**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA – EEL**

Luiz Carlos de Sousa

Avaliação do desempenho de *Bacillus licheniformis* E-44 em diferentes condições de cultivo visando a obtenção de hidrolisado enzimático de levedura (*Saccharomyces cerevisiae*)

Lorena – SP

2008

Luiz Carlos de Sousa

Avaliação do desempenho de *Bacillus licheniformis* E-44 em diferentes condições de cultivo visando a obtenção de hidrolisado enzimático de levedura (*Saccharomyces cerevisiae*)

Dissertação apresentada à Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia Industrial.

Área de Concentração: Microbiologia Aplicada

Orientador: Prof. Dr. Ismael Maciel de Mancilha

Lorena – SP

2008

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Catálogo na Publicação
Biblioteca Universitária
Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo

Sousa, Luiz Carlos de

Avaliação do desempenho de *Bacillus licheniformis* E-44 em diferentes condições de cultivo visando a obtenção de hidrolisado enzimático de levedura (*Saccharomyces cerevisiae*) / Luiz Carlos de Sousa ; orientador Ismael Maciel de Mancilha. – Lorena: 2008.

123 f. : fig.

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial. Área de Concentração: Microbiologia Aplicada) – Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo.

1. Microbiologia Aplicada 2. Prebióticos 3. *Bacillus licheniformis* 4. *Saccharomyces cerevisiae* 5. Protease 6. β -1,3-glucanase 7. α -mananase. I. Título.

579.6 - CDU

DEDICATÓRIA

A minha família, principalmente meus pais e avós, e a minha noiva, pelo incentivo e amor dado sempre. Com muito carinho e admiração, este título é em homenagem a vocês, pessoas de fundamental importância em minha vida.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar a DEUS por mais esta conquista em minha vida.

Aos meus pais e avós, e a minha noiva, que me estimularam nos momentos de dificuldade e me deram forças para prosseguir.

Ao Prof. Dr. Ismael Maciel de Mancilha pela orientação, incentivo e, principalmente pelo apoio e confiança em meu trabalho.

A Prof. Dra. Maria das Graças de Almeida Felipe, sempre disposta a ajudar, pelo constante apoio e paciência nos momentos de dificuldade e que muito contribuiu para o complemento deste trabalho.

A todos meus amigos do DEBIQ, em especial, aos amigos do Laboratório de Probióticos, Tatiane, Taís e Márcio, além do Michel e Ricardo, companheiros desde a graduação, e que muito me ajudaram ao longo do trabalho com palavras de incentivo e conselhos valiosos.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) pela bolsa concedida.

BIOGRAFIA

Luiz Carlos de Sousa nasceu no dia 23 de fevereiro de 1980, na cidade de Borda da Mata/MG, onde residiu até o ano 2000. Em 2001 ingressou no curso de Engenharia Bioquímica da Faculdade de Engenharia Química de Lorena - FAENQUIL. Passados dois anos, iniciou suas atividades de pesquisa em nível de iniciação científica no Laboratório de Bioquímica e, posteriormente, no Laboratório de Probióticos do Departamento de Biotecnologia - DEBIQ desta Faculdade.

Em 2006 iniciou seus estudos de pós-graduação, em nível de mestrado, junto ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial – DEBIQ (FAENQUIL), atualmente, Escola de Engenharia de Lorena – EEL - USP, como bolsista do CNPq. Nesta oportunidade, deu continuidade a sua formação profissional enfocando seus estudos na área de Microbiologia Aplicada com ênfase para a produção e aplicação de microrganismos probióticos e compostos prebióticos.

Em 2007 começou a lecionar Química como voluntário em um curso pré-vestibular junto à Associação da Comunidade Negra de Lorena – Quilombo Imperial.

Em 2008 iniciou seus estudos em nível de graduação em Física junto à Faculdade de Engenharia de Guaratinguetá – FEG – UNESP, bem como ingressou no DATTUM – Cursos Preparatórios, nessa mesma cidade, onde leciona Química.

RESUMO

SOUSA, L.C. Avaliação do desempenho de *Bacillus licheniformis* E-44 em diferentes condições de cultivo visando a obtenção de hidrolisado enzimático de levedura (*Saccharomyces cerevisiae*). 2008. 123f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2008.

Prebióticos são aditivos alimentares não digeríveis que afetam benéficamente a saúde do hospedeiro pela estimulação seletiva do crescimento ou da atividade de um número limitado de bactérias probióticas. Apesar do avanço científico observado nesta área, poucos estudos têm sido reportados no que diz respeito à utilização de derivados de parede celular de levedura como prebióticos. Sendo assim, o presente estudo visou avaliar diferentes condições de crescimento e produção de enzimas extracelulares pela cepa *Bacillus licheniformis* E-44, com o objetivo de se obter um extrato enzimático para promover a hidrólise da parede celular de *Saccharomyces cerevisiae* gerando derivados que apresentam propriedades prebióticas. Os cultivos foram realizados em reator de bancada e em frascos Erlenmeyer sob diferentes condições de pH, composição de meio, fonte de carbono, agitação e aeração, sendo as amostras retiradas periodicamente para determinação do crescimento celular por turbidimetria e quantificação das respectivas enzimas (protease, α -1,3-glucanase e α -mananase). Os resultados demonstraram que *Bacillus licheniformis* E-44 apresentou melhor desempenho, no que se refere ao crescimento celular, na presença de caseína como fonte de carbono, pH 8,0-8,5, agitação de 200 rpm e relação volume de frasco/volume de meio de 1:10. Por outro lado, no tocante à síntese das respectivas enzimas, essa não foi detectada nas condições avaliadas.

Palavras-chave: Prebióticos. *Bacillus licheniformis* E-44. *Saccharomyces cerevisiae*. Protease. α -1,3-glucanase. α -mananase.

ABSTRACT

SOUSA, L.C. **Evaluation of *Bacillus licheniformis* E-44 performance in different growth conditions in order to obtain an enzyme hydrolysate of yeast *Saccharomyces cerevisiae*.** 2008. 123f. Dissertation (Master of Science in Industrial Biotechnology) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2008.

Prebiotics are described as “non-digestible food additives that beneficially affect the host health by selectively stimulating the growth and/or activity of some probiotic species”. In despite of the scientific developments observed in this area, few studies are found concerning the utilization of yeast cell wall compounds as prebiotics. Therefore, the present study aimed to evaluate different conditions of growth and extracellular enzyme production by *Bacillus licheniformis* E-44 with the goal of obtaining an enzymatic extract to promote the hydrolysis of the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae* generating compounds which present some prebiotic properties. The growth was carried out in lab scale bioreactors and in Erlenmeyer flasks under different conditions of the pH, medium composition, carbon sources, agitation and aeration. The samples were withdraw periodically for determination of cellular growth by turbidimetry and quantification of protease, α -1,3-glucanase and α -mannanase activities. The results showed that *Bacillus licheniformis* E-44 presented the best performance concerning to cellular growth when this strain was cultivated in a medium containing casein as carbon source, pH 8,0-8,5, 200 rpm of agitation rate and flask/medium bulk relation of 1:10. On the other hand, regarding the synthesis of those enzymes, there was not detected any activities in the conditions evaluated.

Keywords: Prebiotics. *Bacillus licheniformis* E-44. *Saccharomyces cerevisiae*. Protease. α -1,3-glucanase. α -mannanase.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Porção da parede celular de *Saccharomyces cerevisiae* mostrando as camadas de polissacarídeos localizadas individualmente.

Figura 2 – Crescimento de *Bacillus licheniformis* E-44 em meio contendo melaço de cana-de-açúcar em reator de bancada.

Figura 3 – Crescimento de *Bacillus licheniformis* E-44 em meio contendo diferentes indutores (meios nº 3, 4 e 5) a pH 8,0 em frascos agitados.

Figura 4 – Variação do pH durante o cultivo de *Bacillus licheniformis* E-44 nos meios nº 3, 4 e 5, contendo diferentes indutores.

Figura 5 – Crescimento de *Bacillus licheniformis* E-44 nos meios nº 3, 4 e 5 contendo diferentes indutores a pH 5,5.

Figura 6 – Crescimento de *Bacillus licheniformis* E-44 nos meios nº 3, 4 e 5 contendo diferentes indutores a pH 7,0.

Figura 7 – Crescimento de *Bacillus licheniformis* E-44 nos meios nº 3, 4 e 5 contendo diferentes indutores a pH 8,5.

Figura 8 – Variação do pH durante o cultivo de *Bacillus licheniformis* E-44 nos meios nº 3, 4 e 5 contendo diferentes indutores como fonte de carbono em pH inicial 5,5.

Figura 9 – Variação do pH durante o cultivo de *Bacillus licheniformis* E-44 nos meios nº 3, 4 e 5 contendo diferentes indutores como fonte de carbono em pH inicial 7,0.

Figura 10 – Variação do pH durante o cultivo de *Bacillus licheniformis* E-44 nos meios nº 3, 4 e 5 contendo diferentes indutores como fonte de carbono em pH inicial 8,5.

Figura 11 – Crescimento de *Bacillus licheniformis* E-44 nos meios n° 6, 7 e 8 na presença de caseína como indutor.

Figura 12 – Crescimento de *Bacillus licheniformis* E-44 em meio n° 3 em diferentes condições de agitação.

Figura 13 – Crescimento de *Bacillus licheniformis* E-44 em meio n° 3 em diferentes condições de aeração.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1 Bactérias do Gênero <i>Bacillus</i> : uma Abordagem Geral	15
2.2 <i>Bacillus licheniformis</i>	16
2.3 Produção Microbiana de Enzimas, Principais Características e Aplicações	17
2.3.1 Proteases	17
2.3.1.1 Parâmetros que Interferem na Produção Microbiana de Proteases	19
A) Composição do Meio de Cultivo	19
A.1 - Fonte de Carbono	20
A.2 - Fonte de Nitrogênio	22
A.3 - Fonte de Minerais	23
B) Temperatura	24
C) pH	27
D) Agitação e Aeração	30
E) Tempo de Incubação	32
F) Nível de Inóculo	34
2.3.2 Glucanases	35
2.3.2.1 Parâmetros que Interferem na Produção Microbiana de β -glucanases	36
A) Composição do Meio de Cultivo	36
B) Temperatura	39
C) pH	41
D) Agitação e Aeração	43
E) Tempo de Incubação	45
2.3.3 Mananases	46
2.3.3.1 Parâmetros que Interferem na Produção Microbiana de α -Mananases	47
2.4 Prebióticos	47
2.4.1 Definição e Aplicações	47

2.4.2 Histórico	49
2.5 Leveduras e seus Derivados.....	50
2.5.1 Parede Celular de Leveduras	51
2.5.1.1 Glucanas	52
2.5.1.2 Mananoproteínas.....	54
2.6 Hidrólise Enzimática de Células de Leveduras	61
3. MATERIAL E MÉTODOS	68
3.1 Microrganismo e sua Manutenção	68
3.2 Meios de Cultivo	68
3.3 Determinação do Crescimento Celular, Obtenção e Caracterização do Extrato Enzimático	69
3.3.1 Cultivo em Reator	69
3.3.2 Cultivo em Frascos Erlenmeyer.....	70
3.3.2.1 Preparo do Inóculo.....	70
3.3.2.2 Avaliação do Efeito de Diferentes Indutores sobre o Crescimento Celular e Produção de Enzimas.....	70
3.3.2.3 Avaliação do Efeito do pH sobre o Crescimento Celular e Produção de Enzimas.....	71
3.3.2.4 Avaliação do Efeito de Diferentes Meios de Cultivo sobre o Crescimento Celular e Produção de Enzimas	71
3.3.2.5 Avaliação do Efeito da Agitação sobre o Crescimento Celular e Produção de Enzimas.....	72
3.3.2.6 Avaliação do Efeito da Aeração sobre o Crescimento Celular e Produção de Enzimas.....	72
3.4 Métodos Analíticos.....	73
3.4.1 Determinação da Biomassa Bacteriana	73
3.4.2 Determinação da Atividade Enzimática	73
3.4.2.1 Protease.....	73
3.4.2.2 β -1,3-glucanase.....	75
3.4.2.3 α -mananase	77
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	78
4.1 Avaliação do Crescimento Celular e Produção de Enzimas em Reator	78

4.2 Avaliação do Crescimento Celular e Produção de Enzimas em Frascos Erlemeyer.....	79
4.2.1 Avaliação do Efeito de Diferentes Indutores sobre o Crescimento Celular, pH do Meio de Cultivo e Produção de Enzimas.....	79
4.2.2 Avaliação do Efeito do pH sobre o Crescimento Celular e Produção de Enzimas.....	82
4.2.3 Avaliação do Efeito de Diferentes Meios de Cultivo sobre o Crescimento Celular e Produção de Enzimas	87
4.2.4 Avaliação do Efeito da Agitação sobre o Crescimento Celular e Produção de Enzimas.....	89
4.2.5 Avaliação do Efeito da Aeração sobre o Crescimento Celular e Produção de Enzimas.....	90
5. CONCLUSÕES	92
6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	93
REFERÊNCIAS.....	94
APÊNDICE	120

1) INTRODUÇÃO

Historicamente, o estado nutricional da maioria da população mundial é afetado por hábitos inadequados como o consumo excessivo de gorduras, principalmente saturadas, elevada ingestão de açúcares e diminuição considerável do consumo de amido, fibras, vitaminas e sais minerais, que podem ser causadores da elevada incidência de doenças crônico-degenerativas.

Paralelamente a este fenômeno, observa-se um acelerado desenvolvimento de novos produtos alimentícios, que apresentam, além de características nutricionais e tecnológicas adequadas, componentes que exercem funções biológicas com o intuito de prevenir doenças e promover a saúde, conhecidos como alimentos funcionais, dentre os quais se destacam os probióticos e prebióticos.

Prebióticos são aditivos alimentares não digeríveis que afetam benéficamente a saúde do hospedeiro pela estimulação seletiva do crescimento ou da atividade de um número limitado de bactérias probióticas. Em outras palavras, são substâncias não metabolizáveis na parte superior do trato gastrointestinal e que, chegando ao intestino grosso, servem de fonte de carbono para as bactérias bífidas e lactobacilos ali presentes. Dentre os inúmeros microrganismos que apresentam esta propriedade e merecem destaque pela sua importância e utilização encontram-se as leveduras e seus derivados, originados como excedentes nas usinas de álcool e cervejarias.

O gênero *Bacillus* pertence ao grupo de bactérias aeróbias ou facultativas, gram-positivas, saprófitas e formadoras de endosporos, as quais podem ser isoladas do solo e/ou de plantas em todo o mundo. Muitas destas espécies crescem bem em meio simples e produzem enzimas hidrolíticas extracelulares, tais como, proteases, amilases, além de mananases e glucanases, que degradam polímeros complexos, principalmente polissacarídeos. Neste contexto, destaca-se o extrato enzimático obtido pelo crescimento de *Bacillus licheniformis* em determinadas condições, que pode ser utilizado no processo de hidrólise da parede celular de leveduras, como *Saccharomyces cerevisiae*. Este hidrolisado é rico em polissacarídeos complexos, principalmente β -glucanas e mananas, os quais apresentam efeito prebiótico.

O interesse no potencial biotecnológico do uso de leveduras é impulsionado pelo reconhecimento de características, tais como, a facilidade de manuseio e condições de obtenção de grandes quantidades de massa celular.

Por outro lado, leveduras autolisadas e extrato de leveduras são tradicionalmente utilizados na indústria de alimentos como flavorizante e suplemento nutritivo, principalmente como fonte protéica, de minerais e vitaminas do complexo B. Atualmente, células de levedura, principalmente *Saccharomyces cerevisiae*, bem como seus derivados, constituídos de resíduos da parede celular, vem sendo intensamente utilizados, principalmente como suplementos de ração animal, atuando como prebiótico.

Desta forma, no presente trabalho avaliou-se diferentes condições de crescimento e produção de enzimas extracelulares pela cepa *Bacillus licheniformis* E-44, com o objetivo de se obter um extrato enzimático para promover a hidrólise da parede celular de *Saccharomyces cerevisiae* gerando derivados que apresentam propriedades prebióticas.

.

2) REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1) Bactérias do Gênero *Bacillus*: uma Abordagem Geral

O gênero *Bacillus* pertence ao grupo de bactérias aeróbias ou facultativas, gram-positivas, saprófitas e formadoras de endosporos, as quais podem ser isoladas do solo e/ou de plantas em todo o mundo. Muitos bacilli são organoheterotróficos e utilizam uma considerável gama de compostos orgânicos simples (açúcares, aminoácidos, ácidos orgânicos) como substratos para o seu metabolismo. A maioria é mesófilo, com temperatura ótima para crescimento entre 30 e 45°C; no entanto, algumas espécies crescem em temperaturas superiores à 65°C, os termófilos (SNEATH, 1986).

Muitos bacilli crescem bem em meio simples e produzem enzimas hidrolíticas extracelulares, tais como, proteases, amilases, além de mananases e glucanases, que degradam polímeros complexos, principalmente polissacarídeos, dependendo das condições do meio de cultura utilizado (SHUMI et al., 2004). Segundo Pérez et al. (2007), algumas espécies, tais como, *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. cereus* e *B. clausii*, são grandes produtoras de enzimas extracelulares e endosporos e têm sido amplamente utilizadas como probióticos em animais e humanos.

Pandey et al. (2000) reportaram que não existe um meio ideal para a produção de enzimas por espécies de *Bacillus*, sendo esse dependente das características fisiológicas e exigências nutricionais inerentes a cada espécie desse gênero.

Existe ampla diversidade na fisiologia deste gênero, incluindo a degradação de diversos tipos de substratos derivados de plantas e animais como fontes de carbono, tais como, celulose, amido, pectina, proteínas, hidrocarbonetos e outros (THE GENUS BACILLUS, 2005).

Em função das características de não patogenicidade das bactérias do gênero *Bacillus*, essas podem ser amplamente utilizadas industrialmente (VEITH et al., 2004).

Atualmente, diversas enzimas de importância econômica são produzidas industrialmente por meio do cultivo de *Bacillus sp.* Estima-se que mais de 300 toneladas de enzimas, principalmente proteases, são produzidas anualmente a partir do cultivo de espécies dessas bactérias (PÉREZ et al., 2007). Adicionalmente, bactérias do gênero *Bacillus* também encontram aplicação na indústria de bioinseticida, no tratamento de água

(REIS, 2004) e na produção de antibióticos, tais como, bacitracina, poliximina, tirocidina, gramicidina e circulina (THE GENUS BACILLUS, 2005).

2.2) *Bacillus licheniformis*

Bacillus licheniformis, uma bactéria identificada como não-patogênica, é classificada como GRAS (Generally Recognized As Safe) pelo U.S. Food and Drug Administration na produção de alfa-amilase. Segundo a U.S. Environmental Protection Agency (2003), pesquisas realizadas com a cepa de *Bacillus licheniformis* SB3086 evidenciaram a não ocorrência de danos à saúde de humanos e ratos, embora tivessem sido observados problemas relacionados à reprodução em animais domésticos.

Segundo Veith et al. (2004), *Bacillus licheniformis* se encontra amplamente distribuído na natureza, principalmente no solo associado com plantas e materiais de plantas, bem como próximo a esse local pela alta resistência de seus endosporos que são disseminados com a poeira.

Bacillus licheniformis tem sido utilizado nas fermentações industriais por várias décadas para produção de enzimas comerciais, antibióticos e produtos químicos diversos, como ácido acético e substituto de L-triptofano (GHERNA et al., 1989).

Segundo Schallmeyer et al. (2004), *Bacillus licheniformis* vem sendo amplamente empregado na obtenção de proteases, as quais são utilizadas industrialmente na produção de detergentes. Por outro lado, amilases, enzimas responsáveis pela hidrólise do amido em dextrina e oligossacarídeos solúveis, são empregadas na indústria alimentícia, têxtil, farmacêutica e de adesivos (KENNEDY, 1987).

Extrato enzimático obtido pela ação fermentativa de *Bacillus licheniformis* pode ser utilizado na hidrólise de parede celular de leveduras, como *Saccharomyces cerevisiae*, a qual é um subproduto proveniente do processo cervejeiro e de usinas de álcool. O hidrolisado da parede de levedura é rico em polissacarídeos complexos, principalmente β -glucanas e mananas, os quais apresentam efeito prebiótico (MAIORKA et al., 2001). Adicionalmente, estes autores relataram que o hidrolisado pode também ser utilizado como nutriente por espécies de *Bacillus*.

Flemming e Freitas (2005) conduziram um experimento com 2400 aves com o objetivo de avaliar o efeito da adição de probióticos (*Bacillus licheniformis* e *Bacillus subtilis*), probiótico acrescido de mananoligossacarídeos (MOS), promotor de crescimento

(avilamicina) e uma dieta controle sem aditivos na alimentação dessas aves. Os resultados mostraram que a adição do probiótico acrescido de MOS acarretou aumento significativo no ganho de peso durante a fase inicial do tratamento. Segundo estes autores, os melhores resultados em termos de ganho de peso e conversão alimentar evidenciado pela adição do probiótico comparativamente ao grupo de aves alimentadas com antibiótico e ao grupo controle se devem a um melhor equilíbrio entre os microrganismos (*Bacillus licheniformis* e *Bacillus subtilis*).

2.3) Produção Microbiana de Enzimas, Principais Características e Aplicações

2.3.1 Proteases

Proteases, também conhecidas como peptidases ou proteinases, pertencem a uma classe de enzimas que apresentam a capacidade de hidrolisar ligações peptídicas em proteínas e/ou fragmentos de proteínas. Desta maneira, causam alterações irreversíveis ou destruição dos substratos sobre os quais atuam, que do ponto de vista biológico podem ser importantes, principalmente nos processos fisiológicos, patológicos e tecnológicos (BARRET; RAWLINGS; O' BRIEN, 2001). As proteases modificam os substratos com grande seletividade e especificidade, como exemplificado em reações de ativação de formas zimogênicas em enzimas líticas e no processamento e transporte de enzimas extracelulares (RAO et al., 1998).

O número de proteases atualmente descrito é muito grande, compreendendo cerca de 10% de todas as enzimas incluídas na lista (EC) do Comitê de Nomenclatura da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (BARRET; RAWLINGS; O' BRIEN, 2001).

As proteases não são facilmente inseridas nos sistemas gerais de nomenclatura de enzimas em função de sua grande diversidade de atividade e estrutura. Atualmente, são classificadas segundo três critérios principais, a saber: 1- quanto ao tipo de reação catalisada, exopeptidases e endopeptidases, as quais clivam, respectivamente, ligações peptídicas próximas e distantes do grupo amino ou carboxi terminal do substrato; 2- quanto à natureza química do sítio catalítico, as quais, de acordo com a composição do sítio ativo, dividem-se em serina, aspartil, cisteína e metalopeptidases e, 3- quanto às relações evolutivas, onde são classificadas em famílias e subdivididas em classes, de acordo com a

convergência ou divergência de um ancestral comum. Baseando-se nesses critérios, as famílias de peptidases são denominadas com as letras S, C, A, M e U para os tipos serina, cisteína, aspartil, metalo e não conhecidas, quanto ao tipo de catálise realizada (BARRET; RAWLINGS; O' BRIEN, 2001, RAO et al., 1998).

Joo et al. (2004) reportaram que a grande maioria das proteases disponíveis no mercado atualmente é derivada de bactérias do gênero *Bacillus*, no entanto, essas podem ser produzidas por uma grande variedade de outros microrganismos, incluindo fungos e leveduras, além de tecidos animais.

A impossibilidade das proteases de plantas e animais atenderem à demanda mundial de enzimas tem levado a um interesse cada vez maior pelas proteases de origem microbiana. Os microrganismos representam uma excelente fonte de proteases devido a sua grande diversidade bioquímica e facilidade de manipulação genética. Proteínas são degradadas por microrganismos, que utilizam os produtos de degradação como nutrientes para o seu crescimento. A degradação é iniciada por proteinases (endopeptidases) secretadas pelos microrganismos, seguida de hidrólise posterior por peptidases (exopeptidases) em um sítio extra ou intracelular. Numerosas proteinases são produzidas por microrganismos distintos, dependendo da espécie, ou mesmo por diferentes cepas de uma mesma espécie. Proteinases diferentes também podem ser produzidas pela mesma cepa, variando as condições de cultura (UFRJ, s.d).

Quanto às aplicações industriais, as proteases perfazem mais de 65% do total do mercado mundial de enzimas e acredita-se que num futuro próximo haverá demanda em torno de 1,5 a 2,5 bilhões de dólares (TARI; GHENCKAL; TOKATLI, 2006). Podem ser empregadas na indústria da lavanderia, na formulação de detergentes (ANWAR; SALEEMUDDIN, 2000); no processamento de couro, para remoção de restos de pêlo ou facilitar a embebição com água (SHIMIZU et al., 2005, apud CHAUD; VAZ; FELIPE, 2007); na indústria farmacêutica, para correção de síndromes de deficiência de enzimas líticas e em combinação com antibióticos, para tratamento de queimaduras e feridas (RAO et al., 1998); na produção de alimentos, principalmente na indústria de laticínios na produção de queijo (OHMIYA et al., 1979) e tenderização de carne (JOHNVESLY; NAIK, 2001); no tratamento de efluentes (SEIXAS et al., 2006); na recuperação de prata de filmes fotográficos (REDDY et al., 2008) e em pesquisas que visam elucidar o relacionamento entre a estrutura, função e síntese de peptídeos e sequenciamento de proteínas (RAO et al., 1998).

2.3.1.1 Parâmetros que Interferem na Produção Microbiana de Proteases

Proteases são geralmente sintetizadas durante a fase estacionária de crescimento do microrganismo e sua produção está regulada pela limitação de nutrientes no meio de cultivo, principalmente carbono e nitrogênio (GUPTA et al., 2002). Segundo Strauch e Hoch (1993), a síntese de proteases por diferentes espécies de *Bacillus* é constitutiva ou parcialmente constitutiva, sendo controlada por inúmeros mecanismos complexos inerentes ao estágio de transição entre a fase exponencial de crescimento e a fase estacionária.

Segundo Gupta et al. (2002), a síntese de proteases por algumas espécies de *Bacillus*, tais como, *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis*, é frequentemente dependente do estágio de esporulação destas bactérias. Contudo, a produção máxima de protease durante a fase estacionária está também relacionada com a produção de biomassa durante a fase exponencial de crescimento. Portanto, é necessária a manipulação do meio de cultivo com o intuito de maximizar o crescimento e melhorar a produção de protease. Essa manipulação envolve um grande número de parâmetros fisiológicos com ênfase para: relação carbono/nitrogênio, natureza e a concentração dos substratos utilizados, incluindo estudos relativos ao sistema de controle de repressão e indução na produção de enzimas, pH, temperatura, período de incubação e efeito de cátions divalentes. Adicionalmente, Potumarthi, Subhakar e Jetty (2007) e Puri, Beg e Gupta (2002) constataram que agitação, aeração e concentração de inóculo também são parâmetros fundamentais na regulação de um processo fermentativo que visa avaliar crescimento microbiano e produção de enzimas.

A) Composição do Meio de Cultivo

A relação carbono/nitrogênio no meio de fermentação regula a produção de proteases e a variação desta razão pode ser alterada, sendo que seu aumento pode ser feito utilizando a alimentação contínua, a qual permite prolongar a fase estacionária da cultura. Segundo Gupta et al. (2002), este artifício, bem como as estratégias de purificação, dependem das propriedades da protease em questão.

Em estudo conduzido com *Bacillus licheniformis* RG1, Ramnani, Kumar e Gupta (2005) avaliaram o efeito da suplementação de 36 diferentes combinações de carbono/nitrogênio no meio de cultivo para a produção de protease alcalina. Os resultados mostraram que, dentre as combinações testadas, amido de milho/farinha de soja e amido de

batata/farelo de soja propiciaram os maiores valores de atividade enzimática (1350 e 1190 U/mL, respectivamente), ao passo que lactose/água de maceração de milho resultou em aproximadamente 450 U/mL.

A.1 - Fonte de Carbono

No que se refere à natureza dos substratos, Ferrero et al. (1996), trabalhando com *Bacillus* sp., constataram que caseína foi a melhor fonte de carbono para a produção de protease termoestável por esta bactéria. Segundo estes pesquisadores, a protease alcalina não é uma enzima constitutiva, visto que diferentes fontes de carbono e nitrogênio podem alterar sua produção.

Segundo Adachi et al. (1991), caseína também pode ser utilizada como suplemento nas fermentações conduzidas com *Bacillus licheniformis*, tendo em vista seu alto valor nutricional e alta susceptibilidade à ação catalítica de todas as proteases conhecidas.

Com o objetivo de verificar a influência de várias fontes de carbono sobre a produção de protease por uma cepa de *Bacillus licheniformis* isolada do solo na Arábia Saudita, Al-Shehri, Mostafa e Yasser (2004) evidenciaram aumento na produção dessa enzima quando o meio de fermentação foi formulado à base de farelo de soja quando comparado à caseína.

Estudando a produção de protease alcalina termoestável por *Bacillus* sp. K30, Naidu e Devi (2005) constataram que farelo de trigo, farelo de arroz e caseína foram as fontes de carbono que permitiram a obtenção dos maiores valores de atividade enzimática, a saber: 81,1, 42,1 e 40,0 U/mL, respectivamente. Estes resultados sugerem que fontes naturais de baixo custo podem ser utilizadas como suplemento para produção de protease por bactérias do gênero *Bacillus* (YENG et al., 2000).

Em estudo conduzido por Hadj-Ali et al. (2007), foi avaliado o efeito da adição de diferentes fontes de carbono, na concentração de 10g/L, sobre o crescimento e produção de protease por *Bacillus licheniformis* NH1. Os resultados mostraram que dentre as fontes de carbono testadas, a saber: caseína, maltose, glicose, amido, sacarose e lactose, a primeira foi àquela que possibilitou a maior obtenção de biomassa e a mais alta atividade de protease (1600 U/mL) após 24 h de fermentação a 37°C. Adicionalmente, estes pesquisadores evidenciaram a não produção de protease quando se utilizou maltose, glicose e sacarose como fonte de carbono.

Mabrouk et al. (1999), trabalhando com *Bacillus licheniformis* ATCC 21415 para produção de protease, constataram atividade de 4503 e 4285 U/mL quando utilizaram lactose e frutose como fontes de carbono, respectivamente. Por outro lado, a suplementação do meio de cultivo com sacarose e maltose reduziu de 3 e 50 vezes, respectivamente, a atividade enzimática.

