 (200)	2,01
16	1 (35)	1 (8,5)	1 (30)	1 (200)	2,12
17	0 (30)	0 (7,5)	0 (20)	0 (100)	3,42
18	0 (30)	0 (7,5)	0 (20)	0 (100)	3,12
19	0 (30)	0 (7,5)	0 (20)	0 (100)	3,39

*Aleatorizados previamente à experimentação.

Kaneko et al. (1973) estudaram a susceptibilidade de células das leveduras *Saccharomyces* sp. e *Candida* sp. à lise enzimática. Os autores verificaram que as células de leveduras são mais facilmente lisadas após tratamento térmico e que as leveduras na fase exponencial de crescimento são mais susceptíveis à lise do que aquelas obtidas na fase estacionária. Guilloux-Benatier et al. (2000) estudaram a atividade de lise da β -1,3 glucanase produzida pela bactéria *Oenococcus oeni* sobre células de *S. cerevisiae* em diferentes fases de crescimento. Os autores verificaram que a enzima foi capaz de lisar células viáveis e mortas da levedura, sendo que as células nas fases de crescimento exponencial e na fase estacionária foram lisadas com maior facilidade. Neste estudo a β -1,3 glucanase da linhagem de *C. cellulans* 191 apresentou maior lise de *S. cerevisiae* KL-88, na fase exponencial de crescimento (10 h de crescimento estático). O resultado também indica que a parede celular da levedura está em constante mudança, e por isso pode estar mais ou menos susceptível à lise enzimática quando suas células são obtidas em diferentes condições de crescimento.

Efeito da cisteína e β -mercaptoetanol na lise de levedura com a β -1,3 glucanase

A maior atividade de lise (19,54 U/mL) ocorreu na mistura de reação contendo 1mM de cisteína e 0,11 U de β -1,3 glucanase por mL de suspensão de levedura (Tabela 2). A aplicação de 10 mM de cisteína juntamente com 0,11 U de β -1,3 glucanase, resultou em pequeno aumento da atividade de lise da levedura em comparação com a ação individual de 0,11 U da enzima. A atividade lítica da levedura, pela preparação de 0,11 U de β -1,3 glucanase e 100 mM de cisteína foi nula. Altas concentrações de cisteína parecem inibir a atividade enzimática. A adição de

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

Segundo Doi et al. (1973), a β -1,3 glucanase I produzida por microrganismos do gênero *Arthrobacter* causa lise em células jovens de leveduras na presença de β -mercaptoetanol e 0,6 M de KCl. Segundo Kaneko et al. (1973), as células de leveduras são mais susceptíveis à lise enzimática quando tratadas com β -mercaptoetanol ou cisteína. A fração A da preparação comercial Zymolyase, composta por uma β -1,3 glucanase, é capaz de causar lise da parede celular de leveduras somente na presença de β -mercaptoetanol. Segundo Kitamura (1982) o β -mercaptoetanol exerce o papel de uma protease lítica, destruindo a camada externa de mananoproteína da parede celular e permitindo o acesso da β -1,3 glucanase à camada de glucana. Salazar & Asenjo (2007) relataram a lise de leveduras com a atuação combinada de protease e β -1,3 glucanase sem a presença de agentes redutores como o β -mercaptoetanol. No presente estudo, a enzima β -1,3 glucanase da linhagem *C. cellulans* 191 foi capaz de lisar a levedura *S. cerevisiae* KL-88 sem a necessidade de protease e qualquer agente redutor. A adição de cisteína na concentração de 1 mM permitiu um maior acesso da β -1,3 glucanase à camada interna de glucana da parede celular da levedura, aumentando a ação lítica da enzima.

Aplicação da β -1,3 glucanase na lise de leveduras e extração de enzimas intracelulares

As enzimas invertases de *S. cerevisiae* KL-88 e *K. marxianus* NCYC 587 podem ser extraídas com o

Tabela 2 – Efeito da cisteína e β -mercaptoetanol sobre a levedura *S. cerevisiae* KL-88, utilizando β -1,3 glucanase.

