



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

ANELIZE BAUERMEISTER

**PRODUÇÃO DE BETA-(1→3)-GLUCANASE E BETA-  
GLICOSIDASE PELO ISOLADO DE LEVEDURA 1WA1  
UTILIZANDO-SE BIOMASSA MICELIAL DE *BOTRYOSPHAERIA*  
*RHODINA* MAMB-05 COMO SUBSTRATO**

ANELIZE BAUERMEISTER

**PRODUÇÃO DE BETA-(1→3)-GLUCANASE E BETA-  
GLICOSIDASE PELO ISOLADO DE LEVEDURA 1WA1  
UTILIZANDO-SE BIOMASSA MICELIAL DE *BOTRYOSPHERIA*  
*RHODINA* MAMB-05 COMO SUBSTRATO**

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Biotecnologia, do Departamento de Bioquímica e Biotecnologia – CCE, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito à obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra Aneli de Melo  
Barbosa.

Londrina  
2010

ANELIZE BAUERMEISTER

**PRODUÇÃO DE BETA-(1→3)-GLUCANASE E BETA-GLICOSIDASE  
PELO ISOLADO DE LEVEDURA 1WA1 UTILIZANDO-SE BIOMASSA  
MICELIAL DE *BOTRYOSPHERA RHODINA* MAMB-05 COMO  
SUBSTRATO**

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Biotecnologia, do Departamento de Bioquímica e Biotecnologia – CCE, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito à obtenção do título de Mestre.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Profa. Dra. Aneli de Melo Barbosa  
UEL – Londrina - PR

---

Prof. Dr. André Luiz Martinez de Oliveira  
UEL – Londrina - PR

---

Prof. Dr. Silvio Silvério da Silva  
USP – São Paulo - SP

Londrina, 22 de março de 2010.

*Dedico esta dissertação aos meus exemplos de vida Alzira Bortolucci Bauermeister e João Jorge Bauermeister que sempre me deram apoio e me estimularam a dar este grande passo. Estas duas pessoas com muita sabedoria, discernimento e bom senso estiveram ao meu lado me encorajando nas horas difíceis e me aplaudindo nos momentos de glória.*

*Obrigada por serem meus pais.*

## **AGRADECIMENTOS**

Muito agradeço,

À Deus que me deu força;

À orientadora dessa dissertação Profa. Dra. Aneli de Melo Barbosa por toda dedicação, sabedoria, compreensão e, acima de tudo, exigência. Gostaria de ratificar a sua competência, correções, e sugestões que fizeram com que concluíssemos este trabalho.

À Profa. Dra. Maria Inês Rezende, co-orientadora desta dissertação, por sua colaboração com sugestões e principalmente por sua amizade;

Aos meus pais João Jorge e Alzira B. Bauermeister que sempre me deram amor e me apoiaram, valorizando meus potenciais;

Ao meu namorado Diego Soares Domingues pelo amor e carinho, sempre me dando força nas horas de dificuldade;

Aos meus irmãos João Rafael e Carlyne Liziane por serem especiais na minha vida;

Aos amigos Ismael, Gabriel e Carla pela colaboração e dedicação neste trabalho;

A todos os meus amigos e amigas que sempre estiveram presentes e que me proporcionaram momentos de distração;

Aos técnicos de laboratório Nelson e Sérgio, pela colaboração neste trabalho;

Ao laboratório grupo de pesquisa de Desenvolvimento de

Instrumentação, Automação e Metodologia Analítica e a Profa. Dra. Suzana Lucy Nixdorf;

Ao Laboratório de Microscopia Eletrônica e Microanálise;

A todos que direta ou indiretamente contribuíram neste trabalho;

À Universidade Estadual de Londrina e ao Programa de Mestrado em Biotecnologia pela oportunidade;

À CAPES pela bolsa concedida e pelo apoio financeiro (CAPES/DGU/Projeto N°153/08) para o desenvolvimento deste trabalho.

BAUERMEISTER, Anelize. **Produção de beta-(1→3)-glucanase e beta-glicosidase pelo isolado de levedura 1WA1 utilizando-se biomassa micelial de *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 como substrato.** 2010. 108 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2010.