Em trabalho desenvolvido por Oskouie et al. (2008), foi constatada alta atividade de protease (1600 U/mL) produzida por *Bacillus clausii* em meio constituído de 11 g/L de sacarose como fonte de carbono após 40 h de cultivo.

Analizando a influência das condições de cultura de *Bacillus* sp. SMIA-2 sobre a produção de protease extracelular, Silva, Delatorre e Martins (2007) concluíram que quando o meio de cultivo foi constituído de amido e maltose suplementada com soro de leite houve aumento da secreção de protease. Adicionalmente, foi constatado que o aumento da concentração de maltose no meio de cultura até ao nível de 1% resultou em melhoria do crescimento bacteriano e da produção de protease. Segundo estes autores, lactose e sacarose não foram efetivas na produção dessa enzima.

A máxima produção de protease por *Bacillus* sp. RKY3, cultivado em meio contendo 10 g/L de amido de milho como fonte de carbono, foi de 939 U/mL, 2,3 vezes maior do que àquela obtida em meio basal (REDDY et al., 2008).

Em fermentação conduzida em reator tipo tanque agitado, foram estudadas várias concentrações de caseína, a saber: 20, 30, 40 e 50 g/L no meio de cultivo para a produção de protease por *Bacillus licheniformis* NCIM-2042. Os resultados mostraram redução da atividade enzimática quando foram utilizadas concentrações crescentes de caseína. Segundo Potumarthi, Subhakar e Jetty (2007), o aumento da concentração inicial de caseína ocasionou aumento da viscosidade do meio de fermentação, provocando redução do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio e, conseqüentemente, redução da produção de protease ao longo do processo fermentativo.

Em estudo conduzido por Hadj-Ali et al. (2007), foi avaliado o efeito de diferentes concentrações de caseína, a saber: 0, 5, 7, 10, 15 e 20 g/L sobre o crescimento e produção de protease por *Bacillus licheniformis* NH1. Os resultados mostraram que caseína na concentração de 5g/L permitiu a obtenção de 2807 U/mL de atividade proteolítica, e que na ausência deste substrato, a atividade foi reduzida de aproximadamente 4 vezes. Por outro lado, o maior crescimento bacteriano foi verificado na presença de 20 g/L de caseína. Estes resultados sugerem que nem sempre a condição de crescimento celular ótima

coincide com a condição ideal para a síntese de enzimas por parte do microrganismo em questão.

Segundo relatos da literatura, o excesso de glicose ou outra fonte de carbono facilmente fermentescível reprime a produção de determinados tipos de proteases por diferentes espécies de microrganismos, principalmente àqueles pertencentes ao gênero *Bacillus* (KOLE; DRAPER; GERSON, 1988, PATEL; DODIA; SINGH, 2005). Alguns destes pesquisadores relataram que o aumento da concentração de glicose de 0,5 para 2% resultou em redução da produção de protease por *Bacillus pseudofirmus* de 140 para 4 U/mL. Resultados similares também foram obtidos por Frankena et al. (1986), Frankena, Verseveld e Stouthamer (1985), Hanlon, Hodges e Russel (1982), os quais trabalharam com diferentes cepas de *Bacillus licheniformis* para a produção de protease.

Patel, Dodia e Singh (2005) constataram que a produção de protease por *Bacillus* sp. depende da disponibilidade de carbono e nitrogênio iniciais no meio de cultura, evidenciando máximo efeito no crescimento celular com a combinação de peptona e extrato de levedura, enquanto a atividade ótima da enzima foi obtida na presença de casa aminoácidos, peptona e extrato de levedura. Ainda neste estudo, os pesquisadores reportaram que altas concentrações de glicose também podem inibir o crescimento microbiano e a produção de protease.

A.2 - Fonte de Nitrogênio

Com relação à fonte de nitrogênio, estudos realizados por Al-Shehri, Mostafa e Yasser (2004), revelaram que a produção de protease em meios contendo nitrogênio orgânico foi maior do que em meios suplementados com nitrogênio inorgânico. Resultados similares foram obtidos por Hady-Ali et al. (2007), os quais testaram extrato de levedura, peptona, sulfato de amônio e uréia como fonte de nitrogênio para produção de protease por *Bacillus licheniformis* NH1. Os autores constataram atividade enzimática de 1665 U/mL quando utilizaram extrato de levedura e, 342 e 483 U/mL quando o meio de cultivo foi suplementado com sulfato de amônio e uréia, respectivamente. Adicionalmente, foi evidenciado aumento da biomassa bacteriana na presença de extrato de levedura quando comparado com outras fontes de nitrogênio.

Segundo Patel, Dodia e Singh (2005), a presença de nitrogênio orgânico, caseína e casa aminoácidos induz a produção de proteases extracelulares, no entanto, pode haver a

ocorrência de fenômenos de repressão do crescimento e produção enzimática quando a fonte de nitrogênio utilizada é inorgânica.

Segundo Hadj-Ali et al. (2007), concentrações de 2 a 4 g/L de extrato de levedura são eficientes no aumento da síntese de protease por *Bacillus licheniformis* NH1 e na produção de biomassa comparativamente ao meio de cultivo na ausência dessa fonte de nitrogênio.

Trabalhando com *Bacillus* sp. termofílico, Nascimento e Martins (2004) constataram que esta bactéria cresceu melhor em meio rico em extrato de carne, porém, a atividade enzimática máxima foi obtida na presença de nitrato de amônio como fonte de nitrogênio. Resultados similares foram obtidos por Banerjee et al. (1999), em estudo conduzido com *Bacillus brevis*.

Contrariando estes resultados, Naidu e Devi (2005) obtiveram maior atividade de protease quando foram utilizados extrato de carne, extrato de levedura e peptona como fonte de nitrogênio para *Bacillus* sp. K30. Segundo Aleksieva et al. (1981) e Phadataré, Deshpande e Srinivasan (1993), fontes de nitrogênio orgânico são melhores para o crescimento e produção de enzimas por alguns microrganismos, embora outros microrganismos apresentem maior produção enzimática quando em meio de cultivo rico em nitrogênio inorgânico (SINHA; SATYANARAYANA, 1991).

A.3 - Fonte de Minerais

No que se refere à fonte de sais minerais, Mabrouk et al. (1999) constataram que a suplementação do meio de cultivo com cloreto de zinco reduziu a atividade de protease produzida por *Bacillus licheniformis* ATCC 21415. Por outro lado, a adição de cloreto de cálcio (0,07%) aumentou em 27% a atividade enzimática quando comparado ao grupo controle. Segundo Manachini et al. (1988), apud Mabrouk et al. (1999), esse aumento se deve ao efeito estabilizante exercido pelo íon Ca^{+2} sobre a protease alcalina.

Patel, Dodia e Singh (2005) avaliaram o efeito da adição de diferentes concentrações de cloreto de sódio sobre o crescimento e produção de protease alcalina por *Bacillus* sp. haloalcalófilo. Os resultados mostraram que esse sal nas concentrações de 10, 15 e 20% resultaram em 186, 172 e 158 U/mL de atividade enzimática. Por outro lado, a atividade de protease foi significativamente reduzida na presença de 5% de cloreto de sódio e totalmente suprimida na ausência do mesmo. Segundo os autores, a presença de cloreto

de sódio no meio de cultivo é essencial para a produção de protease pelo microrganismo em questão. Com relação ao crescimento microbiano, este se apresentou similar à produção de protease, no entanto, não foi completamente suprimido na ausência desse sal.

Manachini e Fortina (1998) isolaram uma variedade de *Bacillus licheniformis* halotolerante de sedimentos marinhos com capacidade para produzir protease com alta atividade durante a fase estacionária de crescimento. Estes autores utilizaram água do mar no meio de fermentação e verificaram aumento da atividade enzimática em 150%, mostrando particularidades em variedades específicas da bactéria.

Hadj-Ali et al. (2007), avaliando o efeito da adição de diferentes sais ao meio de fermentação, constataram que cloreto de potássio foi o único a promover melhoria da síntese de protease por *Bacillus licheniformis* NH1. Após serem testadas diferentes concentrações desse sal, os autores evidenciaram que 1,5 a 2,5 g/L de cloreto de potássio propiciou aumento de aproximadamente 1,3 vezes no valor da atividade enzimática. No tocante ao crescimento microbiano, esse não foi afetado pela presença do sal no meio de cultivo, uma vez que a produção de biomassa foi praticamente à mesma daquela obtida na ausência de cloreto de potássio.

B) Temperatura

De acordo com Banerjee et al. (1999), Çalik et al. (2002), Joo et al. (2003), Mabrouk et al. (1999), Potumarthi, Subhakar e Jetty (2007), Puri, Khalil e Gupta (2002), a maioria das espécies do gênero *Bacillus*, incluindo cepas de *Bacillus licheniformis*, apresenta crescimento e produção de enzimas quando cultivadas em temperaturas que variam entre 30 e 37°C. No entanto, segundo Naidu e Devi (2005), este parâmetro pode variar em função de particularidades apresentadas pela cepa em estudo, como no caso de uma cepa de *Bacillus* sp. isolada de solo coletado de uma indústria de detergentes e caracterizada como produtora de uma protease alcalina termoestável a 50°C. Adicionalmente, Doddapaneni et al. (2008) conduziram fermentações com uma cepa de *Bacillus cereus* isolada de terreno de abatedouro de animais para a produção de protease na temperatura de 20°C.

Com relação à espécie *Bacillus licheniformis*, Hameed et al. (1996) constataram que 36°C é a temperatura ótima para crescimento e produção de proteases, sendo que este

parâmetro pode sofrer variações em função de particularidades apresentadas por algumas cepas dessa espécie.

Genckal e Tari (2006) avaliaram o efeito de diferentes temperaturas, a saber: 30, 37, 45 e 55°C sobre o crescimento e produção de protease por três cepas de *Bacillus* sp. isolados de solo na Turquia durante 96 h de cultivo. Os resultados mostraram que as respectivas espécies cresceram bem nas temperaturas de 30, 37 e 45°C, no entanto, nenhum crescimento foi observado a 55°C. No tocante à produção enzimática, esta se manteve praticamente inalterada quando os ensaios foram realizados a 30, 37 e 45°C com *Bacillus* sp. I18 (aproximadamente 130 U/mL), enquanto que *Bacillus* sp. L18 e L21 produziram 221 e 216 U/mL de atividade proteolítica quando a temperatura de incubação foi de 37°C. Adicionalmente, nenhuma atividade de protease foi evidenciada a 55°C, sugerindo que essa tenha sofrido desnaturação e/ou degradação pelo efeito do calor.

Al-Shehri, Mostafa e Yasser (2004), em estudo conduzido com *Bacillus licheniformis*, evidenciaram uma relação positiva entre produção de protease e incubação a temperaturas superiores a 50°C, e constataram que a temperatura ótima de atividade proteolítica foi de 55°C e a enzima se manteve estável entre 60 e 65°C durante 1 h de incubação.

Em pesquisas realizadas com *Bacillus licheniformis* MIR 29, Ferrero et al. (1996) obtiveram melhores resultados em termos de atividade de protease a 60°C. Resultado similar foi obtido por Doddapaneni et al. (2008) trabalhando com *Bacillus cereus*. Nesta pesquisa também foi constatado que a enzima se manteve estável entre 40 e 70°C e reteve mais de 85% e 92% da atividade original quando incubada por 1 h nas respectivas temperaturas. Adicionalmente, a protease produzida por *Bacillus licheniformis* RG1 se manteve estável entre 40 e 80°C e reteve 80% da atividade original depois de incubada por 1 h a 70°C (RAMNANI; KUMAR; GUPTA, 2005).

Patel e Singh (2005), estudando a produção de protease por *Bacillus* sp., afirmaram que a temperatura de 37°C é ideal para o crescimento microbiano e produção de protease. Este resultado corrobora com àquele obtido por Patel, Dodia e Singh (2005), os quais obtiveram produção máxima dessa enzima (410 U/mL) durante o início da fase estacionária, quando *Bacillus* sp. haloalcalófilo foi incubado nessa mesma temperatura.

Visando a determinação da temperatura ótima de produção de protease por *Bacillus licheniformis* ATCC 21415, Mabrouk et al. (1999) conduziram fermentações a 37, 45 e 55°C. Os resultados se mostraram satisfatórios quando a respectiva cepa foi crescida à

37°C, sendo obtido 3000 U/mL de atividade após 120 h de cultivo. Por outro lado, quando o ensaio foi conduzido à 45°C houve perda de mais de 40% da atividade em relação à temperatura anterior, sendo que à 55°C a atividade proteolítica não excedeu 110 U/mL.

Potumarthi, Subhakar e Jetty (2007), estudaram o efeito de diferentes temperaturas (25-45°C) e constataram ser de 35 ± 2°C a temperatura ótima para produção de protease por *Bacillus licheniformis* NCMI-2042.

Em outro estudo, Silva, Delatorre e Martins (2007) evidenciaram crescimento e atividade de protease máxima quando *Bacillus* sp. foi cultivado a 50°C durante 16 h. Na temperatura de 55°C, a atividade proteolítica foi aproximadamente 3 vezes menor, enquanto que nas temperaturas de 42 e 45°C, essa redução foi de apenas 1,6 e 1,5 vezes menor.

Em estudo conduzido por Bhaskar et al. (2007), reportou-se que a temperatura ótima para crescimento e produção de protease por *Bacillus proteolyticus* CFR 3001 isolado de água residual de processamento de peixe era de 37°C. Em outro estudo, Pérez et al. (2007), trabalhando com *Bacillus licheniformis* E-44 isolado a partir de cama de frango, reportou ser de 40°C a temperatura ideal para crescimento e produção de protease.

Em fermentação conduzida à 50°C, Nascimento e Martins (2007) evidenciaram que a temperatura ótima de atuação de protease produzida por *Bacillus* sp. SMIA-2 foi de 60°C. Adicionalmente, a enzima se manteve estável por 2 h à 30°C, enquanto que a 40 e 80°C, 14 e 94% da atividade original foram perdidas, respectivamente.

Bacillus licheniformis RP1 isolado de água poluída na Tunísia foi caracterizada como uma cepa promissora para a produção de protease extracelular. O cultivo foi conduzido a 37°C e a atividade ótima da enzima esteve em torno de 65-70°C, sendo que acima dessa temperatura, a atividade foi reduzida abruptamente. Com relação à estabilidade, essa se manteve bem entre 50 e 55°C, perdendo apenas 12,7 e 18,6% da atividade original nas respectivas temperaturas de incubação (SELLAMI-KAMOUN et al., 2008). Resultados similares foram obtidos em fermentação conduzida com *Bacillus licheniformis* NH1 à 37°C para produção de protease. Os ensaios enzimáticos mostraram atividade ótima da enzima em torno de 65-70°C, sendo que acima desse valor a atividade foi reduzida significativamente (HADJ-ALI et al., 2007).

Manachini e Fortina (1998), estudando o comportamento de *Bacillus licheniformis* halotolerante isolado de sedimentos marinhos, constataram que a protease sintetizada por esta espécie apresentou atividade ótima a 70°C. Ainda com relação à temperatura, Silva,

Delatorre e Martins (2007), estudando a produção de protease por *Bacillus* sp., evidenciaram que a atividade ótima dessa enzima ocorreu a 70°C e a maior estabilidade da mesma foi observada a 60°C, sendo que a enzima manteve 80% de sua atividade original após 2 h de incubação nessa temperatura. Adicionalmente, a atividade de protease foi mantida apenas por 15 minutos a 70°C.

C) pH

Assim como a temperatura, a variação do pH também exerce grande influência no crescimento microbiano, produção e atividade enzimática. Segundo Zeikus (1979), apud Naidu e Devi (2005), a maioria das espécies de *Bacillus* cresce bem numa faixa de pH entre 6,0 e 9,0, sendo que a produção de protease é otimizada se a fermentação for conduzida em pH variando entre 9,0 e 13,0. Estes mesmos pesquisadores, trabalhando com *Bacillus* sp. K-30, conduziram fermentações em diferentes valores de pH (5,0, 7,0, 9,0, 11,0 e 12,0) e constataram que a máxima produção de protease aconteceu em pH 9,0.

Resultados similares foram obtidos por Patel, Dodia e Singh (2005), estudando o crescimento e produção de protease por *Bacillus* sp. Os ensaios foram realizados em diferentes valores de pH, a saber: 7,0, 8,0, 9,0 e 10,0, sendo que a bactéria cresceu bem em pH 7,0, 8,0 e 9,0, e atingiu um máximo de crescimento em pH 8,0. Em pH 8,0 e 9,0 o crescimento foi equiparável, porém, este se reduziu bastante em pH 7,0. Com relação à produção de protease, essa aumentou com o aumento do pH do meio de fermentação, sendo 9,0 o pH ótimo, no qual foi obtido 185 U/mL de atividade proteolítica.

Em estudo com *Bacillus* sp. SMIA-2, Silva, Delatorre e Martins (2007) constataram maior crescimento bacteriano em fermentação conduzida em pH 9,5. Por outro lado, a maior produção de protease se deu em valores de pH situados entre 7,5 e 8,5, sendo máxima em pH 8,5.

Fermentações conduzidas por 96 h em diferentes valores de pH mostraram que *Bacillus* sp. L18 e L21 apresentaram um ótimo de crescimento em pH 9,0 e 10,0, respectivamente, e um ótimo de produção de protease em pH 10,0, para as duas cepas. No entanto, o pH ótimo de atividade proteolítica se deu em pH 11,0, sugerindo que nem sempre o pH ótimo para crescimento coincide com o ótimo de atividade (GENCKAL; TARI, 2006).

Pesquisas conduzidas com *Bacillus proteolyticus* CFR 3001 evidenciaram máximo crescimento bacteriano e produção de protease em pH 9,0 durante a fase estacionária. A produção de biomassa se manteve constante até pH 12,0 e a síntese enzimática foi reduzida abruptamente em valores de pH superiores a 9,0 (BHASKAR et al., 2007).

Ferrero et al. (1996), estudando a produção de protease alcalina por *Bacillus licheniformis* MIR 29, reportaram maior crescimento e produção enzimática em pH acima de 9,0, o que também foi observado por Manachini e Fortina (1998) com *Bacillus licheniformis* halotolerante isolado de sedimentos marinhos.

Em estudos conduzidos por Al-Shehri, Mostafa e Yasser (2004), os quais analisaram propriedades de proteases produzidas por *Bacillus licheniformis* isolado na Arábia Saudita, foi evidenciado que a produção dessas enzimas foi particularmente sensível ao pH ácido, sendo máxima em condições de pH inicial alcalino, mais especificamente em pH 8,0, quando se obteve 255 U/mL de atividade proteolítica. Adicionalmente, foi verificada redução gradual da produção enzimática em 81,6% do valor máximo quando a fermentação foi realizada em pH inicial 11,0. No que se refere à caracterização da protease obtida, essa apresentou atividade máxima quando incubada em pH 9,0 e perdeu 55% da atividade original em pH 6,0 e mais de 71% quando incubada em pH 12,0.

Sayem, Alam e Hoq (2006), analisando o efeito de diferentes valores de pH na fermentação de *Bacillus licheniformis* MZK-03, constataram que o pH ótimo para produção de protease se deu em pH 8,5, porém, em estudo conduzido com outra cepa de *Bacillus licheniformis*, o pH ideal foi 8,0. Em trabalho conduzido por Pérez et al. (2007), *Bacillus licheniformis* E-44 foi capaz de produzir protease com capacidade de lisar parede celular de *Saccharomyces cerevisiae* em condições de pH ligeiramente alcalino (7,4).

Patel e Singh (2005) observaram crescimento de *Bacillus* sp. em pH situado entre 7,0 e 9,0, sendo ótimo em pH 8,0. Esse crescimento foi equiparável em pH 8,0 e 9,0, no entanto, foi reduzida significativamente em pH 7,0. Com relação à produção de protease, essa aumentou de maneira gradual com o aumento do pH e atingiu o valor máximo em pH 9,0.

A influência das condições de pH sobre a regulação metabólica na produção de protease serina alcalina por *Bacillus licheniformis* foi avaliada em estudo conduzido por Çalik et al. (2002). Estes pesquisadores investigaram uma faixa de pH entre 7,0 e 7,5, e reportaram uma dependência significativa do pH para o consumo de glicose, o qual foi

ótimo em pH 7,5 durante a primeira fase de crescimento (0-20 h). Por outro lado, o decréscimo do pH para 7,25 favoreceu a produção de protease na fase estacionária, enquanto que em pH 7,0 foi constatada uma produção ótima de biomassa nessa mesma fase. Segundo Çalik et al. (2002), o pH inicial ótimo para a produção de protease deveria estar entre 7,0 e 7,25, uma vez que o aumento da concentração de biomassa bacteriana gera aumento da produção dessa enzima na fase estacionária.

Hadj-Ali et al. (2007) reportaram, em estudo conduzido com *Bacillus licheniformis* NH1, que o pH ótimo de atividade de protease se situava entre 10,0 e 11,0, sendo que acima desse valor de pH a atividade foi reduzida abruptamente. Nesse mesmo estudo, foi constatado que a enzima se manteve ativa e estável em valores de pH entre 7,0 e 12,0 quando incubada por 1 e 24 h a 23°C na presença de caseína como substrato.

Resultados similares foram obtidos por Ramnani, Kumar e Gupta (2005) e Sellami-Kamoun et al. (2008), em trabalhos conduzidos com proteases produzidas por duas cepas de *Bacillus licheniformis*, as quais também apresentaram pH ótimo entre 10,0 e 11,0. Adicionalmente, nesse último estudo a enzima manteve 100% de sua atividade original entre pH 8,0 e 10,0 e, 96 e 72% em pH 11,0 e 12,0, respectivamente.

Trabalhando com protease produzida por *Bacillus circulans*, Jaswal e Kocher (2007) reportaram que o pH ótimo para atividade dessa enzima foi 9,0. Segundo Kazan et al. (2005), grande parte das proteases alcalinas sintetizadas por bactérias do gênero *Bacillus* apresenta pH ótimo situado entre 8,0 e 11,0.

Protease produzida por *Bacillus cereus* foi caracterizada por Doddapaneni et al. (2008), sendo o pH ótimo de atividade igual a 10,0. Por outro lado, protease obtida por fermentação em estado sólido apresentou pH ótimo entre 8,0 e 9,0, permanecendo ativa entre 5,0 e 12,0 (MUKHERJEE; ADHIKARI; RAI, 2008).

Resultados obtidos por Patel et al. (2006) trabalhando com *Bacillus* sp., revelaram que a protease sintetizada por esta bactéria se manteve estável por mais de 30 minutos em pH 9,0 e 10,0, enquanto que em pH 7,0 a enzima reteve aproximadamente 60% da atividade original durante o mesmo período de incubação. Diferentemente, protease produzida por *Bacillus subtilis* NCIM 2713 apresentou estabilidade quando incubada por 3 h a 37°C em valores de pH entre 6,5 e 9,0 (MANE; BAPAT, 2001).

Nascimento e Martins (2004) reportaram que protease produzida por *Bacillus* sp. SMIA-2 apresentou pH ótimo de atividade em torno de 8,0. Após incubação da enzima por 24 h em pH 5,5, 8,0 e 9,0, foi observado um decréscimo de 51, 18 e 66% de sua atividade

original, respectivamente. Segundo Sookkheo *et al.* (2000), três proteases produzidas por *Bacillus stearothermophilus* TLS33 apresentaram pH ótimo de atividade em 8,5, 7,5 e 7,0.

D) Agitação e Aeração

Durante a fermentação, a velocidade de aeração indiretamente indica o nível de oxigênio dissolvido no meio de cultivo. Diferentes níveis de oxigênio dissolvido podem ser obtidos, a saber: pela variação da velocidade de aeração, variação da velocidade de agitação do impelidor e pelo uso de mistura gasosa contendo oxigênio e nitrogênio numa concentração adequada. A variação da velocidade de agitação também influencia a extensão da mistura e a disponibilidade de nutrientes no meio de cultivo, seja a fermentação realizada em reator ou em frascos agitados (KUMAR; TAKAGI, 1999).

Segundo trabalhos citados na literatura pertinente, a maioria das espécies de *Bacillus* requer velocidades de agitação entre 180 e 220 rpm para uma produção ideal de proteases extracelulares (BANERJEE *et al.*, 1999, GUPTA; BEG; LORENZ, 2002, JOO *et al.*, 2002, LIU; TZENG, 1998). No tocante à aeração, indiretamente medida pela relação volume de meio/volume de frasco, a maioria das fermentações realizadas em frascos agitados que visam a produção de proteases por espécies de *Bacillus* são conduzidas na relação de 1:5 e 1:10 (HADJ-ALI *et al.*, 2007, MABROUK *et al.*, 1999, NASCIMENTO; MARTINS, 2004, SOUISSI *et al.*, 2008).

Em trabalhos realizados por Potumarthi, Subhakar e Jetty (2007) visando à otimização da produção de protease por *Bacillus licheniformis* NCIM-2042 foram testadas diferentes combinações para velocidade de agitação e aeração, a saber: 200, 300 e 400 rpm e 1, 2 e 3 vvm. As fermentações foram conduzidas em batelada em fermentador tipo tanque agitado (modelo “B-Braun Biostat”), com volume útil de 1,0 litro, e os resultados evidenciaram que a maior produção enzimática aconteceu após 72 h de cultivo quando foi utilizado velocidade de agitação de 200 rpm e aeração de 3 vvm.

Mabrouk *et al.* (1999), estudando a produção de protease por *Bacillus licheniformis* ATCC 21415, constataram que a elevação da velocidade de agitação de 250 para 400 rpm teve forte influência sobre a produção enzimática, culminando com o aumento da atividade proteolítica de 20380 para 29550 U/mL. Segundo Bae e Lee (1988), apud Mabrouk *et al.* (1999), a maior produção de proteases por bactérias alcalofílicas foi obtida utilizando-se velocidade de agitação de 450 rpm.

Em outras pesquisas conduzidas com cepas específicas de *Bacillus licheniformis*, Hadj-Ali et al. (2007), Pérez et al. (2007), Sellami-Kamoun et al. (2008) e Souissi et al. (2008) verificaram ótima produção de protease utilizando velocidade de agitação de 200 rpm. Por outro lado, Al-Shehri, Mostafa e Yasser (2004) evidenciaram boa produção de protease em fermentação conduzida com velocidade de agitação de 100 rpm.

Fujiwara e Yamamoto (1987), apud Kumar e Takagi (1999), reportaram aumento da produção de protease quando *Bacillus* sp. B21-2 foi crescido sob velocidade de agitação de 600 rpm e aeração de 0,5 vvm.

Em estudos conduzidos com o objetivo de verificar o efeito de diferentes velocidades de agitação (100, 180, 250 e 325 rpm) sobre o crescimento e produção de protease por duas cepas de *Bacillus* sp., Genckal e Tari (2006) constataram aumento da produção de biomassa quando se utilizou 325 rpm de agitação. Estes resultados puderam ser justificados em função da maior taxa de transferência de oxigênio e nutrientes para essa velocidade de agitação, já que os cultivos foram realizados na mesma relação volume de meio/volume de frasco. No que se refere à síntese de protease, a velocidade de agitação ideal foi de 180 rpm para ambas as cepas de *Bacillus* estudadas, sendo produzidas, aproximadamente, em média, 219 U/mL de atividade proteolítica após 96 h de incubação. Ficou evidente neste trabalho que as cepas de *Bacillus* estudadas não requerem altas velocidades de agitação para a produção de proteases, provavelmente em função da pequena necessidade de oxigênio para tanto.

Resultados similares foram obtidos por Bhaskar et al. (2007) e Patel, Dodia e Singh (2005), os quais trabalhando com *Bacillus proteolyticus* CFR 3001 e *Bacillus pseudofirmus*, respectivamente, obtiveram máxima produção de protease quando conduziram a fermentação em frascos Erlenmeyer contendo 100 mL de meio sob velocidade de agitação de 100 rpm.

Em estudos conduzidos com *Bacillus cereus*, *Bacillus* sp. termofílico e *Bacillus* sp. SMIA-2 foram obtidos bons resultados em termos de produção de protease a 150 rpm de agitação quando estas cepas foram cultivadas em frascos Erlenmeyer (DODDAPANENI et al., 2008, NASCIMENTO; MARTINS, 2004, PATEL; DODIA; SINGH, 2005, SILVA; DELATORRE; MARTINS, 2007).

E) Tempo de Incubação

O tempo de incubação, assim como a agitação e aeração, exerce efeito significativo sobre o crescimento e produção de proteases por diferentes espécies de *Bacillus*. Segundo Puri, Beg e Gupta (2002), o tempo de incubação ótimo para crescimento e produção enzimática é bastante variável entre as espécies desse gênero, sendo dependente do tipo e concentração dos nutrientes empregados na formulação do meio de cultivo, bem como da densidade do inóculo.

Estudando a produção de protease por *Bacillus* sp. termofílico, Nascimento e Martins (2004) evidenciaram rápida produção de biomassa bacteriana desde o início do processo fermentativo quando foi utilizado citrato trissódico como fonte de carbono. A produção enzimática teve início a partir de 5 h de fermentação e alcançou seu valor máximo (1,93 U/mg de proteína) após 9 h. Segundo Ward (1985), apud Nascimento e Martins (2004), a maior produção de protease acontece durante o final da fase exponencial de crescimento.

Trabalhando com *Bacillus pseudofirmus*, Patel, Dodia e Singh (2005) constataram crescimento lento durante as primeiras 10 h de cultivo, seguido de uma rápida produção de biomassa até 40 h (evidenciada no fim da fase exponencial), na qual se observou o valor máximo. A produção de protease se apresentou associada ao crescimento, visto que essa teve início justamente com o início da fase de crescimento celular e se prolongou durante toda a fase exponencial, atingindo seu valor máximo (325 U/mL) nas primeiras horas da fase estacionária.

Contrariando estes resultados, Oskouie et al. (2008), trabalhando com *Bacillus clausii*, evidenciaram rápido crescimento celular durante as dezesseis primeiras horas de cultivo, o qual entrou em fase estacionária a partir deste instante. Com relação à síntese de protease, essa teve início após 10 h de fermentação e atingiu seu valor máximo (1600 U/mL) após 40 h. É interessante notar que com 10 h de incubação, a biomassa bacteriana atingiu quase o seu valor máximo, ao passo que a produção de protease apenas se iniciava. Segundo os autores, estes resultados sugerem que a produção dessa enzima por *Bacillus clausii* não está associada ao crescimento.