Testes	Atividade lítica (U/mL)	Testes	Atividade lítica (U/mL)
0,11 U/mL β -1,3 glucanase	9.81 * _C	0,11 U/mL β -1,3 glucanase	7.64 * _A
1 mM de cisteína + 0,11 U/mL β -1,3 glucanase	19.54 * _A	1 mM de β -mercaptoetanol + 0,11 U/mL β -1,3 glucanase	8.63 * _B
10 mM de cisteína + 0,11 U/mL β -1,3 glucanase	10.06 * _B	10 mM de β -mercaptoetanol + 0,11 U/mL β -1,3 glucanase	9.08 * _C
100 mM de cisteína + 0,11 U/mL β -1,3 glucanase	0 * _D	100 mM de β -mercaptoetanol + 0,11 U/mL β -1,3 glucanase	9.2 * _C

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

tratamento da massa celular das leveduras com β -1,3 glucanase. Foi obtido 429,01 U de atividade de invertase/mg de massa celular seca de *S. cerevisiae* KL-88 e 872,64 U de atividade de invertase/mg de massa celular seca de *K. marxianus* NCYC 587, após tratamento das leveduras com a β -1,3 glucanase durante 60 min a 35°C.

Efeito do tratamento enzimático na lise de leveduras com ultra-som

O pré-tratamento das leveduras *S. cerevisiae* KL-88 e *K. marxianus* NCYC 587 com β -1,3 glucanase aumentou a susceptibilidade das mesmas ao tratamento com ultra-som (Tabelas 3). Após tratamento ultra-sônico da suspensão de *S. cerevisiae* KL-88, durante 10 e 20 s a 180 W, foram obtidos, respectivamente 115,82 e 171,68 U de atividade de invertase/mg de massa celular seca. No pré-tratamento com 0,11 U/mL de β -1,3 glucanase seguido de tratamento de 10 e 20 s a 180 W foram obtidos, respectivamente, 458,43 e 448,07 U de atividade de invertase/mg de massa celular seca, correspondendo a um aumento de 395,8% e 261%, respectivamente, em relação ao experimento realizado somente com ultra-som. O tratamento prévio das células de *K. marxianus* NCYC 587

com a preparação enzimática de β -1,3 glucanase também aumentou a quantidade de proteínas liberadas (Tabela 3).

Aplicação da preparação bruta de quitinase na inibição de fungos

O crescimento dos fungos *R. oligosporus*, *M. miehei*, *S. phaeochromogenes*, *Paecylomyces* sp. e *T. viride* em placas de ágar batata dextrose foi inibido pela preparação bruta de quitinase da linhagem *C. cellulans* 191, sendo que foram observados halos de inibição de 1,2; 1,2; 1,1; 1,35 e 0,8 cm de diâmetro, respectivamente (Figura 1). O crescimento dos fungos *Penicillium* sp., *A. oryzae* e *A. niger* não foi inibido pela enzima.

Várias enzimas têm sido estudadas como agentes antifúngicos em potencial. A ação fungicida deve-se principalmente à hidrólise dos componentes da parede celular. Sela-Buurlage et al. (1993) verificaram a atividade antifúngica de diferentes isoformas de quitinases e β -1,3 glucanases do tabaco que apresentaram atividade contra esporos de *Fusarium solani*. Ji & Kùc (1996) descreveram a atividade antifúngica de β -1,3 glucanase e quitinase de pepino (*Cucumis sativus* L.) sobre *Colletotrichum lagenarium*. A ação das enzimas promoveu um efeito

Tabela 3 – Extração de invertase de *S. cerevisiae* KL-88 e *K. marxianus* NCYC 587, utilizando β -1,3 glucanase e ultrasonificador.