## RESUMO

Enzimas microbianas têm sido aplicadas em várias indústrias para diferentes processos. Beta-(1→3)-glucanases são hidrolases que degradam ligações glicosídicas beta-1,3 e têm sido descritas como sendo do tipo *exo*-(EC 3.2.1.58) e *endo*-(EC 3.2.1.39). As beta-glicosidases (EC 3.2.1.21) também pertencem ao complexo enzimático glucanólítico e hidrolisam ligações glicosídicas de dissacarídeos, oligossacarídeos, e ligações entre glucose e grupos agliconas que ocorrem em muitos compostos fenólicos e aromáticos voláteis presentes em frutas. Estas enzimas hidrolíticas são produzidas por fungos filamentosos e leveduras e podem ser úteis em vários processos biotecnológicos, incluindo-se a produção de bebidas como vinhos e sucos de frutas, para melhorar as suas características organolépticas. Neste trabalho, 108 micro-organismos foram isolados da filosfera de uvas produzidas no norte do Estado do Paraná e do Rio Grande do Sul. Os isolados foram selecionados quanto à produção de beta-(1→3)-glucanase e beta-glicosidase utilizando-se o exopolissacarídeo (EPS) botriosferana, uma beta-(1→3; 1→6)-D-glucana produzida pelo fungo ascomiceto *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05. O melhor micro-organismo produtor dos maiores títulos de enzima foi uma levedura, 1WA1, isolada de uva Moscato Bailey na região de Londrina. Pó de Micélio (1g % m/v) de *B. rhodina* MAMB-05 crescido nas condições ótimas para a produção de botriosferana, foi o melhor substrato para a produção de beta-(1→3)-glucanase pelo isolado 1WA1, em 96 h a 28 °C (180 rpm). A atividade da beta-(1→3)-glucanase foi otimizada e os ensaios foram desenvolvidos incubando-se a enzima em tampão citrato fosfato pH 4,5 com laminarina 0,4 % (m/v) como substrato, por 20 minutos a 60°C. A atividade foi determinada pela quantificação dos açúcares redutores liberados. Para o ensaio da atividade da beta-glicosidase, a enzima foi incubada em tampão acetato de sódio (pH 4,0) a 75°C por 20 min, utilizando-se *p*-NPG (*p*-nitrofenil beta-D-glicopiranosídeo) como substrato, e quantificando-se o *p*-nitrofenol liberado. Os valores de  $K_M$  aparente da beta-(1→3)-glucanase e da beta-glicosidase foram 0,09 mg laminarina /mL e 0,04 mg *p*-NPG /mL, respectivamente, e os respectivos  $V_{máx}$  foram 1,07 e 0,011  $\mu$ mol/min. A beta-(1→3)-glucanase da levedura foi inibida fortemente por  $Mn^{++}$  e parcialmente por  $Cu^{++}$  e  $Zn^{++}$ , enquanto que a beta-glicosidase foi também inibida por  $Mn^{++}$  e  $Cu^{++}$  e parcialmente por  $Zn^{++}$ . Um planejamento fatorial  $3^2$  completo e análise por metodologia de superfície de resposta foram desenvolvidos para otimizar a produção de beta-(1→3)-glucanase e beta-glicosidase, avaliando-se as variáveis:  $X_1$  (concentração de biomassa micelial de *B. rhodina*) de 0,5 a 1,5 (g % m/v), e  $X_2$  (pH inicial do meio de cultivo) de 2,5 a 7,5. As condições ótimas de cultivo foram: 1,5 g% de biomassa micelial, pH inicial 2,5 durante 96 h a 28 °C e 180 rpm. A atividade específica preditiva da produção de beta-(1→3)-glucanase foi 5,92 U/mg, e o valor experimental obtido foi 5,96 U/mg. Para a beta-glicosidase o valor preditivo foi 1,73 U/mg, enquanto que o experimental foi 1,77 U/mg, nas condições de cultivo descritas para a produção da beta-(1→3)-glucanase. A microscopia eletrônica de varredura mostrou que o isolado de levedura (1WA1) apresentou evidências de degradação na parede celular do micélio do *B. rhodina* MAMB-05, usado como substrato para produzir ambas as enzimas estudadas neste trabalho.