Utilizando maltose como substrato, suplementado com proteína de soro e água de maceração de milho para a produção de protease por *Bacillus* sp. SMIA-2, Silva, Delatorre e Martins (2007) reportaram síntese enzimática a partir de 2 h de incubação, sendo seu

valor máximo (42 U/mg de proteína) obtido após 14 h de fermentação no início da fase estacionária de crescimento.

O máximo crescimento celular, bem como a máxima produção de protease, foi constatado após 48 e 24 h de fermentação, respectivamente, quando se utilizou grama *Imperata cylindrica* e casca de batata como substrato para crescimento de *Bacillus subtilis* DM-04. A partir de 24 h de cultivo, observou-se um declínio da síntese de protease até 96 h, seguido novamente por um aumento que se estendeu até o final do processo fermentativo (120 h)(MUKHERJEE; ADHIKARI; RAI, 2008). Segundo Uyar e Baysal (2004), o declínio na produção enzimática após 24 h de cultivo pode ser devido à lenta desnaturação e/ou decomposição da própria enzima.

Resultados similares foram obtidos por Reddy et al. (2008), os quais obtiveram máxima produção de protease por *Bacillus* sp. RKY3 após 24 h de cultivo.

A influência do tempo de incubação também foi investigada por Genckal e Tari (2006) trabalhando com *Bacillus* sp. I18, L18 e L21. Nesta pesquisa, foi constatado produção máxima de protease após 96 h de cultivo para as três cepas estudadas. Segundo relatos da literatura, uma faixa ampla (24-120 h) é ideal para produção enzimática por diferentes espécies de *Bacillus* (CHU; LEE, 1992, apud GENCKAL; TARI, 2006, MABROUK et al., 1999, BEG; GUPTA, 2003). Resultados similares foram obtidos por Naidu e Devi (2005) e Bhaskar et al. (2007), os quais obtiveram máxima produção de protease com 96 h de incubação, trabalhando com *Bacillus* sp. K-30 e *Bacillus proteolyticus* CFR 3001, respectivamente.

A importância do tempo de incubação sobre a produção enzimática também foi reportado por Pérez et al. (2007). Estes pesquisadores encontram máxima síntese de protease por *Bacillus licheniformis* E-44 após decorridos 20 h de cultivo, enquanto que Hadj-Ali et al. (2007), trabalhando com *Bacillus licheniformis* NH1, evidenciaram ótima produção dessa enzima quando incubada por um período de 24 h.

Por outro lado, Al-Shehri, Mostafa e Yasser (2004) e Potumarthi, Subhakar e Jetty (2007) encontraram resultados distintos com relação ao período ótimo de incubação para produção de protease por duas cepas de *Bacillus licheniformis*, 36 e 72 h respectivamente. Os autores observaram ainda que o crescimento celular estava associado à síntese de protease, uma vez que esta produção se estendeu desde o início da fase exponencial (12 h - 32 U/mL), até o último estágio dessa fase (36 h - 221 U/mL).

F) Nível de Inóculo

Em trabalho recente desenvolvido por Mukherjee, Adhikari e Rai (2008), ficou constatado que a densidade de inóculo afeta sobremaneira a síntese de proteases por diferentes espécies de *Bacillus*. Estes autores testaram várias concentrações de inóculo, a saber: 10, 20, 40, 60 e 80% e evidenciaram aumento da produção de protease até o nível de 40%, no qual atingiu o valor máximo. Segundo os autores, o aumento da concentração de inóculo para níveis superiores a 40% ocasionou ligeira redução da síntese de protease por *Bacillus subtilis* DM-04 possivelmente em função da exaustão de nutrientes no meio de fermentação.

Em outro estudo, Uyar e Baysal (2004) constataram que 20 e 25% de inóculo são necessários para produção de protease por *Bacillus* sp. quando crescido em farelo de soja e casca de lentilha como substrato, respectivamente.

Adicionalmente, Genckal e Tari (2006) avaliaram o efeito de diferentes concentrações de inóculo (1,0, 2,5, 5,0 e 10,0%) sobre o crescimento e produção de protease por três cepas diferentes de *Bacillus* sp. A cepa I18 apresentou redução do crescimento para níveis inferiores a 5% de inóculo, enquanto que 10% de inóculo resultou em aumento da biomassa de *Bacillus* sp. I18 e *Bacillus* sp. L21. Com relação à cepa L18, o nível de inóculo não se mostrou significativo sobre o crescimento celular, haja vista que a concentração de biomassa se manteve praticamente inalterada, independentemente da concentração de inóculo utilizada no cultivo. No tocante à síntese de protease, as três cepas apresentaram aumento da produção dessa enzima quando foram inoculadas ao nível de 5%. Estes resultados evidenciaram que a concentração de inóculo influencia sobremaneira e de modo diferente o crescimento celular e a produção de proteases, dependendo das características das cepas estudadas.

Reddy et al. (2008), estudando a produção de protease por *Bacillus* sp. RKY3 em meio rico em amido de milho, evidenciaram produção de 939 U/mL de atividade proteolítica quando o inóculo foi utilizado ao nível de 3%, e apenas 417 U/mL quando 2% de células foram inoculadas.

Segundo Mabrouk et al. (1999) e Kanekar et al. (2002), concentrações de inóculo em torno de 2 e 5% são ideais para síntese de proteases por diferentes espécies de *Bacillus*. Estes níveis estão de acordo com os resultados obtidos por Al-Shehri, Mostafa e Yasser

(2004), os quais trabalhando como uma cepa de *Bacillus licheniformis* isolada de solo na Arábia Saudita, obtiveram ótima produção de protease (221 U/mL) com 2% de inóculo.

2.3.2 Glucanases

As β -1,3-glucanases (E.C. 3.2.1.39)[(1 $\rightarrow$ 3)- β -D-glucana glucanohidrolases], também denominadas de glucana-endo-1,3- β -D-glicosidases, catalisam a reação de hidrólise das ligações β -D-glicosídicas da β -1,3-glucana (FLEURI; SATO, 2005). Por outro lado, β -1,6-glucanases (E.C. 3.2.1.75)[(1 $\rightarrow$ 6)- β -D-glucana glucanohidrolases] são enzimas que catalisam a reação de hidrólise das ligações β -D-glicosídicas da β -1,6-glucana (PITSON et al., 1996). Essas polissacaridases são isoladas de várias fontes, incluindo plantas superiores, bactérias, fungos e até mesmo de ovos de ouriço do mar (MIYANISHI et al., 2003).

Notário, Villa e Villanueva (1976), apud Giese, Barbosa e Silva (2003), reportaram que β -glucanases são proteínas ácidas, carregadas negativamente. A composição em aminoácidos revelou alta porcentagem de glicina, além de alanina em grandes proporções.

Segundo Manners et al. (1973), as β -1,3-glucanases são específicas para substratos contendo seqüências lineares de três ou mais unidades de glicose unidas por ligações glicosídicas do tipo β -(1 $\rightarrow$ 3) contendo uma extremidade terminal não-redutora. No entanto, um grau de substituição moderado de resíduos de glicose pode ser tolerado, de modo que essas polissacaridases possam atuar sobre (1 $\rightarrow$ 3)(1 $\rightarrow$ 6)- β -glucanas, por exemplo. Dentre estes substratos podemos citar: laminarina, “paramylona” e “pachyman” (FLEURI; SATO, 2005), escleroglucana (JAYUS; McDOUGALL; SEVIOUR, 2002) e pustulana (RAPP, 1989, apud GIESE; BARBOSA; SILVA, 2003).

Reese e Mandels (1959), apud Giese, Barbosa e Silva (2003), selecionaram 140 fungos produtores de β -1,3-glucanases e por meio de cromatografia em camada delgada dos produtos resultantes da hidrólise enzimática de laminarina (β -1,3-glucana), propuseram dois mecanismos de ação para essas enzimas: 1- Endo-, constituindo uma ação randômica no substrato, resultando em oligossacarídeos de maior massa molecular e, 2- Exo-, produzindo glicose como único produto de hidrólise.

No que se refere aos ensaios enzimáticos para quantificação de β -1,3 e β -1,6-glucanases, geralmente são utilizados laminarina e pustulana como substrato reacional, respectivamente. Segundo Rapp (1989), apud Giese, Barbosa e Silva (2003), os parâmetros

cinéticos dessas enzimas hidrolíticas variam de acordo com o microrganismo estudado em função das exigências nutricionais e características fisiológicas distintas inerentes a cada enzima.

A atividade das β -glucanases pode ser inibida pela presença de compostos químicos, tais como, clorofórmio, benzenóides, organofosfatos e quelantes, além de elevadas concentrações de substrato e pelos próprios produtos advindos do metabolismo microbiano (RANA et al., 2003).

O crescente interesse no estudo das β -glucanases concentra-se no seu potencial de aplicação industrial, considerando a sua ação hidrolítica sobre diversas substâncias naturais (KIRK; BORCHET; FUGLSANG, 2002, WARREN, 1996), incluindo hidrólise de parede celular de leveduras, como *Saccharomyces cerevisiae*, a qual é rica em resíduos de β -D-glucana que apresentam efeito prebiótico (PÉREZ et al., 2007). Outras aplicações dessas polissacaridasas incluem controle biológico de pragas, obtenção de protoplastos e extrato de levedura, dieta animal (melhoria da conversão alimentar e taxa de crescimento específico) e na indústria cervejeira (melhoramento da extração do malte, clareamento da cerveja e prevenção da formação de géis)(McCARTHY et al., 2005).

2.3.2.1 Parâmetros que Interferem na Produção Microbiana de β -glucanases

Segundo relatos contidos na literatura pertinente, são inúmeros os parâmetros fermentativos que afetam a produção de β -1,3 e β -1,6-glucanases por diferentes microrganismos, a saber: composição do meio de cultivo, incluindo natureza e concentração da fonte de carbono utilizada, mecanismos de repressão e indução, temperatura, pH, agitação, aeração, tensão de oxigênio dissolvido e tempo de incubação (GIESE et al., 2005, JAYUS; McDOUGALL; SEVIOUR, 2002).

A) Composição do Meio de Cultivo

Em estudo conduzido com *Bacillus subtilis* NSRS 89-24, Leelasuphakul, Sivanunsakul e Phongpaichit (2006), testaram diferentes concentrações de quitina e evidenciaram máxima produção de β -1,3-glucanase (65 U/mL) quando o meio de cultivo foi suplementado ao nível de 0,3% de indutor ao longo de 7 dias de fermentação.

Trabalhando com *Trichoderma harzianum*, Noronha et al. (2000) avaliaram o efeito de diferentes fontes de carbono, a saber: parede celular purificada de *Pythium* sp., parede celular de *Rhizoctonia solani*, parede celular de *Sclerotium rolfii*, laminarina, quitina, quitosana, celulose, N-acetilglicosamina e glicose, sobre a produção de β -1,3-glucanase. Os resultados mostraram maior produção dessa enzima quando o fungo foi crescido em meio de cultivo constituído de paredes celulares. Segundo os autores, as altas atividades glucanólíticas obtidas com esse tipo de substrato sugerem que a regulação da expressão de β -1,3-glucanase em *Trichoderma harzianum* foi significativamente influenciada pelos diferentes níveis de β -glucana presentes na estrutura química de cada indutor avaliado. Resultados similares foram obtidos por Vasquez-Garciduenas et al. (1998), os quais evidenciaram alta produção de β -1,3-glucanases na presença de laminarina, parede celular de *Saccharomyces cerevisiae* e de *Rhizoctonia solani* como fonte de carbono. Estes autores reportaram que o tipo de ligação glicosídica existente na molécula desses indutores é de fundamental importância para síntese enzimática, tendo em vista a obtenção de atividades enzimáticas mais elevadas na presença de laminarina (β -1,3-glucana), em detrimento da atividade encontrada na presença de pustulana (β -1,6-glucana) como fonte de carbono.

O excesso de glicose ou outra fonte de carbono facilmente fermentescível reprime a produção de β -glucanases em algumas espécies de microrganismos (GIESE; BARBOSA; SILVA, 2003). Segundo Noronha et al. (2000), a regulação exercida pela glicose envolve a repressão da expressão dos genes que codificam essas enzimas; uma vez consumida a fonte de carbono, ocorre a desrepressão, resultando na síntese enzimática.

O efeito de repressão catabólica exercido pela glicose na produção de β -1,3-glucanases produzidas por diferentes espécies de fungos foi constatado por De La Cruz et al. (1993, 1995). Esse efeito também foi evidenciado por Noronha et al. (2000), os quais avaliaram o crescimento de *Trichoderma harzianum* em meio de cultivo contendo 1% de glicose. Os resultados mostraram que a produção de β -1,3-glucanase se iniciou após 36h de fermentação, quando a concentração de glicose no meio fermentativo era praticamente inexistente. Adicionalmente, foi evidenciado máxima produção dessa enzima após 96 h de cultivo, sendo este valor de atividade (0,5 U/mL) bem mais baixo do que àqueles encontrados quando o fungo foi crescido em meio contendo parede celular como indutor (10,8, 7,91, 4,61 e 4,0 U/mL na presença de parede celular purificada de *Pythium* sp., *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfii* e laminarina, respectivamente).

Em estudo conduzido com *Trichoderma asperellum*, Bara, Lima e Ulhoa (2003) também evidenciaram máxima produção de β -1,3-glucanase (1,23 U/mg de biomassa) quando o fungo foi crescido em meio contendo parede celular purificada de *Rhizoctonia solani*. Com relação aos outros substratos avaliados (quitina, quitosana, celulose e amido), a atividade específica foi cerca de 4 vezes menor do que àquela obtida em meio rico em parede celular, sendo que na presença de glicose (1 e 2%) não foi detectado produção de β -1,3-glucanase por *Trichoderma asperellum*.

Jayus, McDougall e Seviour (2002), trabalhando com *Acremonium* sp. IMI 383068, avaliaram o efeito da utilização de pustulana (β -1,6-glucana) como fonte de carbono para a produção de β -1,3-glucanase e β -1,6-glucanase. As fermentações foram realizadas em fermentador tipo tanque agitado (28°C, 400 rpm, pH 6,0, 0,3 vvm) e os resultados mostraram que a produção de β -1,3-glucanase estava associada ao crescimento. Os autores observaram que a concentração celular quadruplicou em relação à quantidade inicial de inóculo após 48 h, sendo verificado máxima produção de β -1,3-glucanase (500 mU/mL). A partir de então, o microrganismo entrou em fase estacionária e a produção enzimática se manteve em ligeiro declínio. Com relação à síntese de β -1,6-glucanase, essa pareceu não estar associada ao crescimento, tendo em vista que a máxima produção de biomassa se deu após 48 h de cultivo e somente a partir desse instante, é que efetivamente teve início a síntese de β -1,6-glucanase por *Acremonium* sp. IMI 383068, a qual atingiu seu valor máximo (63 mU/mL) após 120 h de fermentação.

Em fermentações conduzidas com *Acremonium* sp. IMI 383068 para a produção de β -1,3-glucanase, Jayus, McDougall e Seviour (2004), inesperadamente constataram altas atividades dessa enzima na presença de pustulana como fonte de carbono quando comparado com laminarina. Evidências preliminares sugeriram que a enzima não é constitutiva, mas sim induzível, e que a sua síntese é reprimida por glicose. Segundo os autores, pustulana pode não ser uma “verdadeira” molécula indutora, uma vez que sendo uma glucana encontrada naturalmente, pode conter outros polissacarídeos na sua composição que estejam agindo como indutor para a síntese de β -1,3-glucanase.

Ensaios preliminares foram realizados por Jayus et al. (2005) com o objetivo de determinar a concentração ótima de escleroglucana ((1 $\rightarrow$ 3)(1 $\rightarrow$ 6)- β -glucana)) a ser utilizada como fonte de carbono para a produção de β -1,3-glucanase por *Acremonium* sp. IMI 383068. Dentre as concentrações testadas, 0,25, 0,5, 1,0, 1,25 e 1,5 g/L, àquela que

permitiu a máxima síntese de β -1,3-glucanase, aproximadamente 800 mU/mL, foi escleroglucana ao nível de 1 g/L.

Botryosphaeria rhodina e *Trichoderma harzianum* Rifai, dois fungos produtores de enzimas extracelulares, foram crescidos em diferentes concentrações de botriosferana (exopolissacarídeo de (1 $\rightarrow$ 3)(1 $\rightarrow$ 6)- β -glucana produzida por *Botryosphaeria rhodina*) a saber: 0,5, 1,0 e 1,5 g/L, e os resultados mostraram máxima produção de β -1,3-glucanase quando o exopolissacarídeo foi utilizado ao nível de 1,5 g/L. Em estudos relacionados, *Botryosphaeria rhodina* não cresceu em meio de cultivo contendo 2 g/L de botriosferana, no entanto, a adição de 1,0 g/L de glicose a este meio estimulou o crescimento, bem como a síntese de β -1,3-glucanase. Neste mesmo trabalho, Giese et al. (2005) compararam o efeito de laminarina e botriosferana, nas mesmas concentrações, sobre a atividade enzimática de β -1,3-glucanase produzida por *Trichoderma harzianum* Rifai e *Botryosphaeria rhodina*. Segundo os autores, nos sobrenadantes dos meios de cultivo analisados foram encontradas atividades mais altas dessa enzima quando os respectivos microrganismos foram crescidos em laminarina como fonte de carbono.

Shu, Xu e Lin (2006), estudando o comportamento de *Agaricus brasiliensis*, constataram máxima produção de β -1,3-glucanase (2,5 U/mL) após 18 h de cultivo na fase estacionária de crescimento na presença de β -glucana e 1% de glicose como fontes de carbono.

B) Temperatura

De acordo com Cohen-Kupiec et al. (1999), Fleet e Phaff (1974), Jayus et al. (2005), a maioria das espécies de fungos e bactérias do gênero *Bacillus* apresenta crescimento e produção de β -glucanases elevados quando cultivados em temperaturas que variam entre 28 e 30°C.

Em ensaio enzimático conduzido com laminarina como substrato reacional, foi constatado que os três tipos de β -1,3-glucanases produzidas por *Bacillus circulans* IAM 1165 apresentaram temperatura ótima de 60°C, sendo que sua atividade original foi mantida em 100% entre 0 e 60°C (AONO et al., 1995).

Miyanishi et al. (2003) realizaram ensaio enzimático com uma β -1,3-glucanase produzida por *Bacillus clausii* NM-1 e constataram que a enzima apresentou temperatura ótima de 50°C. Essa mesma enzima foi avaliada em outras temperaturas, a saber: 35, 40 e

60°C por 15 minutos e os resultados mostraram que β -1,3-glucanase foi estável a 35°C, perdeu 15% de sua atividade original a 40°C e a 60°C sua atividade foi praticamente reduzida a zero.

Resultados similares foram obtidos por Leelasuphakul, Sivanunsakul e Phongpaichit (2006), em estudo desenvolvido com *Bacillus subtilis* NSRS 89-24 para a produção de uma β -1,3-glucanase. Estes autores também evidenciaram atividade glucanólítica ótima em 50°C, sendo que a enzima perdeu 50% de sua atividade original a 60°C e praticamente teve sua atividade reduzida a zero na temperatura de 70°C. Adicionalmente, a enzima reteve 100% de sua atividade original entre 20 e 40°C.

Em outro estudo conduzido com duas diferentes espécies de bactéria, *Oerskovia xanthineolytica* e *Cellulomonas cellulans*, foi evidenciado temperatura ótima de atividade de β -1,3-glucanase de 65 e 55°C, respectivamente (FLEURI; SATO, 2005).

Em fermentação conduzida à 28°C, Jayus, McDougall e Seviour (2001), evidenciaram que a temperatura ótima de atividade de β -1,3-glucanase produzida por *Acremonium* sp. IMI 383068 foi de 50°C. Adicionalmente, observou-se que a enzima se manteve estável entre 20 e 50°C, sendo que acima desta temperatura a atividade começou a declinar ininterruptamente até perder quase toda estabilidade a 80°C.

Resultados similares em termos de temperatura ótima de atividade enzimática foram obtidos por De La Cruz et al. (1995), em fermentação conduzida com uma cepa de *Trichoderma harzianum* em meio rico em quitina como fonte de carbono para a produção de β -1,6-glucanase.

Bara, Lima e Ulhoa (2003), estudando o comportamento de *Trichoderma asperellum*, evidenciaram que β -1,3-glucanase sintetizada por esse fungo apresentou temperatura ótima de atividade de 55°C. Estes resultados corroboram com àqueles obtidos por Noronha e Ulhoa (2000), os quais estudaram a produção de uma β -1,3-glucanase por *Trichoderma harzianum*. Adicionalmente, a enzima se manteve estável por pelo menos 90 minutos quando incubada a 45°C e reteve 57% de sua atividade original a 50°C.

Giese et al. (2006) realizaram ensaios enzimáticos com β -1,3-glucanases produzidas por *Botryosphaeria rhodina* e *Trichoderma harzianum* Rifai com o intuito de determinar a temperatura ótima de atuação para cada enzima. Os ensaios foram realizados com laminarina como substrato reacional e os resultados mostraram que β -1,3-glucanase produzida por *Botryosphaeria rhodina* apresentou atividade ótima em 55°C, enquanto que àquela produzida por *Trichoderma harzianum* Rifai em 50°C.

Pitson et al. (1996) reportaram que β -1,6-glucanase produzida por *Acremonium persicinum* em meio contendo laminarina como fonte de carbono se manteve estável a 30°C durante cinco semanas de incubação, restando mais de 90% da atividade original durante este período.

Em estudo conduzido por Shu, Xu e Lin (2006), ficou constatado que β -1,3-glucanase produzida por *Agaricus brasiliensis* na presença de quitina como fonte de carbono, apresenta atividade ótima em 45°C e manteve aproximadamente 90% de sua atividade original a 50°C. Adicionalmente, a enzima exibiu tempo de meia-vida de 30 minutos a 55°C.

C) pH

Aono et al. (1995) avaliaram o efeito do pH sobre a atividade de três tipos de β -1,3-glucanases produzidas por *Bacillus circulans* IAM 1165 quando crescido em meio rico em “pachymana” (β -1,3-glucana insolúvel) como fonte de carbono. A análise dos sobrenadantes revelou que a enzima apresenta pH ótimo em torno de 7,0 e se manteve estável em valores de pH situados entre 4,0 e 7,0.

Em estudo conduzido com *Bacillus clausii* NM-1, Miyanishi et al. (2003) também evidenciaram máxima atividade de β -1,3-glucanase em pH 7,0. A enzima permaneceu estável em ampla faixa de pH (5,3-11,5), no entanto, a estabilidade foi perdida quando o ensaio foi conduzido em valores de pH mais ácidos (4,0-4,5).

Contrastando com estes resultados, Leelasuphakul, Sivanunsakul e Phongpaichit (2006), em estudo desenvolvido com *Bacillus subtilis* NSRS 89-24, reportaram atividade ótima de β -1,3-glucanase em pH 7,5, sendo que essa, ao contrário daquelas β -glucanases sintetizadas por *Bacillus circulans* IAM 1165, se mostrou ativa em valores de pH mais alcalinos (6,5-9,5).

De acordo com Fleuri e Sato (2005), β -1,3-glucanases produzidas por *Oerskovia xanthineolytica* e *Cellulomonas cellulans*, duas outras espécies de bactérias, apresentaram atividade ótima em pH 7,5 e 5,5-6,5, respectivamente, quando foram incubadas na presença de laminarina como substrato reacional.

Shu, Xu e Lin (2006) reportaram que β -1,3-glucanase produzida pelo fungo *Agaricus brasiliensis* apresenta pH ótimo de atividade em torno de 4,5 e alta estabilidade em valores de pH situados entre 3,5 e 6,0. Resultados similares foram obtidos com uma β -

1,3-glucanase produzida por *Lentinula edodes* em meio de cultivo rico em lentinana (β -1,3-glucana contendo ramificações β -1,6) como fonte de carbono, a qual revelou máxima atividade em pH 4,2 (MINATO et al., 2004).

β -1,3-glucanase produzida por *Acremonium* sp. IMI 383068 na presença de pustulana como fonte de carbono apresentou pH ótimo de atividade em 7,0 e se manteve estável numa faixa de pH entre 5,5 e 7,5 quando incubada por 24 h a 4°C. Adicionalmente, essa enzima reteve 80% de sua atividade original em valores de pH compreendidos entre 8,0 e 11,0, sendo que a partir desse valor foi relatado queda abrupta da atividade (JAYUS; McDOUGALL; SEVIOUR, 2001).

Segundo Bara, Lima e Ulhoa (2003), β -1,3-glucanase produzida por *Trichoderma asperellum* revelou atividade máxima em pH 5,0. Estes resultados corroboram com àqueles obtidos por El-Katatny et al. (2001), Kitamoto et al. (1987), Noronha e Ulhoa (1996, 2000), os quais trabalharam com diferentes cepas de *Trichoderma harzianum* para produção de enzimas glucanólíticas.

Jayus, McDougall e Seviour (2002), trabalhando com *Acremonium* sp. IMI 383068, conduziram fermentações com o objetivo de se avaliar o efeito de diferentes valores de pH (controlados automaticamente pela adição de HCl e/ou NaOH 2 M), a saber: 5,0, 5,5, 6,0, 6,5 e 7,5 sobre a produção de β -1,3 e β -1,6-glucanase. Os resultados indicaram que o pH inicial ótimo para produção de ambas as enzimas é 6,5, enquanto que em pH 7,5 as atividades das duas enzimas foram sensivelmente reduzidas. Com relação à β -1,3-glucanase, essa teve sua atividade aumentada linearmente (130 para 410 mU/mg de biomassa) quando em pH 5,0 e 6,5, respectivamente. No entanto, β -1,6-glucanase apresentou aumento da atividade específica (110 para 240 mU/mg de biomassa) quando o pH foi aumentado de 6,0 para 6,5. Estes mesmos autores, porém no ano de 2004, realizaram ensaios enzimáticos com β -1,3-glucanase e evidenciaram que essa apresenta pH ótimo em 5,0 e é capaz de reter mais de 80% de sua atividade original numa faixa de pH entre 4,5-9,0.

Estudando a produção de β -1,6-glucanase sintetizada por *Acremonium persicinum*, Pitson et al. (1996) evidenciaram queda acentuada do pH inicial (6,5) do meio de cultivo durante a fase exponencial de crescimento, e justificaram essa queda em função da produção de metabólitos pelo próprio fungo. Ao término dessa fase, o pH sofreu ligeiro aumento e se manteve constante até o final do processo fermentativo, o qual assumiu o valor de 5,7. Adicionalmente, os autores revelaram que essa enzima apresenta pH ótimo

em 5,0 e reteve mais de 80% de sua atividade original numa faixa de pH entre 4,5 e 9,5 depois de incubada a 4°C por 24 h. Como pode ser observado, o comportamento dessa enzima glucanólítica com relação ao pH ótimo e estabilidade frente a diferentes valores de pH se assemelha bastante com a β -1,3-glucanase sintetizada por *Acremonium* sp. IMI 383068.

Giese et al. (2006) realizaram ensaios enzimáticos utilizando laminarina como substrato reacional e constataram que β -1,3-glucanase produzida por *Trichoderma harzianum* Rifai apresenta pH ótimo em 4,5, enquanto que pH 5,0 foi o ideal para a atividade de β -1,3-glucanase sintetizada por *Botryosphaeria rhodina*.

D) Agitação e Aeração

Segundo Jayus, McDougall e Seviour (2002), agitação e aeração exercem influência significativa sobre a produção de β -1,3 e β -1,6-glucanases por *Acremonium* sp. IMI 383068 quando crescido em meio de cultivo rico em pustulana e escleroglucana como fontes de carbono.

Fermentações foram realizadas em reator tipo tanque agitado, em pH controlado em 6,0, aeração de 0,3 vvm, temperatura de 28°C e velocidades de agitação de 100, 200, 300, 400, 500 e 750 rpm. Os resultados mostraram que as duas enzimas foram sintetizadas de maneira semelhante quando as fermentações foram conduzidas com pustulana em velocidades de agitação de 200, 300 e 400 rpm. A máxima produção de β -1,3 e β -1,6-glucanase se deu em 400 rpm (500 e 63 mU/mg de biomassa, respectivamente), sendo que em 300 e 200 rpm também foram obtidas atividades glucanólíticas significativas, sendo 330 e 230 mU/mg, respectivamente para β -1,3-glucanase e, 42 e 25 mU/mg, respectivamente para β -1,6-glucanase. Por outro lado, a síntese das enzimas foi significativamente reduzida quando o fungo foi crescido em velocidades de agitação inferiores a 200 rpm e superiores a 400 rpm. O mesmo comportamento não foi observado quando escleroglucana foi utilizada como fonte de carbono a 200 rpm de agitação, sendo que a atividade de β -1,3-glucanase sofreu redução de 15% em relação àquela obtida em meio de cultivo contendo pustulana, enquanto que β -1,6-glucanase teve sua produção aumentada em 200% em relação àquele mesmo substrato. Por outro lado, em 400 e 750 rpm, ambas as enzimas tiveram um aumento de produção, sendo esse aumento de 20 e 100%, respectivamente, para β -1,3 e β -1,6-glucanase em 400 rpm; entretanto, em 750 rpm

as atividades dobraram de valor quando na presença de escleroglucana. Adicionalmente, os autores concluíram que velocidades de agitação superiores a 400 rpm tiveram uma influência significativamente maior sobre a produção de β -1,3-glucanase em relação à síntese de β -1,6-glucanase nesta mesma velocidade de agitação.

No tocante à aeração, essa foi variada de 0,3 a 1,2 vvm, sendo que os demais parâmetros, tais como, pH inicial, temperatura e agitação, foram mantidos constantes. Os resultados mostraram que o aumento da aeração ocasionou redução da atividade específica de β -1,3 e β -1,6-glucanase quando *Acremonium* sp. IMI 383068 foi crescido em pustulana. Essa redução foi mais acentuada para β -1,3-glucanase, a qual teve sua atividade reduzida de 4,2 vezes em relação à aeração de 1,0 vvm, sendo que para β -1,6-glucanase essa queda foi de apenas 2 vezes em relação à mesma aeração. Quando em presença de escleroglucana, a elevação do nível de aeração até 0,9 vvm acarretou aumento substancial na síntese das duas enzimas, sendo esse aumento de 300 mU/mg para β -1,3-glucanase e de 250 mU/mg para β -1,6-glucanase (JAYUS; McDOUGALL; SEVIOUR, 2002).