Leveduras	Tratamentos	U de Invertase	Proteínas totais (ug/mL)
<i>S. cerevisiae</i> KL-88	0,11 U/mL β -1,3 glucanase	429,01	-
	10 ^{''} /180W	115,82	178,48
	0,11 U/mL β -1,3 glucanase + 10 ^{''} /180W	458,43	404,96
	20 ^{''} /180W	171,68	188,4
<i>K. marxianus</i> NCYC 587	0,11 U/mL β -1,3 glucanase + 20 ^{''} /180W	448,07	397,24
	0,11 U/mL β -1,3 glucanase	872,64	-
	10 ^{''} /180W	258,45	57,92
	0,11 U/mL β -1,3 glucanase + 10 ^{''} /180W	930,73	377,64
<i>K. marxianus</i> NCYC 587	20 ^{''} /180W	322,91	58,72
	0,11 U/mL β -1,3 glucanase + 20 ^{''} /180W	1088,07	379,56

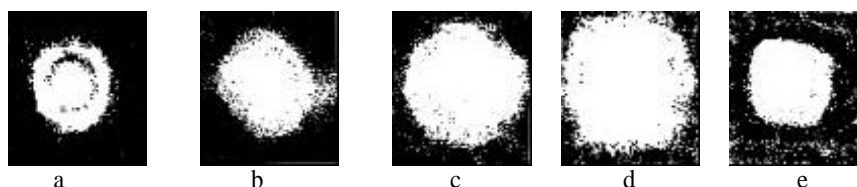


Figura 1 – Inibição do crescimento de fungos utilizando quitinase. Fungos: a- *R. oligosporus*, b- *M. miehei*, c- *S. phaeochromogenes*, d- *Paecylomyces* sp.; e- *T. viride*.

sinérgico na inibição do crescimento do fungo, além de lise das hifas e crescimento anormal. A quitinase da linhagem *C. cellulans* 191 apresentou inibição do crescimento de diferentes fungos.

CONCLUSÕES

A linhagem *C. cellulans* 191 é uma bactéria potente quanto à produção de enzimas que podem atuar na lise de leveduras e inibição de fungos. A β -1,3 glucanase apresentou a maior atividade lítica sobre a levedura *S. cerevisiae* KL-88 utilizando pH 6,5 e 35°C durante a lise e com as células da levedura obtidas após 10 h de fermentação em frascos sem agitação. A enzima também permitiu a extração da enzima invertase de *S. cerevisiae* KL-88 e *K. marxianus* NCYC 587 e aumentou a susceptibilidade dessas leveduras à lise com ultra-som. A ação da enzima pôde ser beneficiada pela utilização de cisteína na concentração 1mM. A quitinase de *C. cellulans* 191 inibiu o crescimento dos fungos *R. oligosporus*, *M. miehei*, *S. phaeochromogenes*, *Paecilomyces* sp. e *T. viride*.

AGRADECIMENTOS

À FAPESP pela concessão das bolsas de Mestrado e Doutorado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ASENJO, J. A.; ANDREWS, B. A.; HUNTER, J. B.; LECORRE, S. Microbial cell lytic enzyme systems: production and reaction kinetics. **Process Biochemistry**, Oxford, p. 159-164, 1985.
- CABIB, E.; ROH, D.; SCHMIDT, M.; CROTTI, L. B.; VARMA, A. The yeast cell wall and septum as paradigms of cell growth and morphogenesis. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 276, n. 23, p. 19679-19682, 2001.
- DOI, K.; DOI, A.; FUKUI, T. Purification and properties of lytic β -glucanase from an *Arthrobacter bacterium*. **Agricultural and Biological Chemistry**, Tokyo, v. 37, n. 7, p. 1619-1627, 1973.
- FLEURI, L. F. **Produção de β -1,3 glucanases, proteases líticas e quitinases por microrganismos e aplicação na lise de leveduras**. 2003. 141 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.
- FLEURI, L. F. **β -1,3 glucanases, proteases e quitinases: produção, purificação e aplicação**. 2006. 213 f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.
- FLEURI, L. F.; SATO, H. H. Produção, purificação, clonagem e aplicação de enzimas líticas. **Química Nova**, São Paulo, v. 28, n.5, p. 871-879, 2005.
- GUILLOUX-BENATIER, M.; PAGEAULT, O.; MAN, A.; FEUILAT, M. Lysis of yeast cells by *Oenococcus oeni* enzymes. **Journal Industrial of Microbiology and Biotechnology**, Heidelberg, v. 25, p. 193-197, 2000.
- JI, C.; KÙC, J. Antifungal activity of cucumber β -1,3 glucanase and chitinase. **Physiology and Molecular Plant Pathology**, London, v. 49, p. 257, 1996.
- KANEKO, T.; KITAMURA, K.; YAMAMOTO, Y. Susceptibilities of yeasts to yeast cell wall lytic enzyme of *Arthrobacter luteus*. **Agricultural and Biological Chemistry**, Tokyo, v. 37, n. 10, p. 2295-2302, 1973.
- KIM, K. S.; YUN, H. S. Production of soluble b-glucan from cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 39, p. 496-500, 2006.
- KITAMURA, K. A protease that participates in yeast cell wall lysis during zymolyase digestion. **Agricultural and Biological Chemistry**, Tokyo, v. 46, n. 8, p. 2093-2099, 1982.
- KLIS, F. M.; GROOT, P. de; BRUL, S.; HELLINGWERF, K. **Molecular organization and biogenesis of the cell wall: metabolism and molecular physiology of *Saccharomyces cerevisiae***. 2. ed. [S.l.: s.n.], 2004.
- LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, L. A.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 193, p. 265, 1951.
- MSTAT, C. **A microcomputer program for the design, management and analysis of agronomic research experiments**. [S.l.]: MSTAT, 1998.
- OBATA, T.; IWATA, H.; NAMBA, Y. Proteolytic enzyme from *Oerskovia* sp. CK lysing viable yeast cell. **Agricultural and Biological Chemistry**, Tokyo, v. 41, n. 12, p. 2387-2394, 1977.
- OLIVEIRA, I. **Determinação das condições de separação e purificação de b-glicosidase a partir de complexo enzimático**. 1996. 122 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1996.