**Palavras-chave:** Beta-(1→3)-D-glucanas. Produção de enzima. Leveduras. Vinho. Botriosferana.

BAUERMEISTER, Anelize. **Production of beta-(1→3)-glucanase and beta-glicosidase by the yeast isolate 1WA1 utilizing micelial biomass of *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 as substrate.** 2010. 108 f. Dissertation (Master's degree in Biotechnology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina 2010.

## ABSTRACT

Microbial enzymes find applications in several industries for many different processes. Beta-(1→3)-glucanases are hydrolases that degrade beta-1,3-glucosidic linkages and have been described as *exo*-(EC 3.2.1.58) and *endo*- (EC 3.2.1.39) acting type. Beta-glucosidases (EC 3.2.1.21) also belong to the beta-glucanolytic enzymatic complex, and hydrolyse glucosidic linkages of disaccharides, oligosaccharides, and the linkages between glucose and aglycone groups that occur in many volatile phenolic and aromatic compounds present in fruits. These hydrolytic enzymes are produced by filamentous fungi and yeasts, and can be useful in biotechnological process, including the production of wines and fruit beverages to improve their organoleptic characteristics. In this work, 108 microorganisms were isolated from the phyllosphere on grapes collected in the wine growing areas in the north of the state of Paraná, and in Rio Grande do Sul. The isolates were screened for beta-(1→3)-glucanases and beta-glicosidase using the exopolysaccharide (EPS) botryosphaeran (beta-(1→3)(1→6)-D-glucan) from the ascomycete, *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05. The microorganism producing highest enzyme titres was a yeast, isolate 1WA1, isolated from Moscato Bailey grapes taken from the Londrina region. Ground mycelium (1% w/v) from *B. rhodina* MAMB-05 grown under optimal conditions for botryosphaeran production was found to be the best substrate to produce beta-(1→3)-glucanases by the isolate 1WA1 in 96 h at 28 °C (180 rpm). Beta-(1→3)-glucanase activity was optimized, and assays performed by incubating enzyme in citrate phosphate buffer (pH 4.5) with laminarin 0.4 % (w/v) as the substrate for 20 min at 60°C. Activity was determined by measuring the reducing sugars released. For assay of beta-glucosidase activity, enzyme was incubated in sodium acetate buffer (pH 4.0) at 75 °C for 20 min using *p*-NPG (*p*-nitrophenyl-beta-D-glucopyranoside) as substrate, and measuring the amount of *p*-nitrophenol released. The apparent  $K_M$  for beta-(1→3)-glucanase and beta-glucosidase was 0.09 mg laminarin /mL and 0.04 mg *p*-NPG /mL, resp., and the respective  $V_{max}$  were 1.07 and 0.011  $\mu\text{mol}/\text{min}$ . The yeast beta-(1→3)-glucanase was strongly inhibited by  $\text{Mn}^{++}$ , and partially by  $\text{Cu}^{++}$  and  $\text{Zn}^{++}$ , while the beta-glucosidase was also inhibited by  $\text{Mn}^{++}$  and  $\text{Cu}^{++}$ , but partially by  $\text{Zn}^{++}$ . A completed experimental  $3^2$  factorial design and analysis by response surface methodology was developed to optimize beta-(1→3)-glucanase and beta-glucosidase production evaluating the variables:  $X_1$  (concentration of mycelial biomass of *B. rhodina*) from 0.5 to 1.5, % w/v), and  $X_2$  (nutrient medium initial pH, from 2.5 to 7.5). The optimal culture conditions were: 1.5 % of mycelium biomass, initial pH 2.5 over 96 h cultivation at 28 °C, and 180 rpm. The predicted specific activity of beta-(1→3)-glucanase production was 5.92 U/mg, and the experimental value obtained was 5.96 U/mg. For beta-glucosidase the predicted value was 1.73 U/mg while the experimental value obtained was 1.77 U/mg under the same culture conditions described for beta-(1→3)-glucanase production. Scanning electron microscopy revealed that the yeast isolate (1WA1) showed evidences of cell wall degradation of the mycelium *B. rhodina* MAMB-05 used as substrate to produce both of the enzymes studied in this work.