Resultados significativos em termos de atividade de β -1,3-glucanase foram obtidos por Leelasuphakul, Sivanunsakul e Phongpaichit (2006), os quais avaliaram a produção dessa enzima por *Bacillus subtilis* NSRS 89-24 em velocidade de agitação de 170 rpm e por Cohen-Kupiec et al. (1999), os quais reportaram ótima produção de β -1,6-glucanase por *Trichoderma harzianum* em 140 rpm.

Jayus, McDougall e Seviour (2005), conduziram fermentações com *Acremonium* sp. IMI 383068 com o intuito de verificar a influência exercida pela variação da tensão de oxigênio dissolvido (TOD) sobre o crescimento e produção de β -1,3 e β -1,6-glucanase em meio contendo pustulana como fonte de carbono. Com relação ao crescimento, esse não foi afetado pela TOD, tendo em vista a obtenção de valores constantes de biomassa ao longo do cultivo. Segundo os autores, a produção de β -1,3-glucanase foi sensivelmente mais afetada pela TOD quando comparado à produção de β -1,6-glucanase, sendo essa constatação justificada em função dessa enzima ser sintetizada intracelularmente nos primeiros estágios do crescimento do fungo, mas somente ser liberada para o meio de fermentação após a autólise celular. Quanto à síntese das enzimas, essas apresentaram máxima produção com 20% de saturação de oxigênio, sendo que 5 e 40% de saturação ocasionaram redução da síntese de β -1,3-glucanase e pouca influência exerceram sobre a β -1,6-glucanase.

E) Tempo de Incubação

Em estudo conduzido com *Bacillus subtilis* NSRS 89-24, Leelasuphakul, Sivanunsakul e Phongpaichit (2006), utilizando quitina como indutor para a síntese de β -1,3-glucanase, constataram atividade ao longo de 7 dias de cultivo, sendo a atividade máxima (65 U/mL) obtida após o quinto dia.

Segundo Giese et al. (2005), *Botryosphaeria rhodina* e *Trichoderma harzianum* Rifai crescidos em botriosferana apresentam máxima produção de β -1,3-glucanase após 5 dias de cultivo.

Shu, Xu e Lin (2006) avaliaram o comportamento cinético de *Agaricus brasiliensis* sobre a produção de um tipo de β -1,3-glucanase extracelular. Os resultados revelaram que a síntese enzimática teve início após 5 dias de cultivo e aumentou em função do aumento da biomassa fúngica, sendo o valor máximo de atividade obtido (2,5 U/mL) com 18 dias de cultivo em fase estacionária de crescimento. Adicionalmente, foi evidenciado crescimento celular pronunciado em meio contendo β -glucana e 1% de glicose, uma vez que *Agaricus brasiliensis* aumentou em 10 vezes sua biomassa em 18 dias de cultivo.

Jayus, McDougall e Seviour (2001), evidenciaram máxima produção de β -1,6-glucanase com 8 dias de cultivo trabalhando com *Acremonium* sp. IMI 383068 crescido em meio de cultivo composto por laminarina ou pustulana como fonte de carbono. No que se refere ao crescimento fúngico, esse apresentou comportamento semelhante na presença dos dois substratos, atingindo o valor máximo (1,20 g/L) após 2 dias de fermentação, quando então atingiu a fase estacionária. É interessante notar que a produção da enzima teve início nas primeiras horas de cultivo, sendo que quando o fungo foi crescido em laminarina, a síntese enzimática se manteve constante após 2 dias do início da fase estacionária. Adicionalmente, a produção de β -1,6-glucanase por *Acremonium* sp. IMI 383068 em meio contendo pustulana prosseguiu de maneira exponencial até o término da fermentação após 10 dias.

Por outro lado, Jayus, McDougall e Seviour (2002), avaliando o efeito de diferentes tempos de incubação, a saber: 24, 48, 72, 96, 120 e 240 h sobre a produção de β -1,3-glucanase por *Acremonium* sp. IMI 383068 a 400 rpm, reportaram máxima atividade glucanólítica após 48 h de fermentação.

Os resultados da fermentação conduzida com *Acremonium persicinum* em meio de cultivo contendo laminarina revelaram produção de β -1,6-glucanase desde as primeiras

horas de fermentação, a qual aumentou de maneira exponencial até o sexto dia e atingiu seu valor máximo (47 mU/mL) com 10 dias de cultivo. Com relação à biomassa fúngica, essa aumentou exponencialmente até 48 h, quando então entrou em fase estacionária. (PITSON; SEVIOUR; McDOUGALL, 1999).

De La Cruz et al. (1995), trabalhando com quitina como fonte de carbono para crescimento de *Trichoderma harzianum*, reportaram que a produção de β -1,6-glucanase se deu desde as primeiras horas de cultivo e atingiu seu valor máximo (120 mU/mL) com 4 dias de fermentação. Resultados similares foram obtidos com uma β -1,3-glucanase produzida por uma outra variedade desta espécie, a qual apresentou máxima produção enzimática com 3 dias de cultivo (NORONHA et al., 2000).

Resultados significativos em termos de atividade de β -1,3-glucanase também foram obtidos com 24 h de cultivo por Bara, Lima e Ulhoa (2003), trabalhando com *Trichoderma asperellum*.

2.3.3 Mananases

As enzimas caracterizadas como α -mananases (E.C. 3.2.77)(α -D-manana mananohidrolases) catalisam a reação de hidrólise das ligações α -1,2, α -1,3 e α -1,6 presentes entre resíduos de manose formadores da cadeia de manana, a qual é um polímero presente na parede celular de leveduras (JOHN; HAMPEL, 1991).

Segundo John e Hampel (1991), α -mananases encontram-se amplamente distribuídas em sementes de plantas, tecidos animais e microrganismos, sendo que sua produção por microrganismos, principalmente por bactérias, vem se tornando bastante promissora em função do baixo custo de produção, altos rendimentos com baixo tempo de reação, além da facilidade de controle das condições de processo (FENG, 2003).

Pavlova e Tinyanova (1980) isolaram 23 cepas de microrganismos do solo com capacidade de sintetizar α -mananases extracelulares, dentre as quais, 10 foram selecionadas como maiores produtoras e identificadas de acordo com o gênero a que pertencem, a saber: *Bacillus*, *Arthrobacter*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas*, *Actinomyces*, entre outros.

Atualmente, encontra aplicação na indústria de alimentos e de papel. Adicionalmente, Pérez et al. (2007) reportaram que α -mananases podem também ser

utilizadas na lise de parede celular de leveduras, cujo produto de hidrólise é composto por oligossacarídeos de manana que podem ser utilizadas como prebiótico na dieta de animais.

2.3.3.1 Parâmetros que Interferem na Produção Microbiana de α -Mananases

John e Hampel (1991) avaliaram o efeito de diferentes fontes de carbono, a saber: manana de levedura, manose, sacarose, frutose e glicose sobre o crescimento e síntese de α -mananase por *Arthrobacter* sp. Os experimentos foram conduzidos em batelada a 30°C, pH 6,5, 500 rpm e 0,25 vvm e os resultados mostraram que a maior produção dessa enzima se deu na presença de frutose e manana de levedura (180 e 145 U/L, respectivamente). Por outro lado, baixa atividade enzimática foi evidenciada na presença de manose e sacarose, sendo que na presença de glicose como fonte de carbono não houve produção alguma de α -mananase.

Os autores relataram que o crescimento e a síntese de α -mananase por *Arthrobacter* sp. na presença de manana de levedura e de frutose estão associadas ao crescimento. Adicionalmente, os autores revelaram que a síntese dessa enzima se deu desde as primeiras horas de fermentação, durante a fase “lag” de crescimento bacteriano, e se estendeu de maneira exponencial paralelamente ao crescimento, atingindo seu valor máximo após 14 e 20 h, respectivamente. Em função da baixa produção e da não produção de α -mananase por *Arthrobacter* sp. na presença de manose e glicose, respectivamente, John e Hampel (1991) sugeriram que estes substratos exercem forte efeito repressor sobre a formação dessa enzima. Estes resultados corroboram com àqueles obtidos por Coughlan e Ljungdahl (1988), Inamine et al. (1969), Srivastava e Mathur (1983), apud John e Hampel (1991), os quais trabalharam, respectivamente, com a produção de celulases, α -manosídeses e amilases por diferentes microrganismos.

2.4) Prebióticos

2.4.1 Definição e Aplicações

Segundo Bengmark (2005), Lim, Ferguson e Tannock (2005), prebióticos são aditivos alimentares não digeríveis que afetam benéficamente a saúde do hospedeiro pela estimulação seletiva do crescimento ou da atividade de um número limitado de bactérias

probióticas. Em outras palavras, são substâncias não metabolizáveis na parte superior do trato gastrointestinal e que, chegando ao intestino grosso, servem de fonte de carbono para as bactérias bífidas e lactobacilos ali presentes (GIBSON; ROBERFROID, 1995).

Contudo, a natureza de um prebiótico tem sido atribuída a muitos componentes alimentares sem, no entanto, levar em consideração alguns critérios requeridos (GIBSON; ROBERFROID, 1995). Em particular, quase todos os oligossacarídeos e polissacarídeos, incluindo as fibras alimentares, apresentam efeito prebiótico, mas nem todos os carboidratos alimentares são prebióticos (GIBSON, 2004).

Segundo Gibson e Roberfroid (1995), para um ingrediente ser considerado como um prebiótico deve apresentar algumas características, tais como:

- 1) Não ser hidrolisado nem absorvido na parte superior do trato gastrointestinal;
- 2) Ser capaz de alterar a microbiota colônica em favor de uma composição mais saudável e,
- 3) Estimular seletivamente o crescimento e/ou a atividade de um ou um número limitado de bactérias benéficas comensais, principalmente bifidobactérias e lactobacilos, presentes no trato gastrointestinal.

Alguns componentes alimentares que alcançam o cólon intactos, ou seja, sem sofrer alterações, são considerados prebióticos em potencial. Dentre esses componentes, encontram-se os oligossacarídeos, que são açúcares de cadeia curta formados por aproximadamente 2 a 10 unidades sacarídicas. Fazem parte deste grupo os frutoligossacarídeos, galactoligossacarídeos, lactulose, oligossacarídeos de soja (rafinose e estaquiose), isomaltoligossacarídeos, glucoligossacarídeos, mananoligossacarídeos, xiloligossacarídeos e palatinose (GIBSON et al., 2000). Prebióticos, principalmente os frutoligossacarídeos são encontrados em muitos alimentos, como banana, cebola, alcachofra, chicória, alho e aspargos, entre outros (GIBSON; ROBERFROID, 1995).

O fato desses oligossacarídeos serem capazes de atravessar o trato gastrointestinal superior e chegarem intactos ao cólon é devido às ligações específicas entre seus monômeros que resistem à hidrólise por enzimas do trato digestivo. A presença de enzimas microbianas capazes de atuar sobre essas ligações permite que esses carboidratos sejam seletivamente degradados. Esta seletividade é conferida pelo fato de que nem todos os microrganismos que compõem a microbiota intestinal possuem as enzimas apropriadas para degradar todas as ligações (ZIEMER; GIBSON, 1998).

Alguns carboidratos não digeríveis apresentam um número de efeitos funcionais no trato gastrointestinal, que quando combinados, podem resultar em melhorias para a saúde do hospedeiro pela redução de distúrbios intestinais (constipação intestinal e diarreia), doenças cardiovasculares e câncer de intestino. Segundo Roberfroid (1996) esses efeitos estão relacionados à manutenção da microbiota intestinal, estimulação da motilidade intestinal (trânsito intestinal), redução da absorção excessiva de glicose e colesterol, diminuição do pH e produção de amônia.

Embora as fibras alimentares e os compostos prebióticos apresentem as mesmas propriedades e não sejam absorvidos pelo trato gastrointestinal, os mesmos se diferenciam pelo fato de que compostos prebióticos são seletivamente fermentados no cólon, enquanto que fibras alimentares são fermentadas por uma ampla gama de espécies de microrganismos que compõem a microbiota intestinal, inclusive as patogênicas (OUWEHAND et al., 2005).

Existem inúmeras aplicações em potencial para compostos prebióticos, como aditivos alimentares para melhoria da saúde gastrointestinal dos consumidores, entre as quais se destacam: bebida e leites fermentados, molhos, alimentos formulados para crianças, cereais, biscoitos, doces, balas, goma de mascar, bolos, sobremesas, sopas, temperos para saladas e produtos derivados do leite, entre outros (GIBSON, 2004).

2.4.2 Histórico

No último século, vários estudos relativos à nutrição humana e animal têm relacionado à diminuição de ocorrência de doenças, o bom funcionamento do organismo e o aumento da expectativa de vida com a modulação do ecossistema intestinal (SALMINEN, 1996). Assim, alguns grupos de bactérias são capazes de inibir a proliferação de microrganismos patogênicos, estimularem o sistema imune e evitar ou abrandar a síntese de compostos tóxicos e mutagênicos. No entanto, a manutenção destas populações está intimamente relacionada com o tipo de alimento consumido pelo indivíduo (LÓPEZ, 2000).

Embora o termo “prebiótico” tenha sido adotado somente em 1995 por Gibson e Roberfroid, estudos sobre esses compostos são mais antigos. Na década de 50, a descoberta de que o leite humano possuía compostos que atuavam como inibidores de adesão de bactérias patogênicas na superfície epitelial (posteriormente identificados como lactulose) e potencializavam o crescimento das populações de bifidobactérias e lactobacilos,

aliviando os sintomas de encefalopatia hepática em bebês (NICOLI; VIEIRA, 2000; WALKER; DUFFY, 1998) incentivou outras pesquisas sobre o efeito do consumo de compostos não digestíveis na microbiota intestinal (FARNWORTH et al., 1992, KULLEN et al., 1998, MITSUOKA, 1996, SILVA; NÖRNBERG, 2003, STRICKLING et al., 2000, SUNVOLD et al., 1995).

A partir destes estudos, foi constatado que apesar de existirem vários compostos resistentes à digestão por ácidos, sais e enzimas produzidos pelo organismo animal, mas potencialmente fermentáveis (celulose, hemiceluloses, amido, oligossacarídeos, etc), nem todos agiam como estimuladores do desenvolvimento de microrganismos benéficos no trato gastrointestinal, ou seja, o fato de serem não digestíveis, mas fermentáveis, não significava que iriam atuar como prebióticos (MACFARLANE; CUMMINGS, 1999). Neste contexto, os oligossacarídeos não digestíveis (ONDs) têm sido preferencialmente usados como prebióticos devido a sua maior seletividade fermentativa (MOSENTHIN; BAUER, 2000).

A maioria dos ONDs são produtos comerciais obtidos por hidrólise parcial, ácida ou enzimática de polissacarídeos ou por reações de transglicosilação (LEWIS, 1986). No entanto, esses compostos podem ser obtidos diretamente de sua fonte natural, como vegetais, leite e parede celular de leveduras. Nesse caso, os alimentos usados na formulação das dietas devem fornecer níveis de ONDs suficientes para garantir a sua atuação como agentes prebióticos (MACFARLANE; CUMMINGS, 1999).

2.5) Leveduras e seus Derivados

Nas décadas de 70/80 nos Estados Unidos e Europa, havia grande preocupação das autoridades no tocante ao surgimento de resistência bacteriana devido ao uso indiscriminado e abusivo de antibióticos. No Brasil, a partir de 1992, foi proibido o uso de vários antibióticos em ração animal, o que motivou a pesquisa para o desenvolvimento de aditivos alimentares naturais (BIOTECNAL, s.d.).

O Brasil é o maior produtor mundial de álcool etílico a partir da cana-de-açúcar, com uma produção estimada de mais de 20 bilhões de litros anuais (ÚNICA, 2008). O processo de produção de etanol utiliza a levedura *Saccharomyces cerevisiae* como agente de fermentação, sendo que nas destilarias de álcool são gerados um excedente da ordem de 20 a 30 Kg de biomassa por m³ de álcool produzido. Todo esse “resíduo” era destinado à

alimentação bovina, mas há alguns anos este quadro vem sendo revertido, pois a biomassa de levedura em sua forma íntegra ou de seus derivados, além de apresentar elevado valor nutritivo, possui baixo custo de produção e tem sido amplamente utilizada, não somente em ração animal, mas também como ingrediente na formulação de uma ampla gama de produtos alimentícios destinados à alimentação humana (DZIEZAK, 1987a, DZIEZAK, 1987b, HALÁSZ; LÁSZTITY, 1991).

Leveduras autolisadas e extrato de leveduras são tradicionalmente utilizados na indústria de alimentos como flavorizante e suplemento nutritivo, componentes de sopas e produtos cárneos, e também na alimentação humana como aditivo de excelente qualidade nutricional, principalmente como fonte protéica (entre 45 e 65%), de sais minerais, vitaminas do complexo B (B₁, B₂, B₆, ácido pantotênico, niacina, ácido fólico e biotina) e como fonte de carboidratos (CABALLERO-CÓRDOBA; SGARBIERI, 2000, PÁDUA; OLIVEIRA; SGARBIERI, 2000, SGARBIERI et al., 1999, VILELA et al., 2000a, 2000b).

O extrato de levedura compreende o material solúvel do autolisado, incluindo proteínas, peptídeos, aminoácidos livres, nucleotídeos, oligossacarídeos e minerais (HALÁSZ; LÁSZTITY, 1991). Por outro lado, a fração insolúvel composta principalmente de parede celular é rica em mananoproteínas, β -glucanas e mananas, os quais podem ser utilizados como prebióticos na alimentação animal (SANTUCCI et al., 2003b).

Derivados de levedura são produtos obtidos por meio do processamento de células íntegras, obtendo-se um autolisado originado do rompimento das células por autólise mecânica ou enzimática, liberando o conteúdo citoplasmático (FREIMUND et al., 2003). Por outro lado, a obtenção da parede celular composta de inúmeros oligossacarídeos de interesse comercial se dá pela centrifugação do hidrolisado (SGARBIERI et al., 1999).

2.5.1 Parede Celular de Leveduras

A parede celular da levedura *Saccharomyces cerevisiae* perfaz cerca de 15 a 25% do peso seco da célula (CABIB et al., 1997), sendo formada por três componentes principais: glucanas (58%), mananoproteínas (40%) e quitina, um polímero de β -1,4 N-acetilglucosamina (2%) (KLIS, 1994).

Aproximadamente 75% do peso seco da parede celular de leveduras é constituído de polissacarídeos. A Figura 1 representa uma porção esquemática da parede celular da

levedura *Saccharomyces cerevisiae* indicando as camadas de polissacarídeos dispostas individualmente (RUIZ-HERRERA, 1992, apud KOGAN; KOCHER, 2007).

Figura 1 - Porção da parede celular de *Saccharomyces cerevisiae* mostrando as camadas de polissacarídeos localizadas individualmente.

2.5.1.1 Glucanas

Glucanas, principal constituinte da parede celular de leveduras, são macromoléculas contendo blocos de glicose unidos por ligações glicosídicas $\beta(1 \rightarrow 3)$ e $\beta(1 \rightarrow 6)$, sendo conhecidas desta forma como β -glucanas. Frações de β -glucana (glucoligossacarídeos) atuam nos animais estimulando as células fagocíticas, enquanto que os mananoligossacarídeos impedem a colonização e proliferação de bactérias patogênicas. A combinação dessas frações reforça o sistema imunológico reduzindo a mortalidade de animais (MANNERS; MASON; PATTERSON, 1973).

A glucana encontrada em *Saccharomyces cerevisiae* consiste aproximadamente de 85% de $\beta(1 \rightarrow 3)$ -glucana e 3% de $\beta(1 \rightarrow 6)$ -glucana (MANNERS; MASON; PATTERSON, 1973). Glucoligossacarídeos atuam como um potente estimulador do sistema imune protegendo o organismo contra infecções virais, bacterianas e fúngicas, tumores, efeitos de radiação e imuno-supressão relacionada ao estresse (ADACHI et al., 1990, BOHN; BE MILLER, 1995, CIPÁK et al., 2001, KHALIKOVA et al., 2005). Estes oligossacarídeos também apresentam propriedades antioxidantes e potencial para remover radicais livres, além de reduzir o nível de colesterol LDL no organismo (KOGAN et al., 2005,

KOKASHIS et al., 1978, ROBBINS; SEELEY, 1977), bem como na habilidade para liberar citocinas, tais como, TNF- α a partir de macrófagos (MAJTÁN et al., 2005).

A ocorrência de glucanas do tipo $\beta(1 \rightarrow 6)$ na natureza é rara, sendo que geralmente as ligações glicosídicas deste tipo se encontram associadas com ligações do tipo $\beta(1 \rightarrow 3)$ em polímeros produzidos por algas, leveduras, fungos e bactérias (GIESE; BARBOSA; SILVA, 2003).

O mecanismo de ação de β -glucanas ainda não é conhecido, mas acredita-se que seja dependente da massa molecular do polissacarídeo, dos tipos de ligações glicosídicas e resíduos presentes, além de sua conformação espacial (FREIMUND et al., 2003).

Segundo Srobárová, Kogan e Eged (2005), β -D-glucoligossacarídeos obtidos a partir de parede celular de levedura, além de estimularem a imunidade da mucosa e prevenir o estresse oxidativo em suínos, também apresentam a capacidade de adsorver várias micotoxinas e, dessa maneira, inibir a ação tóxica dessas.

Segundo Medzhitov e Janeway (2000), a porção majoritária dos polissacarídeos formadores da parede celular de leveduras, β -D-glucanas e α -D-mananas, são reconhecidas pela capacidade de promover a modulação do sistema imunológico de vários organismos vivos, desde insetos até humanos, por meio de interações específicas com diferentes células imunocompetentes.

Segundo Brown (2006) e Willment et al. (2005), $\beta(1 \rightarrow 3)$ -glucanas tem a capacidade de mediar efeitos imunopotencializadores e efeitos de proteção por se ligarem a sítios específicos (receptores) de monócitos e/ou macrófagos e granulócitos, desencadeando uma cascata de eventos imunológicos. Dentre os vários efeitos obtidos podemos citar: estimulação de atividade na medula óssea, o que acarreta aumento da produção de monócitos e granulócitos, aumento de títulos de anticorpos, liberação de citocinas (incluindo IL-1, IL-2, IL-6 e TNF- α), produção de prostaglandina E_2 e liberação de enzimas lisossômicas.

A utilização de glucoligossacarídeos como imunoestimulante é uma alternativa promissora como forma de melhorar o sistema de defesa do animal. Vários estudos realizados com mamíferos atestam que esses oligossacarídeos presentes na parede celular de leveduras têm efeito imunoestimulante, melhorando a hematopoese (JENEY et al., 1997). Na aquicultura, tem-se verificado que diferentes espécies de levedura são capazes de melhorar a resposta imunológica e o crescimento de várias espécies de peixes (LI; GATLIN III, 2003a).

Marques et al. (2006) submeteram larvas de camarão ao desafio com duas espécies de *Vibrio*, *V. campbellii* e *V. proteolyticus*, e constataram que a suplementação dessas larvas com 20 mg de β -glucana de *Saccharomyces cerevisiae* exerceu efeito supressor sobre as duas espécies de bactéria utilizadas no estudo. Segundo os autores, β -glucana tem a capacidade de estimular o sistema imunológico de larvas de camarão e, dessa maneira, inibir o crescimento ou a atividade destes patógenos.

Misra et al. (2006) avaliaram o efeito da administração de diferentes níveis de β -glucana sobre a imunidade, crescimento e sobrevivência de *Labeo rohita* durante 56 dias de tratamento quando esse foi desafiado com *Aeromonas hydrophila* e *Edwardsiella tarda*. Os resultados mostraram que a suplementação de 100, 250 e 500 mg de β -glucana por quilo de dieta melhorou o sistema imunológico dos peixes, evidenciado pelo aumento da atividade de células fagocíticas durante todo período experimental. No entanto, este resultado foi mais expressivo durante os primeiros 42 dias de tratamento quando se utilizou 250 mg de β -glucana por quilo de dieta. Esta mesma dose exerceu o maior efeito protetor contra os patógenos quando comparado às outras dietas. Adicionalmente, a ingestão de 250 e 500 mg de β -glucana por quilo de dieta propiciou os melhores resultados em termos de taxa de crescimento específico e taxa de conversão alimentar.

Segundo Xiao, Trincado e Murtaugh (2004), a administração oral de β -D-glucoligossacarídeos ocasionou aumento da liberação de células T interferon-gama em suínos, o qual resultou em aumento da proteção contra vírus que causam a síndrome respiratória e reprodutiva. Eicher et al. (2006) e Li et al. (2006) também constataram aumento da resistência de porcos e leitões recém-nascidos contra endotoxinas bacterianas quando esses foram alimentados com β -D-glucoligossacarídeos.

2.5.1.2 Mananoproteínas

As mananoproteínas estão localizadas na parte externa da parede celular de leveduras e são macromoléculas contendo blocos de manose unidos por ligações glicosídicas α -1,2, α -1,3 e α -1,6, que estão covalentemente ligadas a peptídeos formando glicopeptídeos (KAPTEYN et al., 1999a).

A camada de mananoproteínas tem a função de proteger a célula contra injúrias externas e é responsável pela porosidade da parede celular, enquanto que a camada de glucana, localizada internamente à camada de mananoproteína, é responsável pela estrutura

da parede celular perante choques mecânicos e desequilíbrio osmótico (CABIB et al., 1997).

Cabib et al. (1997) sugeriram que polissacarídeos e mananoproteínas estariam interligados por ligações cruzadas e que a $\beta(1 \rightarrow 3)$ -glucana e quitina, estariam conectadas por uma ligação $\beta(1 \rightarrow 4)$ entre um grupo redutor final de N-acetilglucosamina da quitina e um grupo não redutor da glicose presente na glucana. Um outro complexo estudado apresentava um grupo central de mananoproteína, em que a quitina e a $\beta(1 \rightarrow 3)$ -glucana estariam conectadas preferencialmente a cadeias curtas de $\beta(1 \rightarrow 6)$ -glucanas. Há evidências de que as mananoproteínas estariam retidas na parede celular por ligações indiretas com as $\beta(1 \rightarrow 3)$ -glucanas e ligadas preferencialmente a cadeias curtas de $\beta(1 \rightarrow 6)$ -glucanas e provavelmente a porções residuais de glicosilfosfatidilinositol.

Segundo Shane (2001), apud Albino et al. (2006), os benefícios de mananoligossacarídeos (MOS) obtidos de parede celular de levedura baseiam-se em propriedades específicas, que incluem a modificação da microbiota intestinal e a estimulação do sistema imune. Estes compostos possuem características que impedem a colonização intestinal de microrganismos enteropatogênicos, por aderirem às fímbrias bacterianas, bloqueando com isso a adesão das bactérias patogênicas à superfície intestinal.

Spring et al. (2000) submeteram frangos de corte ao desafio com duas espécies de *Salmonella* e encontraram menores concentrações destas bactérias no trato intestinal de aves suplementadas com MOS em relação ao tratamento controle. Segundo os autores, MOS atua como receptor se ligando as glicoproteínas presentes na superfície das células epiteliais e tornando-as indisponíveis para a aderência de espécies de *Salmonella*.

Segundo Krizková et al. (2001), MOS obtido de parede celular de levedura apresenta atividade antioxidante e antimutagênica quando incluído na dieta de suínos, enquanto que uma preparação similar obtida de outra cepa de levedura industrial, *Candida utilis*, revelou atividade antimutagênica, antigenotóxica e anticancerígena (MIADOKOVÁ et al., 2006). Pesquisas conduzidas por Dawson e Pirvulescu (1999) e Finucane (1999), demonstraram a capacidade de MOS em exercer efeito supressor sobre outras bactérias patogênicas, como *Salmonella*, *Clostridium* e *Campylobacterium*.

Segundo estudos conduzidos por Spring et al. (2000), a adição de MOS na dieta de frangos de corte reduziu a concentração de *Salmonella typhimurium* 29E no ceco dessas aves.

Conforme Flickinger e Fahey (2002), a inclusão de 1 g/dia de MOS na dieta de cães resultou em aumento significativo da concentração de linfócitos e de IgA no sangue desses animais quando comparado ao grupo controle.

Torrecillas et al. (2007) avaliaram o efeito da inclusão de Bio-Mos[®], um mananoligossacarídeo derivado da parede celular de uma cepa selecionada de *Saccharomyces cerevisiae* (Alltech, Inc. – USA), na dieta de “sea bass” (*Dicentrarchus labrax*). Os resultados mostraram que a inclusão de 0,2 e 0,4% de Bio-Mos[®] na alimentação destes peixes durante 67 dias resultou em aumento significativo do crescimento e ativação do sistema imune quando comparado ao grupo de peixes que receberam uma dieta basal. Em outro experimento, Torrecillas et al. (2007) infectaram os peixes com *Vibrio alginolyticus* e após 21 dias da infecção foi constatado aumento de 33% do número de patógenos no grupo de peixes que se alimentaram de uma dieta basal quando comparado ao grupo de peixes que receberam 0,4% de Bio-Mos[®] na dieta.

Li e Gatlin III (2005) suplementaram híbridos de “striped bass” durante 21 semanas com Grobionic[®]-A, um composto prebiótico constituído de uma mistura de levedura de cervejaria parcialmente autolisada, componentes da indústria de laticínios e produtos secos de fermentações, e Brewtech[®], uma levedura de cervejaria parcialmente autolisada. Os resultados mostraram que os peixes tiveram aumento do ganho de peso quando suplementados com 2% de Grobionic[®]-A e 2% de Brewtech[®] em comparação ao grupo controle durante as primeiras 12 semanas de alimentação. Em outro experimento, os autores submeteram os híbridos ao desafio com uma espécie de *Mycobacterium marinum* e constataram redução de 80% de mortalidade no grupo de peixes que receberam 2% de Grobionic[®]-A na dieta quando comparado aos 70% de redução obtida com os outros tratamentos ao final de 21 semanas de alimentação.

Ai et al. (2007) avaliaram o efeito da inclusão de diferentes níveis de $\beta(1 \rightarrow 3)$ -glucana na dieta de “yellow croaker” (*Pseudosciaena crocea*) no tocante à resposta imune inata e ao efeito contra infecções ocasionadas por *Vibrio harveyi*. O tratamento foi conduzido por um período de oito semanas e os resultados mostraram que $\beta(1 \rightarrow 3)$ -glucana ao nível de 0,09% aumentou significativamente o crescimento, melhorou os parâmetros imunológicos, tais como, a porcentagem de fagocitose e “respiratory burst” (liberação de espécies reativas – radicais superóxido e peróxido de hidrogênio a partir de diferentes tipos de células) e protegeu os peixes contra infecções bacterianas. Por outro lado, este mesmo resultado não foi constatado quando se utilizou $\beta(1 \rightarrow 3)$ -glucana ao nível de 0,18%. Diante

do exposto, os autores concluíram que a concentração do composto prebiótico utilizado como suplemento na alimentação de “yellow croaker” é fator de suma importância quando esse é administrado via oral por tempo prolongado.