- PATIL, R. S.; GHORMADE, V.; DESHPANDE, M. V. Review: chitinolytic enzymes: an exploration. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 26, p. 473-483, 2000.
- RÉISSIG J. L.; STROMINGER, J. L.; LELOIR, L. F. A modified colorimetric method for the estimation of N-acetylamino sugar. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 217, p. 959, 1955.
- ROBERTS, W. K.; SELITRENNIKOFF, C. P. Plant and bacterial chitinases differ in antifungal activity. **Journal of General Applied Microbiology**, Tokyo, v. 134, p. 169, 1988.
- SAEKI, K.; IWATA, J.; YAMAZAKI, S.; WATANABE, Y.; TAMAI, Y. Purification and characterization of a yeast lytic β -1,3-glucanase from *Oerskovia xanthineolytica* TK-1. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, [S.l.], v. 78, p. 407-412, 1994.
- SAHAI, A. S.; MANOCHA, M. S. Chitinase of fungi and plants: their involvement in morphogenesis and host-parasite interactions. **FEMS Microbiology Reviews**, Oxford, v. 11, p. 317-338, 1993.
- SALAZAR, O.; ASENJO, J. A. Enzymatic lysis of microbial cells. **Biotechnology Letters**, Oxford, v. 29, p. 984-994, 2007.
- SANDHU, D. K.; WADHWA, V.; BAGGA, P. S. Use of lytic enzymes for protoplast production in *Trichoderma reesei* QM9414. **Enzyme and Microbiol Technology**, New York, v. 11, p. 21, 1989.
- SELA-BUURLAGE, M. B.; PONSTEIN, A. S.; BRES-VLOEMANS, S. A.; MELCHERS, L. S.; ELZEN, P. van den; CORNELISSEN, B. Only specific Tobacco (*Nicotiana tabacum*) chitinases and β -1,3 glucanases exhibit antifungal activity. **Plant Physiology**, Rockville, v. 101, p. 857, 1993.
- SOMOGYI, M. A. A new reagent for the determination of sugars. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 160, p. 61-68, 1945.
- VENTOM, A. M.; ASENJO, J. A. Characterization of yeast lytic enzymes from *Oerskovia xanthineolytica* LL-G109. **Enzymes Microbial Technology**, New York, v. 13, p. 71-75, 1991.
- YAMAMOTO, N.; SATO, S.; MIKI, H.; PARK, Y.; TADENUMA, M. Isolation on yeast lysing bacteria, and a new species *Rarobacter incanus*. **Journal of General Applied Microbiology**, Tokyo, v. 39, p. 261-272, 1993.