**Keywords:** Beta-(1→3)-D-glucans. Enzyme production. Yeasts. Wine. Botryosphaeran.

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Micro-organismos produtores de beta-glucanases e beta-glicosidases.....	21
<b>Tabela 2</b> – Fungos e leveduras produtores de beta-(1→3)glucanases, tipos de meios de cultivo, tempo de cultivo e métodos de determinação desta enzima.....	25
<b>Tabela 3</b> – Produção de beta-glicosidases por fungos, tipos de meios de cultivo, tempo de cultivo e substrato utilizado para determinar a atividade da enzima .....	33
<b>Tabela 4</b> – Leveduras espanholas provenientes da UCLM.....	39
<b>Tabela 5</b> – Variáveis independentes e níveis de variação para a produção de beta-(1→3)-glucanase e beta-glicosidase.....	49
<b>Tabela 6</b> – Sistema de incubação para determinação da atividade da enzima beta-(1→3)-glucanase.....	50
<b>Tabela 7</b> – Sistema de incubação para determinação da atividade da enzima beta-glicosidase.....	52
<b>Tabela 8</b> – Relação das leveduras isoladas de uvas e mosto .....	57
<b>Tabela 9</b> – Relação dos fungos filamentosos isolados de uvas e mosto .....	58
<b>Tabela 10</b> – Atividade de beta-(1→3)-glucanase e beta-glicosidase das leveduras isoladas de uvas de Rancho Alegre, Rio Grande do sul, Marialva e leveduras espanholas, cultivadas em 0,2 % (m/v) de botriosferana. ....	61
<b>Tabela 11</b> – Atividade de beta-(1→3)-glucanase e beta-glicosidase de leveduras isoladas de uvas de Warta, cultivadas em 0,1 % (m/v) de botriosferana .....	63
<b>Tabela 12</b> – Comparação da produção de beta-(1→3)-glucanase e beta-glicosidase pelos isolados de levedura pré-selecionados cultivados em botriosferana 0,06 % (m/v) .....	64
<b>Tabela 13</b> – Comparação da atividade de beta-(1→3)-glucanase, dos extratos enzimáticos dos isolados de leveduras 1WA1,1WA2, 2WS2, 3WS5, em pH 3,5 e em 15 % de etanol .....	66
<b>Tabela 14</b> – Comparação da produção de beta-(1→3)-glucanase pelas leveduras 1WA1, 1WA2, 2WS2, 3WS5, nos substratos botriosferana, celobiose, biomassa micelial de <i>B. rhodina</i> “in natura” e desnaturada, em cultivos submersos durante 96 h.....	68
<b>Tabela 15</b> – Comparação da produção de beta-glicosidase pelas leveduras 1WA1, 1WA2, 2WS2, 3WS5, nos substratos botriosferana,	

celobiose, biomassa micelial de <i>B. rhodina</i> “in natura” e desnaturada, em cultivos submersos durante 96 h.....	69
<b>Tabela 16</b> – Avaliação do efeito de diferentes concentrações de biomassa de <i>B. rhodina</i> “in natura” na produção de beta-(1→3)-glucanase e beta-glicosidase pela levedura 1WA1 .....	72
<b>Tabela 17</b> – Açúcares totais e redutores solúveis iniciais e residuais dos cultivos da levedura 1WA1 em diferentes concentrações de biomassa de <i>B. rhodina</i> .....	72
<b>Tabela 18</b> – Açúcares totais e redutores solúveis residuais, proteínas totais solúveis, e pH final dos extratos enzimáticos obtidos durante a curva de crescimento da levedura 1WA1 em 1 % (m/v) de <i>Botryosphaeria rhodina</i> . .....	75
<b>Tabela 19</b> – Comparação de KM aparente e VMÁX da beta-glicosidase para p-NPG .....	85
<b>Tabela 20</b> – Efeito da presença de diferentes sais de cloreto e de sulfato na atividade da beta-(1→3)-glucanase .....	85
<b>Tabela 21</b> – Efeito da presença de diferentes sais de cloreto e de sulfato na atividade da beta-glicosidase .....	86
<b>Tabela 22</b> – Respostas obtidas do delineamento fatorial 32 para a produção da beta-(1→3)-glucanase e da beta-glicosidase pela levedura 1WA1. ....	87
<b>Tabela 23</b> – Análises dos efeitos e interações para a produção de beta-(1→3)-glucanase pela levedura 1WA1.....	88
<b>Tabela 24</b> – Análise de variância (ANOVA) para a produção de beta-(1→3)-glucanase pela levedura 1WA1.....	88
<b>Tabela 25</b> – Análises dos efeitos e interações para a produção de beta-glicosidase pela levedura 1WA1 .....	90
<b>Tabela 26</b> – Análise de variância (ANOVA) para a produção de beta-glicosidase pela levedura 1WA1 .....	91