Segundo estudos conduzidos por Montero et al. (2005), apud Torrecillas et al. (2007), a adição de uma mistura contendo MOS e glucoligosacarídeos de β -glucana na alimentação de “sea bass” durante 60 dias propiciou aumento na resistência ao estresse e ativação de macrófagos.

Carpa comum (*Cyprinus carpio*) e truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) apresentaram aumento significativo do crescimento, redução considerável do índice de mortalidade e aumento dos níveis de anticorpos quando foram suplementadas com MOS na dieta (STAYKOV, 2004, apud Torrecillas et al. 2007).

Dimitroglou e Davies (2004), apud Torrecillas et al. (2007), conduziram um estudo com larvas de *Diplodus sargus* e constataram que a suplementação de MOS na dieta foi responsável pelo aumento da área de absorção de nutrientes no intestino delgado e por aumento da resistência ao estresse.

Em estudo conduzido com cães de diferentes raças acometidos de gastroenterite, Gouveia et al. (2006) avaliaram a capacidade de MOS fosforilado em inativar *Escherichia coli* presente nas fezes destes animais. Os resultados mostraram que a suplementação da dieta com 2 g de Bio-Mos⁷ /animal/dia eliminou *Escherichia coli* em 86% dos cães, enquanto que no grupo de animais alimentados com antibióticos a redução do patógeno foi constatada em apenas 25% dos animais. Dessa maneira, os autores concluíram que Bio-Mos⁷ é efetivo no controle de *Escherichia coli*, sendo indicado como tratamento adjuvante nas gastroenterites.

Segundo Shane (2001), apud Albino et al. (2006), glucomananas podem atuar como receptores para toxinas sintetizadas pelos próprios patógenos. Estas são capazes de se ligar seletivamente e inativar as micotoxinas no lúmen intestinal.

Dvorska et al. (2003) avaliaram o efeito da adição de MycosorbTM, um glucomanano modificado obtido de parede celular de levedura, sobre a gema do ovo e fígado de codornas depois da inclusão de aurofusarina na dieta. As aves foram divididas em três grupos de acordo com a composição da dieta: grupo 1 - dieta balanceada à base de milho e soja, grupo 2 – dieta suplementada com aurofusarina e grupo 3 – dieta suplementada com aurofusarina mais MycosorbTM. Os resultados mostraram que as aves pertencentes ao grupo 3 apresentaram redução da concentração de ácidos graxos

poliinsaturados na gema do ovo e redução da concentração de α e γ tocoferol e tocotrianol (compostos ricos em vitamina E) no fígado de codornas recém-nascidas. Estes resultados permitiram concluir que o glucomanano modificado tem a capacidade de atuar como receptor para a aurofusarina e, desta forma, esta é inativada e eliminada.

Em estudo conduzido com ratos, Madrigal-Bujaidar et al. (2002), apud Kogan e Kocher (2007), constataram que MOS tem a capacidade de reprimir a atividade tóxica causada pela aflatoxina B₁, e que este fato possivelmente esteja relacionado à capacidade que MOS apresenta em interagir com os radicais tóxicos presentes nessa toxina.

Segundo Baptista et al. (2004), quando parede celular de levedura foi adicionada na alimentação de aves domésticas juntamente com aflatoxina B₁, ficou evidenciada redução do efeito da toxicidade quando comparado ao grupo de aves que receberam uma dieta basal.

Em estudo conduzido por Devegowda et al. (1996), apud Shetty, Jespersen (2006), verificou-se que parede celular de levedura e MOS modificado, derivado de células de *Saccharomyces cerevisiae*, utilizados como suplemento alimentar na dieta de aves domésticas, apresentaram 77% e 95% de afinidade por aflatoxina, respectivamente. Além disso, estes suplementos alimentares também revelaram alta afinidade por zearalenona e fumonisina B₁, porém, pouca afinidade por desoxinivalenol.

Glucomanano modificado derivado de células de *Saccharomyces cerevisiae* foi capaz de reduzir os efeitos tóxicos provocados por ocratoxina, toxina T-2 e aflatoxina em aves domésticas (RAJU; DEVEGOWDA, 2000) e toxinas de *Fusarium* em cavalos (RAYMOND et al., 2003).

Em estudo posterior, Karaman et al. (2005) confirmaram que a suplementação da dieta de frangos de corte com glucomanano modificado propiciou redução de aflatoxicoses.

Baseado em estudos de difração de raios-X e ressonância magnética nuclear, Yiannikouris et al. (2004) avaliaram possíveis interações entre β -D-glucanas e zearalenona. Os resultados mostraram que a conformação tridimensional das cadeias de β -D-glucanas favorece a ligação à toxina e que esta associação é estabilizada pela presença de ligações de hidrogênio e interações de Van Der Waals.

Yiannikouris et al. (2004d) avaliaram a capacidade de β -D-glucanas em adsorver zearalenona em diferentes condições de pH no trato digestivo humano. Os resultados mostraram que β -D-glucanas apresentaram maior afinidade pela toxina em pH ácido e

neutro (64-77%). Uma possível explicação pela falta de afinidade de β -D-glucanas pela toxina em pH alcalino pode ser devido ao fato de que nessas condições ocorra predomínio de uma associação menos empacotada, caracterizada por uma estrutura na forma de hélices simples distribuídas ao acaso em detrimento da conformação tridimensional.

Bio-Mos[®] e MTB100[®], duas preparações prebióticas comerciais obtidas a partir do processamento da parede celular de *Saccharomyces cerevisiae* e atualmente comercializadas pela Alltech Inc. (Nicholasville, KY), apresentaram resultados positivos quando incluídas como suplemento na alimentação de porcos, dentre os quais, aumento do ganho de peso e proteção contra infecções bacterianas em leitões desmamados (MIGUEL et al., 2004, ROZEBOOM et al., 2005).

Segundo White et al. (2002), a administração de Bio-Mos[®] na alimentação de porcos desmamados ocasionou redução de infecções causadas por *Escherichia coli* e *Salmonella spp.*

Em estudos conduzidos com coelhos, Mourão et al. (2006) analisaram os efeitos da administração de Bio-Mos[®] na dieta desses animais. Os resultados mostraram que coelhos que receberam 1 g de MOS/Kg de dieta exibiram aumento da concentração de ácidos orgânicos de cadeia curta no ceco, melhoria da taxa de conversão alimentar e redução da mortalidade quando comparado ao grupo controle. Quando foi utilizado 2 g de MOS/Kg de dieta, verificou-se aumento da altura das vilosidades do intestino delgado e, consequentemente, aumento da área de absorção de nutrientes. Adicionalmente, a contagem de coliformes e enterococos no ceco foi reduzida quando os coelhos foram alimentados com 1,0, 1,5 e 2,0 g de MOS/Kg de dieta em comparação ao grupo controle.

Com o objetivo de testar a capacidade de Bio-Mos[®] em se ligar à lectina bacteriana, Kogan e Kocher (2007) conduziram testes de aglutinação *in vivo* (desenvolvidos segundo metodologia descrita por Spring et al., 2000) utilizando esta preparação prebiótica com 258 cepas patogênicas de quatro gêneros diferentes de bactéria que foram fornecidas por veterinários de diferentes países do mundo. Os resultados dos testes estão representados na Tabela 1 abaixo.

Estes resultados demonstram que MOS foi eficaz contra 56% das cepas bacterianas testadas, destacando-se os patógenos *E. coli*, *S. enteritidis*, *S. typhimurium* e *Clostridium spp* (KOGAN; KOCHER, 2007).

Tabela 1 – Aglutinação de bactérias patogênicas por Bio-Mos®

Bactéria	Nº de cepas testadas	Nº de cepas aglutinadas	% de aglutinação
<i>Escherichia coli</i>	143	92	64
<i>Salmonella</i> spp.	46	31	67
<i>Salmonella enteritidis</i>	7	6	86
<i>Salmonella typhimurium</i>	10	7	70
<i>Clostridium</i> spp.	5	4	80
<i>Campylobacter</i> spp.	7	1	14
Total	258	145	56

Newman (2006), apud Kogan e Kocher (2007), utilizando o método do coeficiente de velocidade de agregação (Aggregation rate coefficient – ARC), comparou a capacidade de aglutinação de vários patógenos entéricos por Bio-Mos® e outros compostos que continham manose em suas formulações. Os resultados demonstraram eficácia superior de Bio-Mos® quando comparado aos demais compostos.

MTB100® proporcionou melhoria na capacidade de adsorção de micotoxinas quando comparado com adsorventes tradicionais à base de argila-silicato e alumínio-silicato, resultando em melhoria no desempenho e saúde de porcas pós-fase de desmama (HARVEY, 2000, apud KOGAN; KOCHER, 2007), melhoria da fertilidade de porcas que receberam zearalenona na alimentação (FRIO et al., 2006, GUERRERO; BANEGAS, 2001, apud KOGAN; KOCHER, 2007) e reprimiu efeitos maléficos ocasionados por micotoxinas produzidas por espécies de *Fusarium* sobre o desempenho e metabolismo de porcas gestantes (DIAZ-LLANO; SMITH, 2005, 2006, apud KOGAN; KOCHER, 2007).

Estudando a importância da parede celular de levedura (*Saccharomyces sp.*) como fonte de fibra na alimentação de ratos Wistar, Pádua et al. (2000) evidenciaram que a adição de 10 ou 20% de parede celular promoveu aumento da velocidade de trânsito do conteúdo intestinal e redução nos níveis de triacilgliceróis séricos.

Macari e Maiorka (2000) evidenciaram efeitos positivos sobre a mucosa intestinal de frangos quando receberam parede celular de *Saccharomyces cerevisiae* na dieta. Os resultados mostraram aumento significativo na altura dos vilos nos três segmentos do intestino delgado, sendo que este efeito foi mais acentuado na primeira semana de vida. De modo geral, estes resultados demonstraram que a adição de parede celular promoveu aumento na área de absorção de nutrientes da mucosa intestinal, o que pode ser fundamental para um melhor desempenho animal.

A Saf-Agri, empresa pertencente ao grupo Lesaffre (maior produtor de levedura e derivados do mundo), fornece produtos inovadores para os fabricantes de ração animal,

entre os quais incluem o BIOSAF[®], Procreatin-7[®] e SAF-Levina[®] APR. O primeiro é um concentrado de células de levedura viva *Saccharomyces cerevisiae*, elaborado para ser incorporado em rações peletizadas devido a uma tecnologia única de cobertura natural que proporciona excelente resistência ao choque térmico durante o processo de peletização. Procreatin-7[®] é uma cepa de *Saccharomyces cerevisiae* utilizada em qualquer ração não peletizada. É muito solúvel em água, sendo efetivo nos sistemas de bebedouro de aves ou nos substitutos de leite. Em contrapartida, SAF-Levina[®] APR é um concentrado de levedura em pó (*Saccharomyces cerevisiae*) inativado por tratamento térmico e desenvolvido para uso em rações animais e alimentos para animais de estimação e como meio de cultura para pesquisas. Além disso, apresenta características adequadas de palatabilidade e é uma excelente fonte de proteína e vitaminas do complexo B. Um outro produto fabricado atualmente pelo grupo Lesaffre é a levedura mineral, obtida por desidratação e inativado por “spray-dryer”, que foi desenvolvido para fornecer minerais orgânicos de alta biodisponibilidade em ração e alimentos para animais de estimação (SAF-AGRI, s.d.).

A Biorigin, empresa pertencente ao Grupo Zillo Lorenzetti, que implantou recentemente uma unidade para processamento de levedura e derivados, lançou no mercado três novos produtos com propriedades prebióticas. São eles: ActiveMos, Betamune e Selemax . O primeiro é um aditivo prebiótico para alimentação animal rico em MOS, extraído da parede celular da levedura *Saccharomyces cerevisiae* que apresenta a capacidade de aglutinar patógenos atuando como modulador da microbiota intestinal. O segundo é um aditivo prebiótico também destinado à alimentação animal rico em glucoligossacarídeos que apresenta ação benéfica sobre o sistema imunológico dos animais e como potencializador da resposta à vacinação de rebanhos e de animais de estimação. O Selemax é constituído de levedura inativa desidratada que contém níveis elevados de selênio orgânico e cujo benefício está relacionado à melhoria no desempenho dos animais por ser um agente oxidante e anticancerígeno, além de contribuir positivamente para o sistema imunológico (BIORIGIN, s.d.).

2.6) Hidrólise Enzimática de Células de Leveduras

O interesse pelas enzimas líticas teve início na década de 60, quando muitas espécies de bactérias apresentavam resistência à lisozima, que na época era utilizada para a

elucidação da estrutura química da parede celular desses microrganismos. Em 1968, Ward e Perkins sugeriram que para a investigação da parede celular e dos componentes intracelulares das bactérias resistentes à lisozima, havia a necessidade do isolamento de enzimas mais apropriadas para este fim.

Enzimas líticas são produzidas por muitas espécies de microrganismos, como bactérias, fungos e leveduras, sendo que a maioria necessita da presença de indutores para a síntese das respectivas enzimas (FLEURI; SATO, 2005).

Segundo Fleuri e Sato (2005), as enzimas líticas apresentam inúmeras aplicações, como na preparação de protoplastos, transformação de leveduras para isolamento de produtos de recombinação de DNA, no estudo da composição e mecanismo da síntese de parede celular, na digestão de polissacarídeos e proteínas de parede celular de leveduras para obtenção de proteínas intracelulares e pigmentos, na obtenção de extrato de levedura, no tratamento de massa celular de levedura residual para ração animal e no tratamento de doenças provocadas por leveduras e fungos.

Muitas enzimas microbianas lisam a parede celular de leveduras, entre elas, β -1,3 glucanases, β -1,6 glucanases, mananases, proteases e quitinases. Essas enzimas agem sinergicamente na lise da parede celular, mas somente duas são essenciais para o rompimento da célula: a protease, que degrada a camada externa de mananoproteína e a β -1,3 glucanase, que degrada a camada interna de glucana (ASENJO et al., 1985; SCOTT, SCHEKMAN, 1980; ZLOTNIK et al., 1984).

A lise da parede celular de levedura é primeiramente causada pela ação das enzimas protease e β -1,3 glucanase. As enzimas β -1,6 glucanase e mananase participam na solubilização dos fragmentos da parede. Com a lise celular, há liberação de um grande número de compostos associados a diferentes organelas 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 mecânicos, ou ainda, uma combinação destes, podem ser usados para a obtenção seletiva de compostos celulares que podem ser recuperados e purificados (ASENJO et al., 1985).

Hunter e Asenjo (1988) apresentaram um modelo para explicar que a lise enzimática da célula de levedura acontece em passos progressivos de ruptura da estrutura celular, começando pela superfície externa e prosseguindo pelas estruturas celulares dentro do citoplasma.

Prokopakis e Liu (1997) relataram que a lise de parede celular de levedura ocorre em três etapas. Na primeira, as camadas de mananoproteína e glucana são digeridas; na segunda, a célula se rompe devido à diferença de pressão osmótica liberando o material intracelular. Por fim, este último é digerido pelas enzimas ainda existentes na solução.

O sistema de enzimas líticas sintetizado por *Oerskovia xanthineolytica* consiste de uma β -1,3-glucanase e uma protease, as quais atuam sinergicamente na lise de paredes celulares. A hidrolase apresenta afinidade por β -glucana, enquanto que a protease se associa primeiramente à manana e atua sobre a porção protéica da camada de mananoproteína, sendo que a manana liberada atua como inibidor da síntese da protease. Segundo os autores, a camada de β -glucana somente começa a sofrer lise pela β -1,3-glucanase após a camada de mananoproteína ser degradada pela protease, uma vez que esta se situa externamente àquela (SCOTT; SCHEKMAN, 1980).

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

Segundo Macwilliam (1970), há diferenças na lise de parede celular de leveduras em função dos estágios de crescimento celular e dos gêneros a que pertencem, sendo que células jovens são mais susceptíveis à lise do que células em fase estacionária de crescimento. Os autores reportaram ainda que β -1,3-glucanase pode não lisar, lisar parcialmente ou lisar completamente a parede celular de diferentes espécies de levedura, sugerindo a existência de sinergismo entre as enzimas líticas.

Kaneko, Kitamura e Yamamoto (1973) verificaram que a susceptibilidade de leveduras à ação enzimática varia com o gênero e com a espécie. Em estudo conduzido com leveduras do gênero *Candida* e *Saccharomyces*, estes autores relataram que quando essas células foram submetidas ao tratamento com 2-mercaptoetanol, as cepas de *Saccharomyces* se mostraram tão susceptíveis quanto às de *Candida*. Neste estudo, os autores constataram ainda que as células de levedura são mais facilmente lisadas enzimaticamente após tratamento térmico e que leveduras na fase exponencial de crescimento também apresentam maior susceptibilidade à lise do que células em fase estacionária.

Diferentes cepas de microrganismos foram isoladas a partir de lodo ativado de tanques de sistema de tratamento de água residuária de indústrias de alimentos e de bebidas alcoólicas, sendo que dez dessas, destacando-se *Bacillus* sp., foram caracterizadas como boas produtoras de β -1,3-glucanases e proteases líticas (YAMAMOTO et al., 1984).

Segundo Rowley e Bull (1977), *Arthrobacter* sp. produz um complexo enzimático extracelular constituído de β -1,3-glucanase, protease, mananase e mananohidrolase, com atividade lítica sobre células viáveis de *Saccharomyces fragilis*. Observou-se que as atividades de β -1,3-glucanase e protease foram obtidas durante a fase exponencial de crescimento, enquanto que a síntese de mananase e mananohidrolase foi induzida durante o início da fase estacionária.

Guilloux-Benatier et al. (2000) reportaram que *Oenococcus oeni* é capaz de produzir uma β -1,3-glucanase durante a fase exponencial de crescimento, sendo que a maior atividade da enzima ocorreu quando a bactéria foi cultivada em meio de cultivo contendo moléculas glicosídicas de parede celular de levedura como indutor. Adicionalmente, foi constatado que β -1,3-glucanase lisou células viáveis e mortas de *Saccharomyces cerevisiae*, sendo esta lise claramente evidenciada nas fases exponencial e estacionária de crescimento da levedura.

Santos (2000), apud Fleuri e Sato (2005), reportou que *Cellulosimicrobium cellulans* 191 sintetizou maior quantidade de β -1,3-glucanase, enquanto que protease foi produzida em grande quantidade por *Oerskovia* sp. Adicionalmente, foi constatado que a maior produção de β -1,3-glucanase ocorreu em meio de cultivo rico em parede celular de levedura extraída mecanicamente como indutor e que a maior produção de protease foi evidenciada em meio contendo levedura autoclavada, lavada e liofilizada.

A produção de β -1,3-glucanases e proteases líticas por *Cellulosimicrobium cellulans* 191, em meio de cultivo contendo diferentes indutores, bem como a aplicação destas enzimas na lise de leveduras foram estudadas por Fleuri (2003). A maior produção de protease lítica foi obtida em meio de cultivo contendo 8% de levedura seca. Por outro lado, a maior produção de β -1,3-glucanases foi evidenciada quando essa mesma cepa foi crescida em meio contendo 1% de parede celular de levedura. As preparações de β -1,3-glucanases obtidas do sobrenadante do meio fermentativo foram capazes de lisar células de *Saccharomyces cerevisiae* KL-88, *Candida glabrata* NCYC 388, *Kluyveromyces marxianus* NCYC 587, *Hansenula mrakii* NCYC 500, sendo que as duas últimas se mostraram mais susceptíveis à lise enzimática quando comparadas com *Saccharomyces*

cerevisiae KL-88, ao passo que *Candida glabrata* NCYC 388 apresentou maior resistência à atividade de lise por β -1,3-glucanases.

Soares (2002) estudou a produção de β -1,3-glucanase lítica por *Cellulomonas cartae* 191 em diferentes meios de cultivo contendo diferentes tipos de indutores. O meio de Scott e Schekman modificado foi àquele no qual houve maior produção enzimática, sendo composto por 1% de parede celular de levedura extraída mecanicamente em Dynomill em tampão fosfato de potássio 0,2 M, pH 7,5, 0,20% de sulfato de amônio e 0,02% de sulfato de magnésio hepta-hidratado.

Com o objetivo de verificar o efeito lítico de β -1,3-glucanases e proteases purificadas dos sobrenadantes obtidos da fermentação de *Oerskovia xanthineolytica* sobre parede celular de leveduras, Andrews e Asenjo (1987a) testaram-nas combinadas. Os resultados mostraram que essas enzimas, quando atuam sinergicamente, são capazes de lisar e romper completamente as células de levedura. Em estudo paralelo, estes autores constataram maior produção de enzimas líticas quando *Oerskovia xanthineolytica* foi cultivada em sistema contínuo na presença de altas concentrações de indutor e baixa concentração de glicose, sugerindo que a síntese dessas enzimas esteja sujeita à repressão catabólica pela glicose. Adicionalmente, foi relatado que glucana de levedura é um potente indutor, uma vez que glucanase foi produzida com apenas 5 h de incubação e a atividade lítica obtida foi cerca de 10 vezes maior que no meio de cultivo contendo parede de leveduras.

Kitamura e Yamamoto (1972) relataram que *Arthrobacter luteus*, isolado de creme de levedura, cresceu em meio contendo células de levedura ou β (1 $\rightarrow$ 3)-glucanas e produziu enzimas com atividade lítica sobre leveduras. A preparação enzimática obtida foi denominada zimoliase e requeria polímeros lineares de glicose com ligações β (1 $\rightarrow$ 3) como substrato específico. Neste estudo, os autores evidenciaram que “pachyman” (β -1,3-glucana insolúvel) e glucana de levedura foram hidrolisados por este preparado a unidades de laminaripentaose.

A enzima exo-glucanase do tipo β (1 $\rightarrow$ 3)-D-glucana glucohidrolase, isolada de *Bacillus circulans*, hidrolisa β (1 $\rightarrow$ 3)-D-glucanas por sucessivas remoções de laminaribiose a partir de seus terminais não-redutores (KANZAWA; KURASAWA; KANEGAE, 1994).

Bacon et al. (1970) utilizaram parede celular de *Saccharomyces cerevisiae* como indutor para a produção de enzimas líticas por *Cytophaga johnsonii* e relataram atividade

de 0,16 U/mL de β -1,3-glucanase na presença de laminarina como substrato reacional após 1 h de incubação a 30°C.

Estudando os produtos de hidrólise obtidos pela ação lítica de β -1,3-glucanase produzida por *Aspergillus niger* sobre glucana da parede celular de leveduras, Kéri et al. (1991) evidenciaram a liberação de fragmentos de alta massa molecular (80 KDa) durante as primeiras horas de reação. Por outro lado, períodos de hidrólise superiores a 7 horas permitiram a liberação de fragmentos pequenos de glucana com massa molecular menor que 25 KDa.

Reese, Parrish e Mandels (1962), apud Giese, Barbosa e Silva (2003), relataram que a hidrólise da pustulana pela β -1,6-glucanase lítica produzida por diferentes espécies de fungos resultou na liberação de moléculas de gentiotetraose, gentiotriose, gentiobiose e glicose.

Pavlova e Tinyanova (1980) isolaram 23 cepas de microrganismos do solo com capacidade de sintetizar α -mananases extracelulares, dentre as quais, 10 foram selecionadas como maiores produtoras e identificadas de acordo como o gênero a que pertencem. Os sobrenadantes obtidos dos respectivos meios fermentativos foram avaliados no tocante à atividade lítica sobre células de *Saccharomyces cerevisiae* e *Candida tropicalis* e os resultados mostraram pouca atividade lítica de α -mananases (0-10% de lise) produzidas pela maioria das cepas selecionadas. Apenas α -mananase produzida por *Pseudomonas* sp. apresentou atividade lítica considerável sobre células de *Saccharomyces cerevisiae* e *Candida tropicalis*, 20-25% e 35-40% de lise, respectivamente. De acordo com esses resultados, os autores sugeriram que α -mananases são enzimas que devem atuar de maneira sinérgica com outras enzimas líticas (proteases e glucanases), tendo em vista a baixa ou quase nenhuma atividade lítica constatada.

Flavobacterium dormitator var. *glucanolyticae* foi isolada de amostra de solo e caracterizada como boa produtora de α -1,2-mananase e β -1,3-glucanase líticas. Como resíduos da ação de α -1,2-mananase sobre manana de diferentes espécies de *Saccharomyces*, foram obtidos manose, mananotriose e mananotetraose. Segundo Yamamoto e Nagasaki (1975a), a lise de α -1,2-mananase removeu unidades sucessivas de monossacarídeos com ligações α -1,2 a partir do terminal não-redutor da cadeia de manana. Foi relatado ainda que β -1,3-glucanase foi capaz de hidrolisar células de levedura liberando pequenos oligossacarídeos e que essa enzima atua preferencialmente sobre cadeias de sacarídeos de elevada massa molecular, apesar de que pequenos

oligossacarídeos como laminaritríose também podem ser hidrolisados (NAGASAKI et al., 1976).

Shimoi et al. (1991b) purificaram uma β -1,3-glucanase e duas proteases produzidas por *Rarobacter faecitabidus* e relataram que a hidrolase isolada não foi capaz de lisar células de levedura, porém, quando combinada com as proteases houve lise total.

Segundo Kitamura et al. (1974), o pH ótimo para lise de células viáveis de levedura por zimoliase se situa em torno de 7,0-7,5 e a temperatura ótima, 35°C. As enzimas se mantiveram razoavelmente estáveis em pH entre 5,0 e 11,0 nessa mesma temperatura, porém, quando incubadas a 50 e 60°C por 5 minutos, cerca de 70 e 100% da atividade foi perdida, respectivamente.

3) MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi conduzido nos Laboratórios de Fermentação do Grupo de Microbiologia Aplicada e Bioprocessos (GMBio) e de Probióticos do Departamento de Biotecnologia da Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo (EEL – USP).

3.1 Microrganismo e sua Manutenção

No presente trabalho, a cepa de *Bacillus licheniformis* E-44 foi gentilmente cedida pelo Grupo de Probióticos da Faculdade de Agronomia da Universidade de Matanzas – Cuba, isolada a partir de cama de frango e caracterizada como boa produtora de enzimas extracelulares. A cultura estoque foi armazenada sob refrigeração a 4°C em tubo de ensaio contendo meio de cultivo constituído de 10 g/L de glicose, 10 g/L de peptona bacteriológica, 6 g/L de cloreto de sódio, 2 g/L de caseína, 2 g/L de extrato de levedura e 15 g/L de ágar, pH 8,0.

3.2 Meios de Cultivo

Diferentes meios de cultivo foram avaliados com vistas a se determinar as melhores condições para crescimento celular e produção de enzimas extracelulares pela cepa em estudo.

3.2.1) Meio nº 1: 5g/L de peptona bacteriológica, 1 g/L de extrato de carne, 2 g/L de extrato de levedura e 5 g/L de cloreto de sódio, pH 7,4 (PÉREZ et al., 2007).

3.2.2) Meio nº 2: 50 g/L de melaço de cana-de-açúcar, 30 g/L de extrato de levedura, 1 g/L de KH_2PO_4 e 1 g/L de CaCl_2 , pH 8,0, esterilizado a 121°C por 15 minutos.

3.2.3) Meio nº 3: 10 g/L de caseína, 5g/L de peptona bacteriológica, 1 g/L de extrato de carne, 2 g/L de extrato de levedura, 5 g/L de cloreto de sódio, 0,2 M de tris-HCl pH 8,0 (PÉREZ et al., 2007 modificado).

3.2.4) Meio nº 4: 10 g/L de SafMannan[®] (“parede celular de levedura”), 5g/L de peptona bacteriológica, 1 g/L de extrato de carne, 2 g/L de extrato de levedura, 5 g/L de cloreto de sódio, 0,2 M de tris-HCl pH 8,0 (PÉREZ et al., 2007 modificado).

3.2.5) Meio nº 5: 10 g/L de Nutricell[®] Yeast (“levedura inativa seca”), 5g/L de peptona bacteriológica, 1 g/L de extrato de carne, 2 g/L de extrato de levedura, 5 g/L de cloreto de sódio, 0,2 M de tris-HCl pH 8,0 (PÉREZ et al., 2007 modificado).

3.2.6) Meio nº 6: 10 g/L caseína, 3 g/L extrato de levedura, 1,5 g/L KCl, 0,5 g/L K₂HPO₄ e 0,5 g/L KH₂PO₄, pH 8,0, proposto por Hadj-Ali *et al.* (2007).

3.2.7) Meio nº 7: 10 g/L de caseína, 10 g/L de extrato de malte, 10 g/L de polipeptona e 10 g/L de Na₂CO₃, pH 9,5, descrito por Potumarthi *et al.* (2007).

3.2.8) Meio nº 8: 30 g/L de caseína, 5 g/L de NaNO₃, 5 g/L de K₂HPO₄, 0,2 g/L de MgSO₄.7H₂O e 10 g/L de Na₂CO₃, pH 7,0, descrito por Al-Shehri *et al.* (2004).

Os meios de cultivo, com exceção do meio nº 2, bem como a solução de tris-HCl 0,2 M, foram preparados a partir de soluções estoque dos respectivos constituintes e autoclavados separadamente à 0,5 atm por 15 minutos.

3.3 Determinação do Crescimento Celular, Obtenção e Caracterização do Extrato Enzimático

3.3.1) Cultivo em Reator

Em conformidade com a metodologia desenvolvida pelo Grupo de Probióticos da Universidade de Matanzas – Cuba, uma alçada da cultura estoque da cepa de *Bacillus licheniformis* E-44 foi transferida para um tubo de ensaio contendo 5 mL do meio nº 1 e incubado a 40°C por 24 horas em estufa de cultura e bacteriologia série 410 ND. A partir desta suspensão de células foi procedido um novo repique na proporção de 1% para 125 mL do meio nº 2, contido em frasco Erlenmeyer de 250 mL, e posteriormente incubado em agitador rotatório tipo Shaker (New Brunswick Scientific Co. Inc., Edison, New Jersey,

USA) a 40°C sob agitação de 200 rpm por 24 horas. Em seguida, esse volume de inóculo foi transferido para um fermentador BIOFLO III de 1,25 L (New Brunswick Scientific Co. Inc., Edison, New Jersey, USA) contendo 1125 mL do meio nº 2 que foi incubado a 40°C por 48 horas sob agitação de 200 rpm, aeração de 2 vvm, pH 8,0, controlado pela adição de soluções de NaOH 5 M e HCl 5 M devidamente esterilizadas. Foram realizadas três repetições.

Amostras de 10 mL foram coletadas em diferentes tempos de fermentação, centrifugadas em centrífuga Jouan MR 18-12, sendo que o sedimentado foi lavado 2 vezes com água destilada para posterior determinação da biomassa celular e o sobrenadante armazenado em frascos de vidro com tampa rosqueável à 4°C para posterior quantificação das enzimas α -mananase, α -1,3-glucanase e protease. Estes ensaios foram realizados em duplicata.

3.3.2) *Cultivo em Frascos Erlenmeyer*

3.3.2.1) *Preparo do Inóculo*

Uma alçada da cultura estoque de *Bacillus licheniformis* E-44 foi transferida para um tubo de ensaio contendo 5 mL de meio nº1 e incubado a 40°C por 24 h para ativação das células. Posteriormente, procedeu-se um novo repique na proporção de 1% para 25 mL de meio nº 1 acrescido de tampão tris-HCl 0,2 M, pH 8,0 contidos em frascos Erlenmeyer de 125 mL. Em seguida, o frasco foi incubado em agitador rotatório tipo Shaker (New Brunswick Scientific Co. Inc., Edison, New Jersey, USA) a 40°C, 200 rpm por 12 horas, cuja suspensão celular foi empregada como inóculo.

3.3.2.2) *Avaliação do Efeito de Diferentes Indutores sobre o Crescimento Celular e Produção de Enzimas*

Uma alíquota de 2,5 mL (10%) do inóculo obtido conforme descrito no item 3.3.2.1, foi transferida para frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 22,5 mL dos meios nº 3, 4 e 5, com vistas a se avaliar o efeito da caseína, parede celular de levedura e levedura inativa seca como indutores da síntese das respectivas enzimas. Os frascos foram

incubados em shaker (New Brunswick Scientific Co. Inc., Edison, New Jersey, USA) a 40°C, 200 rpm por 48 horas, sendo os experimentos realizados com duas repetições.

Amostras de 10 mL foram coletadas em diferentes tempos de fermentação, centrifugadas em centrífuga Jouan MR 18-12, sendo o sedimentado lavado 2 vezes com água destilada para posterior determinação da biomassa celular e o sobrenadante armazenado em frascos de vidro com tampa rosqueável à 4°C para posterior quantificação das enzimas α -mananase, α -1,3-glucanase e protease, em duplicata.

3.3.2.3) Avaliação do Efeito do pH sobre o Crescimento Celular e Produção de Enzimas

Os ensaios foram realizados em duplicata em frascos Erlenmeyer de 125 mL em agitador rotatório tipo Shaker (New Brunswick Scientific Co. Inc., Edison, New Jersey, USA) a 200 rpm. Para tanto, foram adicionados assepticamente 2,5 mL de inóculo (3.3.2.1) aos frascos contendo 22,5 mL dos meios nº 3, 4 e 5, preparados em diferentes soluções tampão, a saber: 1) pH 5,5 : tampão acetato de sódio 0,2 M; 2) pH 7,0: tampão fosfato de potássio 0,2 M; 3) pH 8,5: tampão tris-HCl 0,2 M. Os frascos foram incubados a 40°C por 48 horas.

Amostras de 10 mL foram coletadas em diferentes tempos de fermentação, centrifugadas em centrífuga Jouan MR 18-12, sendo o sedimentado lavado 2 vezes com água destilada para posterior determinação da biomassa celular e o sobrenadante armazenado em frascos de vidro com tampa rosqueável à 4°C para posterior quantificação das enzimas α -mananase, α -1,3-glucanase e protease, e determinação do pH, em duplicata.

3.3.2.4) Avaliação do Efeito de Diferentes Meios de Cultivo sobre o Crescimento Celular e Produção de Enzimas

Os respectivos cultivos foram realizados em duplicata em frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 22,5 mL dos meios nº 6, 7 e 8, descritos no item 3.2, em agitador rotatório tipo Shaker (New Brunswick Scientific Co. Inc., Edison, New Jersey, USA), que foram inoculados assepticamente com 2,5 mL de inóculo (3.3.2.1) e incubados a 40°C, 200 rpm por 48 horas.

Amostras de 10 mL foram coletadas em diferentes tempos de fermentação, centrifugadas em centrífuga Jouan MR 18-12, sendo o sedimentado lavado 2 vezes com água destilada para posterior determinação da biomassa celular e o sobrenadante armazenado em frascos de vidro com tampa rosqueável à 4°C para posterior quantificação das enzimas α -mananase, α -1,3-glucanase e protease, em duplicata.

3.3.2.5) Avaliação do Efeito da Agitação sobre o Crescimento Celular e Produção de Enzimas

Alíquotas de 2,5 mL (10%) do inóculo (3.3.2.1) foram transferidas para frascos Erlenmeyer de 125 ml contendo 22,5 mL do meio nº 3, após o que foram incubados em diferentes velocidades de agitação (100, 200 e 300 rpm) em agitador rotatório tipo Shaker (New Brunswick Scientific Co. Inc., Edison, New Jersey, USA) a 40°C por 48 horas, sendo os experimentos realizados uma única vez.

Amostras de 10 mL foram coletadas em diferentes tempos de fermentação, centrifugadas em centrífuga Jouan MR 18-12, sendo o sedimentado lavado 2 vezes com água destilada para posterior determinação da biomassa celular e o sobrenadante armazenado em frascos de vidro com tampa rosqueável à 4°C para posterior quantificação das enzimas α -mananase, α -1,3-glucanase e protease, em duplicata.

3.3.2.6) Avaliação do Efeito da Aeração sobre o Crescimento Celular e Produção de Enzimas

Para se avaliar o efeito da aeração sobre o crescimento celular e produção de enzimas variou-se a relação volume de frasco e volume de meio nº 3. Para tanto, em frascos Erlenmeyer de 250 mL estabeleceu-se as seguintes relações em volume de inóculo: meio de cultivo: (2,5 + 25,0), (5,0 + 45,0), (7,5 + 67,5) e (10,0 + 90,0). Em seguida, os frascos foram incubados em agitador rotatório tipo Shaker (New Brunswick Scientific Co. Inc., Edison, New Jersey, USA) à 40°C, 200 rpm por 48 horas, sem repetições. O inóculo foi preparado por meio do cultivo da respectiva cepa em 25 mL de meio nº3 contido em frasco Erlenmeyer de 125 mL por 12 horas a 40°C.

Amostras de 10 mL foram coletadas em diferentes tempos de fermentação, centrifugadas em centrífuga Jouan MR 18-12, sendo o sedimentado lavado 2 vezes com

água destilada para posterior determinação da biomassa celular e o sobrenadante armazenado em frascos de vidro com tampa rosqueável à 4°C para posterior quantificação das enzimas α -mananase, α -1,3-glucanase e protease, em duplicata.

3.4 Métodos Analíticos

3.4.1) Determinação da Biomassa Bacteriana

O crescimento bacteriano foi determinado por espectrofotometria a 600 nm em espectrofotômetro Hitachi modelo U-2001. Após as fermentações, as respectivas amostras foram devidamente centrifugadas a 10000 x g por 20 minutos à 4°C em centrífuga Jouan MR 18-12, e a massa celular obtida foi então submetida a duas lavagens consecutivas com 10 mL de água destilada, seguida da ressuspensão no mesmo volume de água. Alíquotas de 1 mL foram diluídas devidamente para a leitura da absorbância e a concentração de células foi determinada por meio de uma curva padrão correlacionando a concentração de biomassa (0-2,0 g/L) com as respectivas leituras de absorbância.

3.4.2) Determinação da Atividade Enzimática

As amostras coletadas periodicamente de cada cultivo foram centrifugadas a 10000 x g em centrífuga Jouan MR 18-12 por 20 minutos à 4°C e o sobrenadante utilizado para a determinação das atividades enzimáticas.

3.4.2.1 Protease

A atividade de protease foi determinada de acordo com os métodos descritos por Kembhavi et al. (1993) modificado e Anson (1973).

1º método:

Uma alíquota de 0,5 mL de substrato (caseína 1% preparada em tampão tris-HCl 0,1 M, pH 8,0) foi adicionada em tubos tipo Eppendorf de 2,0 mL seguida de 0,5 mL de extrato enzimático devidamente diluído. A mistura reacional foi incubada a 50°C por 30

minutos em banho maria sorológico modelo IO118 e a reação interrompida pela adição de 0,5 mL de ácido tricloroacético (TCA 20%). Em seguida, a mistura foi deixada esfriar à temperatura ambiente por 15 minutos, centrifugada em microfuge™ 12 BECKMAN a 10000 x g por 15 minutos para a remoção do precipitado, e a absorbância do sobrenadante lida a 280 nm em espectrofotômetro. Para ajuste do aparelho foi preparado um tubo branco utilizando-se solução tampão de tris-HCl 0,1 M pH 8,0 em substituição ao substrato. Um outro controle (“branco da reação”) foi preparado pela adição sequencial de substrato, TCA 20% e extrato enzimático.

A curva padrão foi construída utilizando soluções de 0-500 µg/mL de tirosina. Uma unidade (U) de atividade proteolítica foi definida como sendo a quantidade de enzima requerida para liberar 1 µg de tirosina por mililitro em 1 minuto nas condições experimentais empregadas.

2º método:

Preparo da Caseína Desnaturada com Uréia

Foram pesados 2,2 g de caseína, a qual foi posteriormente dissolvida em 16 mL de solução de NaOH 0,5 N e 50 mL de água destilada, seguida da adição de 36 g de uréia. Esta suspensão foi colocada sob agitação durante 1 h para a solubilização da caseína e a ela adicionado 4 g de uréia, sendo que o pH foi ajustado para 7,5 com uma solução de ácido fosfórico 1 M. O volume foi completado com água destilada até 100 mL.

Atividade proteolítica

A reação foi iniciada adicionando-se 0,5 mL de extrato enzimático devidamente diluído a 2,5 mL de caseína desnaturada contida em tubo de centrífuga tipo Falcon, e a mistura pré-aquecida na temperatura do ensaio. Após incubação por 30 minutos à 50°C, a reação foi interrompida pela adição de 5 mL de ácido tricloroacético 5%, deixada esfriar por 30 minutos à temperatura ambiente e centrifugada a 3000 rpm por 10 minutos em centrífuga Excelsa® II modelo 206 BL para remoção do precipitado.

Uma alíquota de 0,5 mL do sobrenadante foi pipetado para um tubo de ensaio, seguido da adição sequencial de 1,5 mL de solução de NaOH 1 N, 0,5 mL de Reagente de

Folin diluído três vezes e 1,5 mL de água destilada. Após completa homogeneização dos reagentes, foi realizada a leitura da absorbância em espectrofotômetro à 650 nm. Para o preparo de um controle, foram seguidos os mesmos passos sequenciais do método, salvo da adição do extrato enzimático após a adição do TCA com vistas a se evitar a reação do substrato com o extrato enzimático.

A curva padrão foi construída partindo-se de uma solução estoque de 9,99 $\mu\text{mol/mL}$ de tirosina em solução de HCl 0,5 N. Após sucessivas diluições, alíquotas de 0,5 mL de cada diluição foram pipetadas para um tubo de ensaio e adicionados os seguintes reagentes em ordem sequencial: 1,5 mL de solução de NaOH 1 N, 0,5 mL de Reagente de Folin diluído três vezes e 1,5 mL de água destilada. Essa solução, após devida homogeneização, foi mantida em repouso por 30 minutos para posterior leitura da absorbância em espectrofotômetro à 650 nm contra um branco sem tirosina.

A atividade proteolítica foi calculada segundo a equação:

$$\text{Atividade (U/mL)} = \frac{\mu\text{moles de tirosina} \times D \times 8}{\text{Tempo de incubação} \times 0,5 \text{ mL}}$$

Equação (1)

Onde:

D = fator de diluição do extrato enzimático

8 = fator de diluição do extrato enzimático em análise

0,5 = volume do extrato enzimático em análise

Tempo de incubação = 30 minutos

3.4.2.2 β -1,3-glucanase

O método empregado para determinação da atividade de β -1,3-glucanase foi realizado de acordo com metodologias propostas por Leelasuphakul et al. (2006) modificado e Fleuri (2003) modificado, que consiste na quantificação de açúcares redutores liberados a partir de laminarina de *Laminaria digitata* (Sigma Aldrich), determinada pelo método do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS)(MILLER, 1959).

1º método:

Uma alíquota de substrato (180 µL de laminarina de *Laminaria digitata* 0,5% preparada em tampão acetato de sódio 0,1 M, pH 5,0) foi adicionada em tubo de ensaio seguida de 20 µL de extrato enzimático devidamente diluído. A mistura reacional foi incubada a 50°C por 30 minutos em banho maria sorológico modelo IO118 e a reação interrompida pela adição de 0,4 mL de reagente DNS seguido do aquecimento dos tubos até ebulição por 5 minutos. Posteriormente, a mistura foi deixada esfriar à temperatura ambiente, adicionado 0,9 mL de água destilada e a absorbância lida a 540 nm em espectrofotômetro. Para ajuste do aparelho foi preparado um tubo branco utilizando-se tampão acetato de sódio 0,1 M, pH 5,0 em substituição ao substrato. Um outro controle (“branco da reação”) foi preparado pela adição seqüencial de substrato, DNS, extrato enzimático e água destilada.

A curva padrão foi construída utilizando soluções de 0-28,0 µmol/mL de glicose, sendo uma unidade (U) de glucanase definida como a quantidade de enzima capaz de catalisar a liberação de 1 µmol de açúcar redutor por mililitro em 1 minuto, expresso em glicose.

2º método:

A reação foi iniciada pela adição de 250 µL de extrato enzimático a um tubo de ensaio contendo 250 µL de solução 1% de laminarina preparada em tampão acetato de sódio 0,1 M, pH 5,0. Esta mistura foi incubada em banho maria sorológico modelo IO118 à 50°C por 30 minutos e a reação interrompida pela adição de 0,75 mL de reagente DNS. A seguir, os tubos foram levados à fervura por 5 minutos, deixados esfriar à temperatura ambiente e a absorbância lida a 540 nm em espectrofotômetro. Para ajuste do aparelho foi preparado um tubo branco utilizando-se tampão acetato de sódio 0,1 M, pH 5,0 em substituição ao substrato. Um outro controle (“branco da reação”) foi preparado pela adição seqüencial de substrato, DNS e extrato enzimático.

A curva padrão foi construída utilizando soluções de 0-28,0 µmol/mL de glicose, sendo uma unidade (U) de glucanase definida como a quantidade de enzima capaz de catalisar a liberação de 1 µmol de açúcar redutor por mililitro em 1 minuto, expresso em glicose.

3.4.2.3 α -mananase

A atividade de α -mananase foi determinada de acordo com o método descrito por John e Hampel (1991) modificado, que consiste na quantificação de açúcares redutores liberados a partir de manana de *Saccharomyces cerevisiae* (Sigma Aldrich), determinada pelo método do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS)(MILLER, 1959).

Uma alíquota de 250 μ L de substrato (manana de *Saccharomyces cerevisiae* preparada em tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 6,5) e 100 μ L do tampão fosfato de potássio foram adicionados em tubo de ensaio, seguido da adição de 150 μ L de extrato enzimático devidamente diluído. Os tubos foram incubados em banho maria sorológico modelo IO118 durante 30 minutos a 50°C e a reação interrompida pela adição de 0,75 mL de reagente DNS. Posteriormente, esses foram aquecidos até ebulição por 5 minutos, deixados esfriar à temperatura ambiente e a absorbância lida a 540 nm em espectrofotômetro. Para ajuste do aparelho foi preparado um tubo branco utilizando-se tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 5,0 em substituição ao substrato. Um outro controle (“branco da reação”) foi preparado pela adição sequencial de substrato, tampão fosfato de potássio, DNS e extrato enzimático.

A curva padrão foi construída utilizando soluções de 0-5,0 μ mol/mL de manose, sendo uma unidade (U) de α -mananase definida como a quantidade de enzima capaz de catalisar a liberação de 1 μ mol de açúcar redutor por mililitro em 1 minuto, expresso em manose.

4) RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1) Avaliação do Crescimento Celular e Produção de Enzimas em Reator

Os resultados referentes ao crescimento celular no meio contendo melaço (meio n°2) como fonte de carbono, a 40°C e pH 8,0 (controlado) encontram-se apresentados na Figura 2.

Figura 2 – Crescimento de *Bacillus licheniformis* E-44 em meio contendo melaço de cana-de-açúcar em reator de bancada.

Observa-se que cepa de *Bacillus licheniformis* E-44 apresentou crescimento exponencial após 4 h de cultivo, atingindo o máximo crescimento após 28 h de cultivo, quando a concentração celular atingiu 17,20 g/L. Em seguida, observa-se que a biomassa microbiana se manteve constante até aproximadamente 32 h e entrou em declínio, provavelmente em função da escassez de substrato.

Potumarthi, Subhakar e Jetty (2007), conduziram um estudo com *Bacillus licheniformis* NCIM-2042 em fermentador tipo tanque agitado utilizando caseína como fonte de carbono. Estes pesquisadores trabalharam em condições semelhantes de temperatura, agitação, aeração e densidade de inóculo daquelas utilizadas no presente trabalho e obtiveram concentração celular de apenas 5,50 g/L durante um período de 72 h de cultivo.

As diferenças de desempenho apresentadas pelas duas cepas utilizadas nos respectivos estudos podem estar relacionadas às fontes de carbono empregadas na composição dos meios de cultivo. É importante ressaltar que melaço de cana-de-açúcar, além de conter alto teor de nitrogênio e vitaminas, é um meio rico em carboidratos que são prontamente assimiláveis pelo microrganismo (glicose, frutose e sacarose), o que não é observado com a caseína (HAULY; OLIVEIRA; OLIVEIRA, 2003).

No tocante à produção de enzimas extracelulares, protease, β -1,3-glucanase e α -mananase, nenhuma atividade foi encontrada ao longo do cultivo. Segundo Potumarthi, Subhakar e Jetty (2007), a produção de protease em tanque agitado é dependente da relação entre velocidade de agitação e aeração. Estes autores, trabalhando com *Bacillus licheniformis* NCIM – 2042 constataram que a máxima produção de protease (340 U/mL) foi observada após 72 h de cultivo com aeração de 2,0 vvm e agitação de 300 rpm. Vale ressaltar que no presente estudo os cultivos foram desenvolvidos a 2,0 vvm de aeração e agitação de 200 rpm.

4.2) Avaliação do Crescimento Celular e Produção de Enzimas em Frascos Erlemeyer

4.2.1 Avaliação do Efeito de Diferentes Indutores sobre o Crescimento Celular, pH do Meio de Cultivo e Produção de Enzimas

Partindo-se do pressuposto de que a síntese de enzimas por parte da cepa de *Bacillus* em estudo é dependente de indução, avaliou-se como indutores, caseína, parede celular de levedura e levedura inativa seca, na concentração de 10 g/L, cujos resultados relativos à cinética de crescimento microbiano encontram-se representados na Figura 3.

Verifica-se que entre os indutores avaliados, caseína foi o que propiciou a obtenção da maior concentração de biomassa celular (13,27 g/L) após 28 h de cultivo, seguido da parede celular de levedura (8,50 g/L) e levedura inativa seca (6,50 g/L), após 24 h de fermentação. Nestas condições não se observou a presença das respectivas enzimas nos meios de cultivo. Pérez et al. (2007), trabalhando com *Bacillus licheniformis* E-44 na presença de caseína como indutor a pH 7,4, reportaram crescimento celular máximo após 20 h de cultivo, sendo que após 28 h de cultivo foi observado redução do crescimento, evidenciando a fase estacionária.

Figura 3 - Crescimento de *Bacillus licheniformis* E-44 em meio contendo diferentes indutores (meios n° 3, 4 e 5) a pH 8,0 em frascos agitados.

Observa-se ainda que a fase lag foi de aproximadamente 8 h, independentemente do indutor avaliado. Por outro lado, constatou-se diferenças no tempo necessário para se atingir o valor máximo de concentração celular entre os indutores avaliados, devido provavelmente às diferentes fontes de carbono empregadas nos respectivos meios de cultivo. Vale salientar que existem diferenças na capacidade de assimilação dessas fontes de carbono pelo microrganismo devido à sua natureza química com ênfase nas ligações entre as unidades monoméricas que as compõe, as quais são sensíveis à ação de agentes físicos, tais como o calor. Neste contexto, vale ressaltar que no presente trabalho os indutores avaliados foram submetidos a um tratamento térmico (0,5 atm/15 minutos), o que pode ter representado um efeito mais acentuado sobre a caseína em relação à parede celular de levedura e à levedura inativa seca. Um outro fator que pode auxiliar na explicação destes resultados, diz respeito à maneira como esses indutores foram obtidos das suas respectivas fontes, bem como, da forma em que esses foram processados. Desta forma, os indutores podem ter perdido, de maneira diferente, parte de sua “integridade química” provocando diferenças na assimilação pela cepa em estudo.

Semelhante ao observado nos experimentos realizados em reator de bancada, não foram encontradas atividades enzimáticas referentes às enzimas protease, β -1,3-glucanase e α -mananase. Por outro lado, resultados satisfatórios foram encontrados por Al-Shehri et al. (2004), os quais, trabalhando com uma cepa de *Bacillus licheniformis* isolada de solo da

Arábia Saudita, obtiveram atividade de protease ao longo das 72 h de cultivo, sendo que a atividade máxima (221 U/mL) foi obtida após 36 h de incubação utilizando caseína como fonte de carbono. No entanto, há de se considerar que esta pesquisa foi desenvolvida em condições experimentais, tais como, concentração de indutor, meio de cultivo, temperatura, agitação e pH, diferentes daquelas empregadas no presente estudo e que, segundo Chaud, Vaz e Felipe (2007), as condições de crescimento e produção de proteases por bactérias do gênero *Bacillus* são dependentes de tais fatores.

Hadj-Ali et al. (2007), trabalhando com *Bacillus licheniformis* NH1, constataram que dentre as diferentes fontes de carbono avaliadas (caseína, maltose, glicose, amido, sacarose e lactose), caseína se revelou como sendo a melhor para a produção de protease. A atividade proteolítica encontrada foi de 1600 U/mL quando se utilizou caseína e 342 U/mL na presença de amido. Por outro lado, nenhuma atividade foi obtida quando se utilizaram maltose, glicose e sacarose, açúcares estes, de massa molecular relativamente baixa e prontamente assimiláveis pelo microrganismo. Estes resultados sugerem que esta espécie de bactéria requer a presença de compostos de elevada massa molecular, como caseína e amido, que atuando como indutores, estimulam a síntese de protease.

Em estudo conduzido com *Bacillus subtilis* NSRS 89-24, Leelasuphakul, Sivanunsakul e Phongpaichit (2006), utilizando quitina como indutor para a síntese de β -1,3-glucanase, constataram atividade ao longo de 7 dias de cultivo, sendo essa atividade máxima (65 U/mL) obtida no quinto dia.

Resultados obtidos por John e Hampel (1991), revelaram a presença de α -mananase nos filtrados obtidos do cultivo de espécies de *Arthrobacter* quando se utilizou manana de levedura, manose, frutose e sacarose como fontes de carbono. As maiores atividades foram obtidas com frutose e manana, 180 e 145 U/mL, respectivamente.

Com o objetivo de verificar a eficiência da solução tampão de tris-HCl 0,2 M em manter o pH inicial controlado em 8,0 nos meios de cultivo contendo os diferentes indutores, estudou-se a variação do pH durante o cultivo da respectiva cepa por 50 h, cujos resultados encontram-se representados na Figura 4.

A análise destes resultados revela que a solução tampão de tris-HCl 0,2 M foi eficiente na manutenção do pH inicial dos meios de cultivo estudados para o crescimento de *Bacillus licheniformis* E-44, uma vez que este se manteve praticamente constante ao longo do cultivo. O controle do pH é de fundamental importância em muitos processos

fermentativos, tendo em vista que a variação desse parâmetro pode acarretar em redução ou até inibição da produção de metabólitos importantes.

Figura 4 – Variação do pH durante o cultivo de *Bacillus licheniformis* E-44 nos meios n° 3, 4 e 5, contendo diferentes indutores.

Adicionalmente, foi possível constatar que o pH não interferiu negativamente na produção de biomassa. Contrariando estes resultados, estudos conduzidos por Çalik et al. (2002), mostraram que em meio a pH 7,0 houve estímulo ao crescimento de *Bacillus licheniformis*, sendo que o aumento desse para 7,5 favoreceu a produção de protease em detrimento da formação de biomassa celular.

4.2.2) Avaliação do Efeito do pH sobre o Crescimento Celular e Produção de Enzimas

Tendo em vista os resultados não satisfatórios quanto à produção de enzimas nas condições de cultivo estabelecidas, novos experimentos foram realizados nos respectivos meios a pH 5,5, 7,0 e 8,5 (Figuras 5, 6 e 7). Para tanto, os experimentos foram conduzidos com os mesmos meios de cultivo e nas mesmas condições de temperatura, agitação e tempo de incubação.

Figura 5 – Crescimento de *Bacillus licheniformis* E-44 nos meios nº 3, 4 e 5 contendo diferentes indutores a pH 5,5.

Figura 6 - Crescimento de *Bacillus licheniformis* E-44 nos meios nº 3, 4 e 5 contendo diferentes indutores a pH 7,0.

Figura 7 - Crescimento de *Bacillus licheniformis* E-44 nos meios 3, 4 e 5 contendo diferentes indutores a pH 8,5.

De acordo com os resultados representados na Figuras 5, 6 e 7, constata-se que caseína foi o indutor que proporcionou a maior obtenção de biomassa, seguido da parede celular de levedura e levedura inativa seca, nos correspondentes valores de pH avaliados, sendo o crescimento máximo obtido após 20 h de cultivo em pH 5,5 e após 28 h em pH 7,0 e 8,5. Estes resultados estão de acordo com àqueles encontrados por Pérez et al. (2007), que trabalhando com a mesma cepa e caseína como fonte de carbono na mesma concentração, obtiveram máximo crescimento celular após 20 h de cultivo.

Comparando os resultados obtidos em pH 5,5, 7,0 e 8,5, com àqueles obtidos nos cultivos realizados em pH 8,0 para os meios nº 3, 4 e 5, inferimos que nesses, os valores de biomassa máxima obtida sempre foram significativamente maiores do àquelas conduzidas em pH 5,5, porém não tão significativos em relação àquelas realizadas em pH 7,0 e 8,5. Estes dados sugerem que *Bacillus licheniformis* E-44 mostra uma tendência de crescimento mais acentuado quando o mesmo é cultivado em meio contendo caseína como fonte de carbono e em valores de pH que tendem para o alcalino. Estes resultados corroboram com àqueles obtidos por Çalik et al. (2002), Patel e Singh (2005), Silva, Delatorre e Martins (2007), os quais obtiveram alta produção de biomassa celular em valores de pH acima de 7,0 quando trabalharam com cepas diferentes desta mesma espécie.

Ensaio foram realizados com o objetivo de se verificar a eficiência das soluções tampão em manter o pH ao longo dos respectivos cultivos e os resultados encontram-se representados nas Figuras 8, 9 e 10.

Figura 8 – Variação do pH durante o cultivo de *Bacillus licheniformis* E-44 nos meios nº 3, 4 e 5 contendo diferentes indutores como fonte de carbono em pH inicial 5,5.

Figura 9 – Variação do pH durante o cultivo de *Bacillus licheniformis* E-44 nos meios nº 3, 4 e 5 contendo diferentes indutores como fonte de carbono em pH inicial 7,0.

Figura 10 – Variação do pH durante o cultivo de *Bacillus licheniformis* E-44 nos meios n° 3, 4 e 5 contendo diferentes indutores como fonte de carbono em pH inicial 8,5.

De acordo com os resultados representados nas Figuras 8, 9 e 10, observa-se que os valores de pH sofreram variação ao longo do cultivo, sendo essa variação um pouco mais acentuada quando na presença de caseína.

Embora o pH tenha grande influência sobre a produção e atividade enzimática (CHAUD; VAZ; FELIPE, 2007), no presente trabalho esse efeito não ficou tão evidente, uma vez que não foram detectadas atividades enzimáticas nos sobrenadantes avaliados. Al-Shehri et al. (2004), analisando algumas propriedades de proteases produzidas por *Bacillus licheniformis* isolado na Arábia Saudita, concluíram que a produção dessa enzima foi particularmente sensível ao pH ácido, sendo a máxima produção obtida em meio a pH 8,0.

É importante ressaltar que não é o pH o único fator que exerce influência sobre a produção de enzimas, mas sim, um conjunto de outros fatores, tais como, natureza e concentração da fonte de carbono, temperatura e tempo de incubação (CHAUD; VAZ; FELIPE, 2007), aeração e agitação (POTUMARTHI; SUBHAKAR; JETTY, 2007) e relação entre carbono/nitrogênio no meio de cultivo (GUPTA et al., 2002).

4.2.3) Avaliação do Efeito de Diferentes Meios de Cultivo sobre o Crescimento Celular e Produção de Enzimas

Tendo em vista a ausência de atividades enzimáticas nos meios previamente estudados, novos experimentos foram realizados com o intuito de se avaliar o desempenho da cepa em estudo em diferentes meios de cultivo (meios n° 6, 7 e 8), dando ênfase ao crescimento celular e à produção das respectivas enzimas, cujos resultados encontram-se demonstrados na Figura 11.

Figura 11 – Crescimento de *Bacillus licheniformis* E-44 nos meios n° 6, 7 e 8 na presença de caseína como indutor.

Observa-se que a cepa em estudo apresentou um crescimento caracterizado por uma fase exponencial a partir de 4 h de cultivo atingindo máximo crescimento após 24 h, seguido de uma fase estacionária e posterior declínio.

É interessante notar que o aumento da biomassa celular foi mais acentuado no meio n° 6 (máximo de 12,69 g/L), quando comparado aos outros dois meios (9,5 e 7,5 g/L para os meios n° 7 e 8, respectivamente). Com relação a este último resultado, uma possível justificativa para a baixa concentração celular obtida em relação aos meios n° 6 e 7 pode estar relacionada à concentração de caseína utilizada nesse cultivo: enquanto que nesses meios foi utilizado 10 g/L de caseína, naquele foi utilizado 30 g/L. É sabido que a concentração de substrato é fator que exerce influência significativa sobre o crescimento

microbiano (CHAUD; VAZ; FELIPE, 2007), sendo possível que neste último meio possa ter ocorrido algum efeito inibitório que justificasse tal resultado.