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Estrutura química da botriosferana [beta (1→3),(1→6)-D-glucana], apresentando as substituições por unidades glicosídicas e/ou gentiobiosídicas a cada cinco unidades na cadeia principal ..... 19
- Figura 2** – Esquema estrutural representativo da hidrólise da beta-(1→3)-glucana pela beta-(1→3)-glucanase ..... 22
- Figura 3** – Representação estrutural condensada da Laminarina, uma beta-(1→3)-glucana produzida pela alga *Laminaria digitata* ..... 23
- Figura 4** – Halo de atividade de beta-(1→3)-glucanase da levedura 1WA1 ..... 59
- Figura 5** – Atividade específica da beta-(1→3)-glucanase da levedura 1WA1, inoculada a partir de meio sólido ou líquido, e cultivada na presença e na ausência de Tween 80 ..... 70
- Figura 6** – Atividade específica da beta-glicosidase da levedura 1WA1, inoculada a partir de meio sólido ou líquido, e cultivada na presença e ausência de Tween 80 ..... 70
- Figura 7** – Produção de beta-(1→3)-glucanase (A) e beta-glicosidase (B), pelo isolado de levedura 1WA1 em 1 % de biomassa micelial de *B. rhodina* ..... 74
- Figura 8** – Cinética de tempo da atividade das enzimas beta-(1→3)-glucanase (A) e beta-glicosidase (B) presentes no extrato enzimático do isolado de levedura 1WA1, obtido de cultivos com biomassa micelial de *B. rhodina* como substrato ..... 76
- Figura 9** – Atividade da beta-(1→3)-glucanase em diferentes pH e tampões (A) Glicina, (B) Acetato de sódio, (C) Citrato de sódio e (D) Citrato-fosfato ..... 79
- Figura 10** – Atividade da beta-glicosidase em diferentes pHs e tampões (A) Glicina, (B) Acetato de sódio, (C) Citrato de sódio e (D) Citrato-fosfato ..... 80
- Figura 11** – (A) Atividade da beta-(1→3)-glucanase em diferentes temperaturas e (B) estabilidade em tampão citrato-fosfato pH

4,5 (□) 30°C, (□) 40°C, (□) 45°C, (□) 50°C, (□) 55°C e (□) 60°C .....	81
<b>Figura 12</b> – Atividade da beta-glicosidase em diferentes temperaturas .....	82
<b>Figura 13</b> – (A) Curvas de Michaelis-Menten e (B) Lineweaver-Burk (KM aparente), da beta-(1→3)-glucanase para laminarina.....	83
<b>Figura 14</b> – (A) Curvas de Michaelis-Menten e (B) Lineweaver-Burk (KM aparente), da beta-glicosidase para pNPG .....	84
<b>Figura 15</b> – Gráfico de Pareto determinado pelo planejamento fatorial para produção de beta-(1→3)-glucanase pela levedura 1WA1.....	89
<b>Figura 16</b> – Superfície de Resposta e curvas de níveis com os resultados do delineamento fatorial 32 para a produção de beta-(1→3)-glucanase.....	89
<b>Figura 17</b> – Gráfico de Pareto determinado pelo planejamento fatorial para produção de beta-glicosidase pela levedura 1WA1 .....	91
<b>Figura 18</b> – Superfície de Resposta e curvas de níveis com os resultados do delineamento fatorial 32 para a produção de beta-glicosidase .....	92
<b>Figura 19</b> – MEV da levedura 1WA1 cultivada em 1 % (m/v) de glucose em diferentes aumentos (A) 2400x; (B) 12000x; (C) 20000x.....	93
<b>Figura 20</b> – MEV do fungo filamentoso <i>B. rhodina</i> “In vivo” (A) 1000x; (B) 12000x .....	93
<b>Figura 21</b> – MEV das hifas de <i>B. rhodina</i> desidratadas (liofilizadas) (A) 1000x; (B) 12000x.....	94
<b>Figura 22</b> – MEV hifas do <i>Botryosphaeria rhodina</i> após autoclavação (A) 1000x; (B) 12000.....	95
<b>Figura 23</b> – MEV do cultivo da levedura 1WA1 em biomassa do <i>B. rhodina</i> , após 96 horas (A) 1200x; (B) 12000x.....	95