Em fermentação conduzida em reator tipo tanque agitado, foram estudadas várias concentrações de caseína, a saber: 20, 30, 40 e 50 g/L no meio de cultivo para a produção de protease por *Bacillus licheniformis* NCIM-2042. Os resultados mostraram redução da atividade enzimática quando foram utilizadas concentrações crescentes de caseína. Segundo Potumarthi, Subhakar e Jetty (2007), o aumento da concentração inicial de caseína ocasionou aumento da viscosidade do meio de fermentação, provocando redução do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio e, consequentemente, redução da produção de protease ao longo do processo fermentativo.

Esta diferença em termos de crescimento pode ainda ser explicada pelo fato de que, apesar de todos os meios de cultivo serem constituídos por caseína como fonte de carbono, esses apresentavam composições e concentrações diferentes em termos de nutrientes e sais minerais. Além disso, segundo Gupta et al. (2002), a relação entre carbono e nitrogênio no meio de cultivo exerce grande influência sobre a produção de biomassa durante um processo fermentativo.

Uma outra explicação plausível para este resultado pode estar relacionada aos diferentes valores de pH utilizados na formulação destes meios. Os meios nº 6 e 7 foram formulados em pH 8,0 e 9,5, respectivamente, enquanto que o meio nº 8 em pH 7,0. Observa-se claramente, uma forte tendência desta espécie de bactéria crescer melhor em valores de pH mais alcalinos. Esta constatação pôde ser reforçada, tendo em vista que os resultados obtidos com ensaios anteriores também mostraram uma tendência de crescimento mais acentuado nesta mesma faixa de pH.

Esses resultados corroboram com àqueles encontrados por Patel e Singh (2005), os quais observaram crescimento de *Bacillus* sp. em valores de pH situados entre 7,0 e 9,0, sendo ótimo em pH 8,0.

No tocante a produção das respectivas enzimas, observou-se que mesmo variando a composição dos meios de cultivo não foi evidenciada a produção das mesmas. Desta forma, optou-se por variar as condições de aeração e agitação, pois, segundo Potumarthi, Subhakar e Jetty (2007), estes fatores interferem sobremaneira na produção de enzimas por diferentes espécies de *Bacillus*.

4.2.4) Avaliação do Efeito da Agitação sobre o Crescimento Celular e Produção de Enzimas

Em condições de agitação a 100, 200 e 300 rpm, avaliou-se o desempenho de *Bacillus licheniformis* E-44 cultivado em meio nº3, tendo caseína como indutor, a pH 8,0, a 40°C e 2,0 vvm, cujos resultados estão demonstrados na Figura 12.

Figura 12 – Crescimento de *Bacillus licheniformis* E-44 em meio nº 3 em diferentes condições de agitação.

Os resultados obtidos evidenciam a importância do fator agitação sobre o crescimento de *Bacillus licheniformis* E-44 nas condições estudadas. Estes resultados revelam ainda que a cepa em estudo apresentou maior crescimento quando cultivada em agitação de 200 rpm, atingindo 15,04 g/L após 24 h de cultivo. O crescimento máximo alcançado nas velocidades de 100 e 300 rpm corresponde a 7,00 e 10,80 g/L, respectivamente, após o mesmo tempo de cultivo.

Estes resultados estão em concordância com aqueles obtidos por Al-Shehri et al. (2004), Hadj-Ali et al. (2007), Pérez et al. (2007) e Souissi et al. (2008), os quais realizaram os respectivos ensaios empregando cepas diferentes de *Bacillus licheniformis* em velocidade de agitação de 200 rpm.

No tocante a produção das respectivas enzimas, não se observou atividades enzimáticas.

4.2.5) Avaliação do Efeito da Aeração sobre o Crescimento Celular e Produção de Enzimas

O efeito da aeração sobre o comportamento de *Bacillus licheniformis* E-44 cultivado no meio n°3, a pH 8,0, 40°C e 200 rpm foi verificado variando-se o volume de meio (25, 50, 75 e 100 mL) em frascos Erlenmeyer de 250 mL, cujos resultados encontram-se demonstrados na Figura 13.

Figura 13 – Crescimento de *Bacillus licheniformis* E-44 em meio n° 3 em diferentes condições de aeração.

Estes resultados permitem inferir que a cepa de *Bacillus licheniformis* E-44 apresentou melhor desempenho quando foi cultivada na condição de relação volume de meio/volume de frasco de 1:10, atingindo valor máximo de 13,27 g/L após 24 h de cultivo. Por outro lado, quando se avaliou a relação de 1:2,5, obteve-se crescimento celular equivalente a metade (6,52 g/L) daquele obtido na relação de 1:10. Estas observações demonstram claramente que o crescimento da cepa em estudo é fortemente dependente e favorecido pelo fator aeração. Nestas condições não foi evidenciado atividades relativas às enzimas em estudo.

No tocante a ausência de atividade das enzimas protease, β -1,3-glucanase e α -mananase nas diferentes condições avaliadas no presente trabalho, pode-se inferir que *Bacillus licheniformis* E-44 tenha sofrido alguma alteração fisiológica que provocou a

perda de sua capacidade de sintetizar enzimas extracelulares sem afetar a sua capacidade de biossíntese, tendo em vista que essa cepa foi objeto de estudo por Pérez et al. (2007), visando à produção de um extrato enzimático para hidrólise da parede celular de leveduras, com resultados satisfatórios.

5) CONCLUSÕES

Os resultados do presente trabalho permitem concluir que:

- ✍ *Bacillus licheniformis* E-44 apresentou melhor desempenho, no que se refere ao crescimento celular, na presença de caseína como fonte de carbono nas seguintes condições: pH 8,0-8,5, agitação de 200 rpm e relação volume de frasco/volume de meio de 1:10.
- ✍ A cepa de *Bacillus licheniformis* E-44 não produziu protease, α -1,3-glucanase e α -mananase nas condições avaliadas.

6) SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Os resultados obtidos por Perez et al (2007) e no presente trabalho sugerem a realização de novos experimentos com outra cópia da cepa de *Bacillus* com vistas à produção de um extrato enzimático, que posteriormente, teria sua eficácia avaliada no tocante a sua capacidade de hidrolisar parede celular de leveduras.

Adicionalmente, sugere-se a realização de ensaios visando a caracterização do respectivo hidrolisado de levedura, no que se refere à geração de compostos que apresentam propriedades prebióticas, bem como a avaliação desse hidrolisado na dieta humana e de animais domésticos.

REFERÊNCIAS

- ADACHI, T.; OHNO, N.; OHSAWA, M.; OKINAWA, S.; YACOMAE, T. Macrophage activation in vitro by chemically cross-linked β -(1,3)-glucans. **Chem. Pharm. Bull**, v.38, p.988-992, 1991.
- AI, Q.; MAI, K.; ZHANG, L.; TAN, B.; ZHANG, W.; XU, W.; LI, H. Effects of dietary β -1,3-glucan on innate immune response of large yellow croaker, *Pseudosciaena crocea*. **Fish and Shellfish Immunology**, v.22, p.394-402, 2007.
- ALBINO, L.F.T.; FERES, F.A.; DIONIZIO, M.A.; ROSTAGNO, H.S.; JÚNIOR, J.G.V.; CARVALHO, D.C.O.; GOMES, P.C.; COSTA, C.H.R. Uso de prebióticos à base de mananoligossacarídeos em rações para frango de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.35, n.3, p.742-749, 2006.
- ALEKSIEVA, P.; DJEROVA, A.; TCHORBANOV, B.; GIRAROV, J. Submerged cultivation of a strain of *Humicola lutea* 72 producing acid protease. **European Journal Applied Microbiol. Biotech.**, v.13, p.165-169, 1981.
- AL-SHEHRI, M.; ABDULRAHMAN, MOSTAFA, S.; YASSER. Production and some properties of protease produced by *Bacillus licheniformis* isolated from Tihamet Aseer, Saudi Arabia. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v.7, n.9, p.1631-1635, 2004.
- ANDREWS, B.A.; ASENJO, J.A. Continuous culture studies of synthesis and regulation of extracellular (1 $\rightarrow$ 3)- β -glucanase and protease enzymes from *Oerskovia xanthineolytica*. **Biotechnology and Bioengineering**, v.30, p.628-637, 1987a.
- ANSON, M.L. Stimulation of pepsin, papain and cathepsin with hemoglobine. **J. Gen. Phys.**, v.22, p.79-89, 1973.
- ANWAR, A.; SALEEMUDDIN, M. Alkaline protease from *Spilosoma oblique*: potential applications in bio-formulations. **Biotechnol. Appl. Bioc.**, v.31, p.85-89, 2000.

AONO, R.; HAMMURA, M.; YAMAMOTO, M.; ASSANO, T. Isolation of extracellular 28 and 42 kilodalton β -1,3-glucanases and comparison of three β -1,3-glucanases produced by *Bacillus circulans* IAM 1165. **Applied and Environmental Microbiology**, v.61, n.1, p.122-129, 1995.

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

BACON, J.S.D.; GORDON, A.H.; JONES, D.; TAYLOR, I.F.; WEBLEY, D.M. The separation of β -glucanases produced by *Cytophaga johnsonii* and their role in the lysis of yeast cell walls. **The Biochemical Journal**, v.120, p.67-78, 1970.

BANERJEE, U.C.; SANI, R.K.; AZMI, W.; SONI, R. Thermostable alkaline protease from *Bacillus brevis* and its characterization as a laundry detergent additive. **Process Biochemistry**, v.35, p.213-219, 1999.

BAPTISTA, A.S.; HORII, J.; CALORI-DOMINGUES, M.A.; DA GLORIA, E.M.; SALGADO, J.M.; VIZIOLI, M.R. The capacity of mannanoligosaccharides thermolysed yeast and active yeast to attenuate aflatoxicosis. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.20, p.475-481, 2004.

BARA, M.T.F.; LIMA, A.L.; ULHOA, C.J. Purification and characterization of an exo- β -1,3-glucanase produced by *Trichoderma asperellum*. **FEMS Microbiology Letters**, v.219, p.81-85, 2003.

BARRET, A.J.; RAWLINGS, N.D.; O'BRIEN, E.A. The MEROPS database as a proteases information system. **Journal of Structural Biology**, San Diego, v.134, p.95-102, 2001.

BEG, Q.K.; GUPTA, R. Purification and characterization of an oxidation stable, thiol-dependent serine alkaline protease from *Bacillus mojavenensis*. **Enzyme and Microbial Technology**, v.32, p.294-304, 2003.

BENGMARK, S. Bioecologic control of the gastrointestinal tract: the role of flora and supplemented probiotics and synbiotics. **Gastroenterology Clinics of North America**, v.34, p.413-436, 2005.

BHASKAR, N.; SUDEEPA, E.S.; RASHMI, H.N.; SELVI, A.T. Partial purification and characterization of protease of *Bacillus proteolyticus* CFR 3001 isolated from fish processing waste and its antibacterial activities. **Bioresource Technology**, v.98, p.2758-2764, 2007.

BIORIGIN. Disponível em: ?<http://www.biorigin.com.br/clientes/biorigin/index?>. Acesso em: 30 de maio de 2008.

BIOTECNAL. **O Fantástico Mundo dos Probióticos**. Informe Técnico, s.d., p.66.

BOHN, J.A; BE MILLER, J.N. (1? 3) β -glucan as biological response modifiers: a review of structure-functional activity relationships. **Carbohydrate Polymers**, v.28, p.3-14, 1995.

BROWN, G.D. Dectin-1: a signaling non-TLR pattern-recognition receptor. **Nat. Rev. Immunol.**, v.6, p.33-43, 2006.

CABALLERO-CÓRDOBA, G.M.; SGARBIERI, V.C. Nutritional and toxicological avaliation of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) biomass and a yeast protein concentrate. **Journal of the Science Food Agriculture**, v.4, n.80, p.341-351, 2000.

CABIB, E.; DRGON, T.; DRGONOVAA, J.; FORD, R.A.; KOLLAR, R. The yeast cell wall, a dynamic structure engaged in growth and morphogenesis. **Biochemical Society Transactions**, v.25, n.1, p.200-204, 1997.

ÇALICK, P.; BILIR, E.; ÇALIK, G.; ÖZDAMAR, T.H. Influence of pH conditions on metabolic regulations in serine alkaline protease production by *Bacillus licheniformis*. **Enzyme and Microbiol Technology**, v.31, p.685-697, 2002.

ÇALIK, P.; ÖZÇELİK, S.Ö.; ÇALIK, G.; ÖZDAMAR, T.H. Enzyme ion exchanger interactions in serine alkaline protease production: theory, equilibria and kinetics. **Biochemistry Engeneering**, v.3623, p.1-12, 2002.

CHAUD, L. S.; VAZ, P.; FELIPE, M.G. Considerações sobre a produção microbiana e aplicações de proteases. **Nucleus**, v.4, n.1-2, p.97-107, set. 2007.

CHOUYYOK, W.; WONGMONGKOL, N.; SIWARUNGSON, N.; PRICHANONT, S. Extraction of alkaline protease using an aqueous two phase system from cell free *Bacillus subtilis* TISTR 25 fermentation. **Process Biochemistry**, v.40, p.3514-3518, 2005.

CIPÁK, L.; MIADOKOVÁ, E.; DINGOVÀ, H.; KOGAN, G.; NOVOTNÝ, L.; RAUKO, P. Comparative DNA-protectivity and anti-mutagenity studies using the DNA-topology and Ames assays. **Toxicology in vitro**, v.15, p.677-681, 2001.

COHEN-KUPIEC, R.; BROGLIE, K.E.; FRIESEM, D.; BROGLIE, R.M.; CHET, I. Molecular characterization of a novel β 1,3-exoglucanase related to mycoparasitism of *Trichoderma harzianum*. **Gene**, v.226, p.147-154, 1999.

DAWSON, K.A.; PIRVULESCU, M. Mananoligossacarídeos derivados de leveduras como moduladores da resposta imune e alternativas aos promotores de crescimento antimicrobianos. In: RONDA LATINO-AMERICANA DA ALLTECH. 9., Campinas, 1999. **Anais...** Campinas. Alltech, 1999. p.33-41.

DE LA CRUZ, J.; REY, M.; LORA, J.M.; HIDALGO-GALLEGO, A.; DOMÍNGUEZ, F.; PINTOR-TORO, J.A.; LLOBEL, A.; BENÍTEZ, T. Carbon source control on β -glucanases, chitobiase and chitinase from *Trichoderma harzianum*. **Archives of Microbiology**, v.159, p.316-322, 1993.

DE LA CRUZ, J.; PINTOR-TORO, J.A.; BENÍTEZ, T.; LLOBEL, A.; ROMERO, L.C. A novel endo- β -1,3-glucanase, BGN 13.1, involved in the mycoparasitism of *Trichoderma harzianum*. **Journal of Bacteriology**, v.177, n.23, p.6937-6945, 1995.

DODDAPANENI, K.K.; TATINENI, R.; VELLANKI, R.N.; RACHCHA, S.; ANABROLU, N.; NARAKUTI, V.; MANGAMOORI, L.N. Purification and characterization of a solvent and detergent-stable novel protease from *Bacillus cereus*. **Microbiological Research**, in press, 2008.

DZIEZAK, J.D. Yeasts and yeast derivates: definition, characteristics and processing. **Food Technology**, v.41, n.2, p.103-121, 1987a.

DZIEZAK, J.D. Yeasts and yeast derivates: applications. **Food Technology**, v.41, n.2, p.122-125, 1987b.

EICHER, S.D.; McKEE, C.A.; CARROLL, J.A.; PAJOR, E.A. Supplemental vitamin C and yeast cell wall β -glucan as growth enhancers in newborn pigs and as immunomodulators after an endotoxin challenge after weaning. **Journal Animal Science**, v.84, p.2352-2360, 2006.

EL-KATATNY, M.H.; GUDELJ, M.; ROBRA, K.H.; ELNAGHY, M.A.; GUBITZ, G.M. Characterization of a chitinase and an endo- β -1,3-glucanase from *Trichoderma harzianum* Rifai T24 involved in control of the phytopathogen *Sclerotium rolfsii*. **Applied Microbiol. Biotechnology**, v.56, p.137-143, 2001.

FARNWORTH, E.R. *et al.* Feeding Jerusalem artichoke flour rich in fructooligosaccharides to weanling pigs. **Canadian Journal of Animal Science**, v.72, n.12, p.977-980, 1992.

FERRERO, M.A.; CASTRO, G.R.; ABATE, C.M.; BAIGORI, M.D.; SINERK, F. Thermostable alkaline protease of *Bacillus licheniformis* MIR 29 isolation, production and characterization. **Applied and Microbial Biotechnology**, v.45, p.327-332, 1996.

FINUCANE, M.P.; SPRING, P.; NEWMAN, K.E. Incidence of mannose sensitive adhesions on enteric pathogens. In: SOUTHERN POULTRY SCIENCE, 18., Atlanta, 1999. **Poster**: Atlanta: GA, 1999. p.21.

FLEET, G.H.; PHAFF, H.J. Lysis of yeast cell walls: glucanases from *Bacillus circulans* WL-12. **Journal of Bacteriology**, v.119, n.1, p.207-219, 1974.

FLEMMING, J.S.; FREITAS, R.J.S. Avaliação do efeito de prebióticos (MOS), probióticos (*Bacillus licheniformis* e *Bacillus subtilis*) e promotor de crescimento na alimentação de frangos de corte. **Archives of Veterinary Science**, v.10, n.2, p.41-47, 2005.

FLEURI, L.F. **Produção de β -1,3-glucanase, proteases líticas e quitinases por microrganismos e aplicação na lise de leveduras**. 2003. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade de Campinas, Campinas, 2003.

FLEURI, L.F.; SATO, H.H. Produção, purificação, clonagem e aplicação de enzimas líticas. **Química Nova**, v.28, n.5, p.871-879, 2005.

FLICKINGER, E.A.; FAHEY Jr., G.C. Pet food and feed applications of inulin, oligofructose and other oligosaccharides. **British Journal of Nutrition**, v.87, p.S297-S300, 2002.

FRANKENA, J.; KONINGSTEIN, G.M.; VAN VERSEVELD, H.W.; STOUTHAMER, A.H. Effect of different limitations in chemostat cultures on growth and production of exocellular protease by *Bacillus licheniformis*. **Applied Microbiol Biotechnology**, v.24, p.106-112, 1986.

FRANKENA, J.; VAN VERSEVELD, H.W.; STOUTHAMER, A.H. A continuous culture study of the exocellular protease in *Bacillus licheniformis*. **Applied Microbiol Biotechnology**, v.22, p.169-176, 1985.

FREIMUND, S.; SAUTERA, M.; KAPPELIB, O.; DUTLER, H. A new non-degrading isolation process for β -1,3-glucan of high purity from baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Carbohydrate Polymers**, v.54, p.159-171, 2003.

GENCKAL, H.; TARI, C. Alkaline protease production from alkalophilic *Bacillus* sp. Isolated from natural habitats. **Enzyme and Microbial Technology**, v.39, p.703-710, 2006.

GIBSON, G.R.; ROBERFROID, M.B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: Introducing the concept of prebiotics. **Journal of Nutrition**, v.125, n.6, p.1401-1412, 1995.

GIBSON, G.R.; BERRY; OTTAWAY, P.; RASTALL, R.A. **Prebiotics: New developments in functional Foods**. Oxford: Chandos Publishing Limited, 2000.

GIBSON, G.R. Prebiotics. **Best practice & Research Clinical Gastroenterology**, v.18, n.2, p.287-298, 2004.

GIBSON, G.R. Fibre and effects on probiotics (the prebiotic concept). **Clinical Nutrition Supplements**, v.1, p.25-31, 2004.

GIESE, E.C.; COVIZZI, L.G.; DEKKER, R.F.H.; MONTEIRO, N.K.; SILVA, M.L.C.; BARBOSA, A.M. Enzymatic hydrolysis of botryosphaeran and laminarin by β -1,3-glucanases produced by *Botryosphaeria rhodina* and *Trichoderma harzianum* Rifai. **Process Biochemistry**, v.41, p.1265-1271, 2006.

GIESE, E.C.; COVIZZI, L.G.; BORSATO, D.; DEKKER, R.F.H.; SILVA, M.L.C.; BARBOSA, A.M. Botryosphaeran, a new substrate for the production of β -1,3-glucanases by *Botryosphaeria rhodina* and *Trichoderma harzianum* Rifai. **Process Biochemistry**, v.40, p.3783-3788, 2005.

GIESE, E.C.; BARBOSA, A.M.; SILVA, M.L.C. Glucanases fúngicas. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, n.30, p.97-104, 2003.

GOUVEIA, E.M.F.; SILVA, J.S.; ONSELEM, V.J.V.; CORRÊA, R.A.C.; SILVA, C.J. Uso de mananoligossacarídeos fosforilados como adjuvante no tratamento de doenças

gastrointestinais e seu efeito na inativação da *E. coli* em cães. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v.21, p.23-26, 2006.

GUILLOUX-BENATIER, M.; PAGEAULT, O.; MAN, A.; FEUILAT, M. Lysis of yeast cells by *Oenococcus oeni* enzymes. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.25, p.193-197, 2000.

GUPTA, R.; BEG, O. K.; KHAN, S.; CHAHUAN, B. An overview on fermentation, downstream processing and properties of microbial alkaline proteases. **Applied Microbial Biotechnol**, v.60, p.381-395, 2002.

GUPTA, R.; BEG, Q.K.; LORENZ, P. Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. **Applied Microbiol Biotechnol**, v.59, p.15-32, 2002.

HADJ-ALI, N.E.; AGREBI, R.; GHORBEL-FRIKHA, B.; SELLAMI-KAMOUN, A.; KANOUN, S.; NASRI, M. Biochemical and molecular characterization of a detergent stable alkaline serine-protease from a newly isolated *Bacillus licheniformis* NH1. **Enzyme and Microbial Technology**, v.40, p.515-523, 2007.

HALÁSZ, A.; LÁSZTITY, R. **Use of yeast biomass in food production**. Boca Raton: CRC Press , 1991.p.312.

HAMEED, A.C.; NATT, M.A.; EVANS, C.S. Production of alkaline protease a new *Bacillus subtilis* for use as a bating enzyme in leather treatment. **World Journal Microbiol Biotechnology**, v.12, p.289-291, 1996.

HANLON, G.W.; HODGES, N.A.; RUSSEL, A.D. The influence of glucose, ammonium and magnesium availability on the production of protease and bacitracin by *Bacillus licheniformis*. **Journal Gen. Microbiology**, v.128, p.845-851, 1982.

HAULY, M.C.L.; OLIVEIRA, A.R.; OLIVEIRA, A.S. Produção de ácido láctico por *Lactobacillus curvatus* em melaço de cana-de-açúcar. **Ciências Agrárias**, v.24, n.1, p.133-142, 2003.

HUNTER, J.B.; ASENJO, J.A. A structured mechanistic model of the kinetics of enzymatic lysis and disruption of yeast cell. **Biotechnology and Bioengineering**, v.31, p.929-943, 1988.

JASWAL, R.K.; KOCHER, G.S. Partial characterization of a crude alkaline protease from *Bacillus circulans* and its detergent compatibility. **The Internet Journal of Microbiology**, v.4, n.1, 2007.

JAYUS; McDOUGALL, B.M.; SEVIOUR, R.J. Purification and properties of β -1,6-glucanase from *Acremonium* sp. IMI 383068. **Enzyme and Microbial Technology**, v.29, p.289-299, 2001.

JAYUS; McDOUGALL, B.M.; SEVIOUR, R.J. Factors affecting the synthesis of (1 $\rightarrow$ 3) and (1 $\rightarrow$ 6)- β -glucanases by the fungus *Acremonium* sp. IMI 383068 grown in batch culture. **Enzyme and Microbial Technology**, v.31, p.289-299, 2002.

JAYUS; McDOUGALL, B.M.; SEVIOUR, R.J. Purification and characterization of the (1 $\rightarrow$ 3)- β -1,3-glucanases from *Acremonium* sp. IMI 383068. **FEMS Microbiology Letters**, v.230, p.259-264, 2004.

JAYUS; JUMADI, O.; McDOUGALL, B.M.; SEVIOUR, R.J. Synthesis of extracellular (1 $\rightarrow$ 3) and (1 $\rightarrow$ 6)- β -glucanase activities in carbon limiting chemostat culture by the fungus *Acremonium* sp. IMI 383068. **Enzyme and Microbial Technology**, v.36, p.680-686, 2005.

JAYUS; McDOUGALL, B.M.; SEVIOUR, R.J. The effect of dissolved oxygen concentrations on (1 $\rightarrow$ 3) and (1 $\rightarrow$ 6)- β -glucanase production by *Acremonium* sp. IMI 383068 in batch culture. **Enzyme and Microbial Technology**, v.36, p.176-181, 2005.

JENEY, G. *et al.* Prevention of stress in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed diet containing different doses of glucan. **Aquaculture**, v.1, n.154, p.1-15, 1997.

JOHN, E.; HAMPEL, A. Enzyme formation by a yeast cell wall lytic *Arthrobacter* species: formation of α -mannanase. **Applied and Microbiol Biotechnol**, v.35, p.60-64, 1991.

JOHNVESLY, B.; NAIK, G.R. Studies on production of thermostable alkaline protease from thermophilic and alkaliphilic *Bacillus* sp. JB-99 in a chemically defined medium. **Process Biochemistry**, v.37, p.139-144, 2001.

JOO, H.S.; KUMAR, C.G.; PARK, G.C.; PAIK, S.R.; CHANG, C.S. Bleach-resistant alkaline protease produced by a *Bacillus* sp. Isolated from the Korean polychaete, *Periserrula leucophryna*. **Process Biochemistry**, v.39, p.1441-1447, 2004.

JOO, H.S.; KUMAR, C.G.; PARK, G.C.; PAIK, S.R.; CHANG, C.S. Oxidant and SDS stable alkaline protease from *Bacillus clausii* I-52: production and some properties. **Journal Applied Microbiol**, v.95, p.267-272, 2003.

JOO, H.S.; KUMAR, C.G.; PARK, G.C.; KIM, K.T.; PAIK, S.R.; CHANG, C.S. Optimization of the production of an extracellular alkaline protease from *Bacillus horikoshii*. **Process Biochemistry**, v.38, p.155-159, 2002.

KANEKAR, P.P.; NILEGAONKAR, S.S.; SARNAIK, S.S.; KELKAR, A.S. Optimization of protease activity of alkaliphilic bacteria isolated from an alkaline lake in India. **Bioresource Technology**, v.85, p.87-93, 2002.

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

KANZAWA, Y.; KURASAWA, T.; KANEGAE, Y. Purification and properties of a new exo (1 $\rightarrow$ 3)- β -D-glucanase from *Bacillus circulans* YK9 capable of hydrolysing resistant curdlan with formation of only laminaribiose. **Microbiology – UK**, v.140, p.637-642, 1994.

KAPTEYN, J.C.; VAN EGMOND, P.; SIEVI, E.; VAN DEN ENDE, H.; MAKAROW, M.; KLIS, F.M. The contribution of the o-glycosylated Pir2p/Hsp150 to the construction of the yeast cell wall in wild-type cells β -1,6-glucan-deficient mutants. **Molecular Microbiology**, v.31, n.6, p.1835-1844, 1999a.

KARAMAN, M.; BASMACIOGLU, H.; ORTATATLI, M.; OGUZ, H. Evaluation of the detoxifying effect of yeast glucomannan on aflatoxicosis in broilers as assessed by gross examination and histopathology. **British Poultry Science**, v.46, p.394-400, 2005.

KAZAN, D.; DENIZCI, A.A.; ONER, M.N.K.; ERARSLAN, A. Purification and characterization of serine alkaline protease from *Bacillus clausii* GMBAE 42. **Journal Ind. Microb. Biotech.**, v.32, n.8, p.335-44, 2005.

KEMBHAVI, A.A.; KULHARNI, A.; PANT, A. A. Salt-tolerant and thermostable alkaline protease from *Bacillus subtilis* NCIM No. 64. **Biochemistry Biotechnol.**, v.38, p.83-92, 1993.

KÉRY, V.; KOGAN, G.; ZAJACOVÁ, K.; MASLER, L.; ALFOLDI, J. Hydrolysis of yeast cell-wall glucan by extracellular (1 $\rightarrow$ 3)- β -glucanases from *Aspergillus niger*. **Enzyme and Microbial Technology**, v.13, p.87-90, 1991.

KHALIKOVA, T.A.; ZHANAEVA, S. Ya.; KOROLENKO, T.A.; KALEDIN, V.I.; KOGAN, G. Regulation of activity of cathepsins B, L and D in murine lymphosareoma model at a combined treatment with cyclophosphamide and yeast polysaccharide. **Cancer Letters**, v.223, p.77-83, 2005.

KIRK, O.; BORCHET, T.V.; FUGLSANG, C.C. Industrial enzyme applications. **Current Opinion Biotechnology**, v.13, p.345-351, 2002.

KITAMOTO, Y.; KONO, R.; SHIMOTORI, A.; MORI, N.; ICHIKAWA, Y. Purification and some properties of an exo- β -1,3-glucanase from *Trichoderma harzianum*. **Agricultural and Biological Chemistry**, v.51, p.3385-3386, 1987.

KITAMURA, K.; YAMAMOTO, Y. Purification and properties of an enzyme, zymolyase, which lysis viable yeast cells. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.153, p.403-406, 1972.

KITAMURA, K.; KANEKO, T.; YAMAMOTO, Y. Lysis of viable yeast cells by enzymes of *Arthrobacter luteus*. II Purification and properties of an enzyme, zimolyase, which lysis 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.

KLIS, F.M. Review: cell wall assembly in yeast. **Yeast**, v.10, p.851-869, 1994.

KOGAN, G.; STASKO, A.; BAUEROVÁ, K.; POLOVKA, M.; SOLTÉS, L.; BREZOVÁ, V.; NAVAROVÁ, J.; MIHALOVÁ, D. Antioxidant properties of yeast (1 $\rightarrow$ 3)- β -D-glucan studied by electron paramagnetic resonance spectroscopy and its activity in the adjuvant arthritis. **Carbohydrate Polymers**, v.61, p.18-28, 2005.

KOGAN, G.; KOCHER, A. Role of yeast cell wall polysaccharides in pig nutrition and health protection. **Livestock Science**, v.109, p.161-165, 2007.

KOKASHIS, P.L.; WILLIAMS, D.L.; COOK, J.A; DI LUZIO, N.R. Increased resistance to *Staphylococcus aureus* infection and enhancement in serum activity by glucan. **Science**, v.199, p.1340-1342, 1978.

KOLE, M.M.; DRAPER, I.; GERSON, D.F. Production of protease by *Bacillus subtilis* using simultaneous control of glucose and ammonium concentrations. **Journal Chem. Technol. Biotechnol.**, v.41, p.197-206, 1988.

KRISKOVÁ, L.; DURACKOVÁ, Z.; SANDULA, J.; SASINKOVÁ, V.; KRAJCOVIC, J. Antioxidative and antimutagenic activity of yeast cell wall mannans in vitro. **Mutat. Res.**, v.497, p.213-222, 2001.

KULLEN, M.J. *et al.* Carbohydrate source and bifidobacteria influence the growth of *Clostridium perfringens* in vivo and in vitro. **Nutrition Research**, v.18, n.11, p.1889-1897, 1998.

KUMAR, C.G.; TAKAGI, H. Microbial alkaline proteases: from a bioindustrial viewpoint. **Biotechnology Advances**, v.17, p.561-594, 1999.

LAHR FILHO, D.; GHIRALDINI, J.A.; ROSSEL, C.E.V. Estudos de otimização de recuperação de biomassa de levedura em destilarias. In: “WORKSHOP” SOBRE PRODUÇÃO DE BIOMASSA DE LEVEDURA: UTILIZAÇÃO EM ALIMENTAÇÃO HUMANA E ANIMAL. INSTITUTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, p.387, 1996.

LEELASUPHAKUL, W.; SIVANUNSAKUL, P.; PHONGPAICHIT, S. Purification, characterization and synergistic activity of β -1,3-glucanase and antibiotic extract from an antagonistic *Bacillus subtilis* NSRS 89-24 against rice blast and sheath blight. **Enzyme and Microbial Technology**, v.38, p.990-997, 2006.

LEWIS, D.H. Storage carbohydrates in vascular plants: distribution, physiology and metabolism. **Plant Growth Regulation**, v.4, n.3, p.299-303, 1986.

LI, P.; GATLIN III, D.M. Evaluation of brewers yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) as a feed supplement for hybrid striped bass (*Morone chrysops* x *M. saxatilis*). **Aquaculture**, v.219, n.1, p.681-692, 2003a.

LI, P.; GATLIN III, D.M. Evaluation of the prebiotic Grobionic[®]-A and brewers yeast as dietary supplements for sub-adult hybrid striped bass (*Morone chrysops* x *M. saxatilis*) challenged *in situ* with *Mycobacterium marinum*. **Aquaculture**, v.248, p.197-205, 2005.

LI, J.; LI, D.F.; XING, J.J.; CHENG, Z.B.; LAI, C.H. Effects of β -glucan extracted from *Saccharomyces cerevisiae* on growth performance, and immunological and somatotrophic responses of pigs challenged with *Escherichia coli* lipopolysaccharide. **Journal Animal Science**, v.84, p.2374-2381, 2006.

LIM, C.C.; FERGUSON, L.R.; TANNOCK, G.W. Dietary fibres as “prebiotics”: implications for colorectal cancer. **Molecular Nutrition and Food Research**, v.49, p.609-619, 2005.

LIU, B.L.; TZENG, Y.M. Optimization of growth medium for the production of spores from *Bacillus thuringiensis* using surface response methodology. **Bioprocess Engineering**, v.18, p.413-418, 1998.

LÓPEZ, J. Probiotics in animal nutrition. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON RECENT ADVANCES IN ANIMAL NUTRITION, 2000, Seoul. **Proceedings...**Seoul: Seoul National University, 2000. p.33-54.

MABROUK, S.S.; HASHEM, A.M.; EL-SHAYEB, N.M.A.; ISMAIL, M.S.; ABDEL-FATTAH, A.F. Optimization of alkaline protease productivity by *Bacillus licheniformis* ATCC 21415. **Bioresource Technology**, v.69, p.155-159, 1999.

MACARI, M.; MAIORKA, A. Função gastrointestinal e seu impacto no rendimento avícola. In: CONFERÊNCIA APINCO'2000 DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 2000, Campinas. **Anais...** Campinas: FACTA, 2000. v.2, p.161-174.

MACFARLANE, G.T.; CUMMINGS, J.H. Probiotics and prebiotics: can regulating the activities of intestinal bacteria benefit health ? **British Medical Journal**, v.318, p.999-1003, 1999.

MACWILLIAM, I.C. The structure and functions of the yeast cell wall. **Journal of the Institute Brewing**, v.76, p.525-535, 1970.

MAIORKA, A.; SANTIN, E.; SUGETA, S.M.; ALMEIDA, J.G.; MACARI, M. Utilização de prebióticos, probióticos ou simbióticos em dietas para frangos. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v.3, n.1, p.75-82, 2001.

MAJTÁN, J.; KOGAN, G.; KOVACOVÁ, E.; BILIKOVÁ, K.; SIMÚTH, J. Stimulation of TNF- α release by fungal cell wall polysaccharides. **Z. Naturforsch.**, v.60, p.921-926, 2005.

MANACHINI, P.L.; FORTINA, M.G. Production in sea-water of thermostable alkaline proteases by a halotolerant strain of *Bacillus licheniformis*. **Biotechnology Letters**, v.20, p.565-568, 1998.

MANE, R.R.; BAPAT, M. A study of extracellular alkaline protease from *Bacillus subtilis* NCIM 2713. **Indian Journal Exp. Biol**, v.39, p.578-583, 2001.

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

MARQUES, A.; DHONT, J.; SORGELOOS, P.; BOSSIER, P. Immunostimulatory nature of β -glucans and baker's yeast in gnotobiotic *Artemia* challenged tests. **Fish and Shellfish Immunology**, v.20, p.682-692, 2006.

McCARTHY, T.; HANNIFFY, O.; LALOR, E.; SAVAGE, A.V.; TUOHY, M.G. Evaluation of three thermostable fungal endo- β -glucanases from *Talaromyces emersonii* for brewing and food applications. **Process Biochemistry**, v.40, p.1741-1748, 2005.

MEDZHITOV, R.; JANEWAY Jr., C. Innate immunity. **N. Engl. J. Med.**, v.343, p.338-344, 2000.

MIADOKOVÁ, E.; SVIDOVÁ, S.; VLCKOVÁ, V.; DÚHOVÁ, V.; NAD'OVÁ, S.; RAUKO, P.; KOGAN, G. Diverse biomodulatory effects of glucomannan from *Candida utilis*. **Toxicology in vitro**, v.20, p.649-657, 2006.

MIGUEL, J.C.; RODRIGUEZ-ZAS, S.L.; PETTIGREW, J.E. Efficacy of a mannan oligosaccharide (Bio-Mos) for improving nursery pig performance. **Journal Swine Health Prod.**, v.12, p.296-307, 2004.

MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v.31, p.426-428, 1959.

MINATO, K.; KAWAKAMI, S.; NOMURA, K.; TSUCHIDA, H.; MIZUNO, M. An exo β -1,3-glucanase synthesized de novo degrades lentinan during storage of *Lentinula edodes* and diminishes immunomodulating activity of the mushroom. **Carbohydrate Polymers**, v.56, p.279-286, 2004.

MITSUOKA, T. Intestinal flora and human health. **Asia Pacif. Journal Clinical Nutrition**, v.5, n.1, p.2-9, 1996.

MIYANISHI, N.; IWAMOTO, Y.; WATANABE, E.; ODA, T. Induction of TNG-a production from human peripheral blood monocytes with β -1,3-glucan oligomer prepared from laminarin with β -1,3-glucanase from *Bacillus clausii* NM-1. **Journal of Bioscience Bioengineering**, v.95, n.2, p.192-195, 2003.

MIYANISHI, N.; HAMADA, N.; KOBAYASHI, T.; IMADA, C.; WATANABE, E. Purification and characterization of a novel extracellular β -1,3-glucanase produced by *Bacillus clausii* NM-1 isolated from Ezo Abalone *Haliotis discus hannai*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.95, n.1, p.45-51, 2003.

MOSENTHIN, R.; BAUER, E. The potential use of prebiotics in pig nutrition. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON RECENT ADVANCES IN ANIMAL NUTRITION, 2000, Seoul. **Proceedings...**Seoul: Seoul National University, 2000. p.515-528.

MOON, S.H.; PARULEKAR, S.J. A parametric study of protease production in batch and fed-batch cultures of *Bacillus firmus*. **Biotechnology Bioengineering**, v.37, p.467-483, 1991.

MOURÃO, J.L.; PINHEIRO, V.; ALVES, A.; GUEDES, C.M.; PINTO, L.; SAAVEDRA, M.J.; SPRING, P.; KOCHER, A. Effect of mannan oligosaccharides on the performance,

intestinal morphology and cecal fermentation of fattening rabbits. **Animal Feed Science and Technology**, v.126, p.107-120, 2006.

MUKHERJEE, A.S.; ADHIKARI, H.; RAI, S.K. Production of alkaline protease by a thermophilic *Bacillus subtilis* under solid-state fermentation (SSF) condition using *Imperata cylindrical* grass and potato peel as low-cost medium: characterization and application of enzyme in detergent formulation. **Biochemical Engineering Journal**, v.39, n.2, p.353-361, 2008.

NAGASAKI, S.; NISHIOKA, T.; MORI, H.; YAMAMOTO, S. Purification and properties of lytic β -1,3-glucanase from *Flavobacterium dormitator* var. *glucanolyticae*. **Agricultural and Biological Chemistry**, v.40, n.6, p.1059-1067, 1976.

NASCIMENTO, W.C.A; MARTINS, M.L.L. Production and properties of an extracellular protease from thermophilic *Bacillus* sp. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.35, p.91-96, 2004.

NAIDU, K.S.B.; DEVI, K.L. Optimization of thermostable alkaline protease production from species of *Bacillus* using rice bran. **African Journal of Biotechnology**, v.4, n.7, p.724-726, 2005.

NICOLI, J.R.; VIEIRA, L.Q. Probióticos, prebióticos e simbióticos – moduladores do ecossistema digestivo. **Ciência Hoje**, v.28, n.163, p.34-38, 2000.

NORONHA, E.F.; KIPNIS, A.; JUNQUEIRA-KIPNIS, A.P.; ULHOA, C.J. Regulation of 36 KDa β -1,3-glucanase synthesis in *Trichoderma harzianum*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 188, p.19-22, 2000.

NORONHA, E.F.; ULHOA, C.J. Characterization of a 29 KDa β 1,3-glucanase from *Trichoderma harzianum*. **FEMS Microbiology Letters**, v.183, p.119-123, 2000.

NORONHA, E.F.; ULHOA, C.J. Purification and characterization of an endo- β -1,3-glucanase from *Trichoderma harzianum*. **Canadian Journal of Microbiology**, v.42, p.1039-1044, 1996.

OHMIYA, K.; TANIMURA, S.; KOBAYASHI, T.; SHIMIZU S. Application of immobilized alkaline protease to cheese-making. **Journal of Food Science**, v.44, n.6, p.1584-1588, 1979.

OSKOUIE, S.F.G.; TABANDEH, F.; YAKHCHALI, B.; EFTEKHAR, F. Response surface optimization of medium composition for alkaline protease production by *Bacillus clausii*. **Biochemical Engineering Journal**, v.39, p.37-42, 2008.

OUWEHAND, A.C.; DERRIEN, M.; WILLEM DE VOS; TIIHONEN, K.; RAUTONEN, N. Prebiotics and other microbial substrates for gut functionality. **Current Opinion in Biotechnology**, v.16, p.212-217, 2005.

PÁDUA, E.A.; OLIVEIRA, A.C.; SGARBIERI, V.C. Importância da parede celular de levedura (*Saccharomyces cerevisiae*) como fonte de fibra na alimentação. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.20, n.2, p.233-239, 2000.

PANDEY, A.; NIGAM, P.; SOCCOL, C.R.; SOCCOL, V.T.; SINGH, D.; MOHAN, R. Advances in microbial amylases. **Biotechnology Applied Biochemistry**, v.1, p.135-152, 2000.

PATEL, R.K.; DODIA, M.S.; JOSHI, R.H.; SINGH, S.P. Purification and characterization of alkaline protease from a newly isolated haloalkaliphilic *Bacillus* sp. **Process Biochemistry**, v.41, p.2002-2009, 2006.

PATEL, R.; DODIA, M.; SINGH, S.P. Extracellular alkaline protease from a newly isolated haloalkaliphilic *Bacillus* sp.: production and optimization. **Process Biochemistry**, v.40, p.3569-3575, 2005.

PAVLOVA, I.N.; TINYANOVA, N.Z. Isolation and characterization of microorganisms with mannanase activity. **Prikl. Biokhim. Mikrobiol.**, v.16, p.578-583, 1980.

PÉREZ, M.; PIAD, R.; MILIAN, G.; FELIPE, M.G.; FERREIRA, A.; MANCILHA, I.M.; LAURÊNCIO, M.; SILVA, J.B.A. Preparation of a crude enzymatic from *Bacillus licheniformis* E-44 and its evaluation in the hydrolysis of *Saccharomyces cerevisiae* cell walls. **Enzyme and Microbial Technology**, v.40, p.452-455, 2007.

PHADATARE, S.U.; DESHPANDE, V.V.; SRINIVASAN, M.C. High activity alkaline protease from *Conidiobolus coronatus* (NCL 86.8.20): enzyme production and compatability with commercial detergents. **Enzyme and Microbial Technology**, v.15, p.72-76, 1993.

PITSON, S.M.; SEVIOUR, R.J.; McDOUGALL, B.M.; STONE, B.A.; SADEK, M. Purification and characterization of an extracellular (1 $\rightarrow$ 6)- β -glucanase from the filamentous fungus *Acremonium persicinum*. **Biochemistry Journal**, v.316, p.841-846, 1996.

PITSON, S.M.; SEVIOUR, R.J.; McDOUGALL, B.M. Intracellular and cell wall associated β -glucanases and β -glucosidases of *Acremonium persicinum*. **Mycology Research**, v.10, p.1217-1224, 1999.

POTUMARTHI, R.; SUBHAKAR, C.; JETTY, A. Alkaline protease production by submerged fermentation in stirred tank reactor using *Bacillus licheniformis* NCIM-2042: effect of aeration and agitation regimes. **Biochemical Engineering Journal**, v.34, p.185-192, 2007.

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

PURI, S.; BEG, Q.K.; GUPTA, R. Optimization of alkaline protease production from *Bacillus* sp. by response surface methodology. **Current Microbiology**, v.44, p.286-290, 2002.

RAJU, M.V.L.N.; DEVEGOWDA, G. Influence of esterified-glucomannan on performance and organ morphology, serum biochemistry and haematology in broilers exposed to individual and combined mycotoxicosis (aflatoxin, ochratoxin and T-2 toxin). **British Poultry Science**, v.41, p.640-650, 2000.

RAMNANI, P.; KUMAR, S.S.; GUPTA, R. Concomitant production and downstream processing of alkaline protease and biosurfactant from *Bacillus licheniformis* RG1: bioformulation as detergent additive. **Process Biochemistry**, v.40, p.3352-3359, 2005.

RANA, D.S.; THÉODORE, K.; NAIDU, G.S.N.; PANDA, T. Stability and kinetics of β -1,3-glucanase from *Trichoderma harzianum*. **Process Biochemistry**, v.39, p.149-155, 2003.

RAO, B.; TANKSALE, A.M.; GHATGE, M.S.; DESHPANDE, V.V. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v.62, n.3, p.597-635, 1998.

RAYMOND, S.L.; SMITH, T.K.; SWAMY, H.V.L.N. Effects of feeding a blend of grains naturally contaminated with *Fusarium* mycotoxins on feed intake, serum chemistry and hematology of horses, and the efficacy of polymeric glucomannan mycotoxin adsorbent. **Journal of Animal Science**, v.81, p.2123-2130, 2003.

REDDY, L.V.A.; WEE, Y.; YUN, J.; RYU, H. Optimization of alkaline protease production by batch culture of *Bacillus* sp. RKY3 through Plackett-Burman and response surface methodological approaches. **Bioresource Technology**, v.99, p.2242-2249, 2008.

ROBBINS, E.A.; SEELEY, R.D. Cholesterol lowering effect of dietary yeast and yeast fractions. **Journal Food Science**, v.42, p.694-698, 1977.

ROBERFROID, M.B. Functional effects of food components and the gastrointestinal system: chicory fructooligosaccharides. **Nutrition Reviews**, v.54, p.S38-S42, 1996.

ROZEBOOM, D.W.; SHAW, D.T.; TEMPELMAN, R.J.; MIGUEL, J.C.; PETTIGREW, J.E.; CONNOLLY, A. Effects of mannan oligosaccharide and an antimicrobial product in nursery diets on performance of pigs reared on three different farms. **Journal Animal Science**, v.83, p.2637-2644, 2005.

SAF-AGRI. **Levedura para rações**. Rio de Janeiro, [s.d.]. Disponível em: <<http://www.saf-agri.com/portuguese/yeast.htm>>. Acesso em: 25 de abril de 2006.

SALMINEN, S. Functional dairy foods with *Lactobacillus* strain GG. **Nutrition Rev.**, v.54, n.11, p.S99-S101, 1996.

SANTOS, T.; VILLANUEVA, R.; NOMBELA, N. Production and catabolite repression of *Penicillium italicum* β -glucanases. **Journal of Bacteriology**, v.129, n.1, p.52-58, 1977.

SANTUCCI, M.C.C.; ALVIM, I.D.; FARIA, E.V.; SGARBIERI, V.C. Enriquecimento de biscoitos tipo água e sal como extrato de levedura (*Saccharomyces* sp.). **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.23, n.3, p.441-446, 2003b.

SCOTT, J.H.; SCHEKMAN, R. Lyticase: endoglucanase and protease activities that act together in yeast cell lysis. **Journal of Bacteriology**, v.142, n.2, p.414-423, 1980.

SEIXAS, A.C.M. *et al.* Produção e utilização de *Bacillus subtilis* em tratamento de efluentes líquidos. **Base Alimentarium**. Produção Científica da Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, 2006.

SELLAMI-KAMOUN, A.; HADDAR, A.; ALI, N.E.; GHORBEL-FRIKHA, B.; KANOUN, S.; NASRI, M. Stability of thermostable alkaline protease from *Bacillus licheniformis* RP1 in commercial solid laundry detergent formulations. **Microbiological Research**, v.163, p.299-306, 2008.

SGARBIERI, V.C.; ALVIM, I.D.; VILELA, I.S.D.; BALDINI, V.L.S.; BRAGAGNOLO, N. Produção piloto de derivados de levedura (*Saccharomyces* sp.) para uso como

ingrediente na formulação de alimentos. **Brazilian Journal Food Technology**, v.2, n.1-2, p.119-125, 1999.

SHETTY, P.H.; JESPERSEN, L. *Saccharomyces cerevisiae* and lactic acid bacteria as potential mycotoxin decontaminating agents. **Trends in Food Science and Technology**, v.17, p.48-55, 2006.

SHIMOI, H.; MURANAKA, Y.; SATO, S.; SAITO, K.; TADENUMA, M. Purification of the enzymes responsible for the lysis of yeast cell by *Rarobacter faecitabidus*. **Agricultural and Biological Chemistry**, v.55, p.371-378, 1991b.

SHU, C.; XU, C.; LIN, E. Production, purification and partial characterization of a novel endo- β -1,3-glucanase from *Agaricus brasiliensis*. **Process Biochemistry**, v.41, p.1229-1233, 2006.

SHUMI, W.; TOWHID-HOSSAIN, M.; ANWAR, M.N. Proteolytic activity of a bacterial isolate *Bacillus fastidiosus* den Dooren de Jong. **Journal Biol. Rev.**, v.4, n.3, p.370-374, 2004.

SILVA, L.P.; NÖRNBERG, J.L. Prebióticos na nutrição de não ruminantes. **Ciência Rural**, v.33, n.5, p.983-990, 2003.

SILVA, C.R.; DELATORRE, A.B.; MARTINS, M.L.L. Effect of the culture conditions on the production of an extracellular protease by thermophilic *Bacillus* sp. and some properties of the enzymatic activity. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.38, n.2, p.253-258, 2007.

SINHA, N.; SATYANARAYANA, T. Alkaline protease by thermophilic *Bacillus licheniformis*. **Indian Journal Microbiol.**, v.31, p.425-430, 1991.

SNEATH, P.H.A. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Baltimore, Md.: William & Wilkins Co., v.2, p.1104, 1986.

SOARES, G.A.M. **Enzimas que lisam a parede celular de leveduras – Clonagem e sequenciamento do gene da β 1,3-glucanase lítica de *Cellulomonas cartae* 191**.2002. Tese (Doutorado) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade de Campinas, Campinas, 2002.

SOOKKHEO, B.; SINCHAIKUL, S.; PHUTRAKUL, S.; CHEN, S.T. Purification and characterization of the highly thermostable proteases from *Bacillus stearothermophilus* TLS33. **Prot. Exp. Pur.**, v.20, p.142-151, 2000.

SOUISSI, N.; ELLOUZ-TRIKI, Y.; BOUGATEF, A.; BLIBECH, M.; NASRI, M. Preparation and use of media for protease-producing bacterial strains based on by-products from Cuttlefish (*Sepia officinalis*) and wastewaters from marine-products processing factories. **Microbiological Research**, in press, 2008.

SPRING, P.; WENK, C.; DAWSON, K.A.; NEWMAN K.E. The effects of dietary mannaoligosaccharides on cecal parameters and the concentrations of enteric bacteria in the ceca of salmonella-challenged broiler chicks. **Poultry Science**, v. 79, n.2, p.205-211, 2000.

SROBÁROVÁ, A.; KOGAN, G.; EGED, S. Yeast polysaccharide affects fusaric acid content in maize root rot. **Chemistry Biodiversity**, v.2, p.1685-1690, 2005.

STRAUCH, M.A.; HOCH, J.A. Transition-state regulators: sentinels of *Bacillus subtilis* post-exponential phase gene expression. **Molecular Microbiology**, v.7, p.337-342, 1993.

STRICKLING, J.A. *et al.* Evaluation of oligosaccharide addition to dog diets: influences on nutrient digestion and microbial populations. **Animal Feed Science Technology**, Amsterdam, v.86, n.2, p.205-219, 2000.

SUNVOLD, G.D. *et al.* In vitro fermentation of cellulose, beet pulp, citrus pulp, and citrus pectin using fecal inoculum from cats, dogs, horses, humans, and pigs and ruminal fluid from cattle. **Journal of Animal Science**, Savoy, v.73, p.3639-3648, 1995.

TARI, C.; GHENCKAL, H.; TOKATLI, F. Optimization of a growth medium using a statistical approach for the production of an alkaline protease from a newly isolated *Bacillus* sp. L21. **Process Biochemistry**, v.41, p.659-665, 2006.

THE GENUS BACILLUS. Todar's Online Textbook of Bacteriology, 2005. Disponível em: ? <http://www.textbookofbacteriology.net/Bacillus.html>?. Acesso em: 20 setembro de 2007.

TORRECILLAS, S.; MAKOL, A.; CABALLERO, M.J.; MONTERO, D.; ROBAINA, L.; REAL, F.; SWEETMAN, J.; TORT, L.; IZQUIERDO, M.S. Immune stimulation and improved infection resistance in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed mannan oligosaccharides. **Fish and Shellfish Immunology**, v.23, n.5, p.969-981, 2007.

UFRJ. **Proteases de Microrganismos**, [s.d.]. Disponível em: ? <http://www.protease.ufrj.br/ProteaseApres.htm>?. Acesso em: 03 de março de 2008.

ÚNICA. **União da Indústria de Cana de Açúcar**, 2008. Disponível em: ? <http://www.portalunica.com.br/portalunica/index>?. Acesso em: 03 de maio de 2008.

U.S. Environmental Protection Agency – *Bacillus licheniformis* strain **SB3086 (006492)** **fact sheet.**, 2003. Disponível em: ? www.epa.gov/pesticides/biopesticides/ingredients/factsheet_006492.htm?. Acesso em: 05 de dezembro de 2007.

UYAR, F.; BAYSAL, Z. Production and optimization of process parameters for alkaline protease production by a newly isolated *Bacillus* sp. under solid-state fermentation. **Process Biochemistry**, v.39, p.1893-1898, 2004.

VASQUEZ-GARCIDUENAS, S.; LEAL-MORALES, C.A.; HERRERA-ESTRELLA, A. Analysis of the β -1,3-glucanolytic system of the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. **Applied Environmental Microbiology**, v.64, n.3, p.1442-1446, 1998.

VEITH, B.; HERZBERG, C.; STECKEL, S.; FEESCHE, J.; MAURER, K.H.; EHRENREICH, P.; BÄUMER, S.; HENNE, A.; LIESEGANG, H.; MERKL, R.; EHRENREICH, A.; GOTTSCHALK, G. The complete genome sequence of *Bacillus licheniformis* DSM13, an organism with great industrial potential. **Journal Molecular Microbiology Biotechnology**, v.7, n.4, p.204-211, 2004.

VILELA, E.S.D.; SGARBIERI, V.C.; ALVIM, I.D. Determinação do valor protéico de células íntegras, autolisado total e extrato de levedura (*Saccharomyces sp.*). **Revista de Nutrição**, v.13, n.3, p.185-192, 2000a.

VILELA, E.S.D.; SGARBIERI, V.C.; ALVIM, I.D. Valor nutritivo da biomassa de células íntegras, do autolisado e do extrato de levedura originária de cervejaria. **Revista de Nutrição**, v.13, n.2, p.127-134, 2000b.

WALKER, W.A.; DUFFY, L.C. Diet and bacterial colonization: Role of probiotics and prebiotics. **Journal Nutrition Biochemistry**, v.9, n.2, p.668-675, 1998.

WARD, J.B.; PERKINS, H.R. The purification and properties of two staphylolytic enzymes from *Streptomyces griseus*. **Biochemistry Journal**, v.106, p.69-75, 1968.

WARREN, R.A.J. Microbial hydrolysis of polysaccharides. **Annual Reviews in Microbiology**, v.50, p.183-212, 1996.

WHITE, L.A.; NEWMAN, M.C.; CROMWELL, G.L.; LINDEMANN, M.D. Brewers dried yeast as a source of mannan oligosaccharides for weanling pigs. **Journal Animal Science**, v.80, p.2619-2628, 2002.

WILLMENT, J.A.; MARSHALL, A.S.; REID, D.M.; WILLIAMS, D.L.; WONG, S.Y.; GORDON, S.; BROWN, G.D. The human beta-glucan receptor is widely expressed and functionally equivalent to murine Dectin-1 on primary cells. **European Journal Immunology**, v.35, p.1539-1547, 2005.

XIAO, Z.; TRINCADO, C.A.; MURTAUGH, M.P. β -glucan enhancement of Tcell IFN γ response in swine. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v.102, p.315-320, 2004.

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

YAMAMOTO, N.; HASUO, T.; TERAUCHI, T.; SAITO, K.; TADENUMA, M. Studies on yeast-lysing microorganism (3). Habitats of yeast-lysing microorganisms in waste water treatment process of food factory. **Journal of Brewing Society of Japan**, v.79, p.828-833, 1984.

YENG, J.K.; SHIH, I.L.; TZENG, Y.M.; WANG, S.L. Production and purification protease from a *Bacillus subtilis* that can deproteinize crustacean wastes. **Enzyme and Microbial. Technol.**, v.26, p.287-301, 2000.

YIANNIKOURIS, A.; FRANCOIS, J.; PUGHON, L.; DUSSAP, C.G.; JEMINET, G.; BERTIN, G.; JOUANY, J.P. Influence of pH on complexing of model β -D-glucans with zearalenone. **Journal of Food Protection**, v.67, n.12, p.2741-2746, 2004d.

ZIEMER, C.J.; GIBSON, G.R. An overview of probiotics, prebiotics and synbiotics in the functional food concept: perspectives and future strategies. **International Dairy Journal**, v.8, p.473-479, 1998.

ZLOTNIK, H.; FERNANDEZ, M. P.; BOWERS, B.; CABIB, E. *Saccharomyces cerevisiae* mannoproteins from an external cell wall layer that determines wall porosity. **Journal of Bacteriology**, v.159, n.3, p.1018-1026, 1984.

APÊNDICE

Condições ótimas de lise para diferentes sistemas enzimáticos líticos produzidos por microrganismos (GIESE; BARBOSA; SILVA, 2005).

Microrganismos	Enzimas	pH ótimo	Temperatura ótima (°C)	Microrganismos lisados
<i>Arthrobacter luteus</i>	β -1,3-glucanase zimoliase	5,0-6,5 7,5	45-60 30-35	<i>Saccharomyces</i> sp., <i>Candida</i> sp., <i>Hansenula</i> sp., <i>Pichia</i> sp e outras leveduras
<i>Oerskovia xanthineolytica</i>	protease	9,0-10,0	35	<i>Saccharomyces fragilis</i> NCYC 587
<i>Arthrobacter</i> sp.G1	- - -	- - -	- - -	<i>Torulopsis colliculosa</i> NCYC 141 <i>Candida utilis</i> NCYC 707
<i>Cellulomonas cartae</i> 191	β -1,3-glucanase protease	4,5 8,0	55 50	<i>Saccharomyces capensis</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i> KL 88 <i>Candida glabrata</i> e outras leveduras
<i>Cytophaga</i> NCIB 9497	Atividade na célula de levedura integral	9,0	45-55	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Bacillus</i> sp. <i>Escherichia coli</i>
<i>Oerskovia</i> CK	β -1,3-glucanase protease Atividade na célula de levedura integral	-- -- 9,0	35-40 60 35-40	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>Rhizoctonia</i> sp.	β -1,3-glucanase protease Atividade na célula de levedura integral	5,5 6,5 6,0	55-60 40 40	<i>Saccharomyces</i> sp. <i>Candida</i> sp. <i>Hansenula</i> sp.
<i>Streptomyces</i> sp. 1228	β -1,3-glucanase	5,5-6,0	50-55	<i>Candida utilis</i> NCYC 707 <i>Saccharomyces carlsbergensis</i> <i>Schizosaccharomyces pombe</i>