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	16
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b>	17
2.1	OBJETIVO GERAL	17
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
<b>3</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	18
3.1	BETA-GLUCANAS	18
3.2	BETA-(1→3)-GLUCANASES	20
3.2.1	Produção de Beta-(1→3)-Glucanases	24
3.2.2	Propriedades das Beta-(1→3)-Glucanases	26
3.2.3	Aplicações das Beta-Glucanases	27
3.2.3.1	Aplicação das beta-glucanases para obtenção de diferentes oligossacarídeos	28
3.2.3.2	Caracterização de parede celular de micro-organismos	28
3.2.3.3	Aplicação das beta-glucanases no controle biológico	29
3.2.3.4	Aplicação de beta-glucanases em suplementos alimentares	30
3.2.3.5	Aplicação de beta-glucanases no processo de vinificação	31
3.3	BETA-GLICOSIDASES	32
3.4	VINHO	34
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	38
4.1	MATERIAL	38
4.1.1	Reagentes	38
4.1.2	Equipamentos	38
4.2	MÉTODOS GERAIS	39
4.2.1	Micro-organismos	39
4.2.2	Manutenção dos Micro-organismos	40
4.2.3	Meios de Cultivo	40
4.2.3.1	Meio extrato de levedura-peptona-glucose (YEPD)	40
4.2.3.2	Meio mínimo de sais de Vogel	41
4.2.3.3	Meio de batata-glucose-ágar (BDA)	42

4.2.3.4	Meio de Vogel-glucose-ágar (VGA).....	42
4.2.4	Isolamento das Leveduras de Uvas, Sucos e Mostos Procedentes da Região Norte do Paraná .....	42
4.2.5	Produção da Beta-(1→3; 1→6)-D-Glucana (Botriosferana) .....	43
4.2.6	Seleção de Leveduras Produtoras das Enzimas Extracelulares Beta-(1→3)-Glucanase e Beta-Glicosidase .....	45
4.2.7	Avaliação da Atividade da Beta-(1→3)-Glucanase em pH 3,5 e Etanol 15 % (v/v) .....	46
4.2.8	Efeito do Substrato na Produção de Beta-(1→3)-Glucanase e Beta-Glicosidase .....	46
4.2.9	Avaliação de Parâmetros de Cultivo que Influenciam a Síntese de Beta-(1→3)-Glucanase e Beta-Glicosidase Extracelulares na Levedura 1WA1 .....	47
4.2.10	Produção das Enzimas Beta-(1→3)-Glucanase e Beta-Glicosidase pela Levedura 1WA1 .....	47
4.2.11	Propriedades Cinéticas da Beta-(1→3)-Glucanase e da Beta-Glicosidase da Levedura 1WA1 .....	48
4.2.12	Otimização da Produção de Beta-(1→3)-Glucanase e Beta-Glicosidase .....	49
4.2.13	Determinações Analíticas .....	50
4.2.13.1	Determinação da atividade da beta-(1→3)-glucanase .....	50
4.2.13.2	Determinação da atividade da beta-glicosidase .....	51
4.2.13.3	Açúcares totais solúveis .....	52
4.2.13.4	Açúcares redutores .....	53
4.2.13.5	Proteínas totais solúveis.....	53
4.2.14	Microscopia Eletrônica de Varredura.....	53
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>56</b>
5.1	ISOLAMENTO DAS LEVEDURAS A PARTIR DE UVAS, SUCOS E MOSTOS PROCEDENTES DA REGIÃO NORTE DO PARANÁ.....	56
5.2	SELEÇÃO DE LEVEDURAS PRODUTORAS DAS ENZIMAS EXTRACELULARES BETA-(1→3)-GLUCANASE E BETA-GLICOSIDASE .....	59
5.2.1	Detecção da Atividade de Beta-(1→3)-Glucanase e Beta-Glicosidase em Meio Sólido, por Meio de Zimograma .....	59

5.2.2	Seleção das Leveduras Produtoras de Beta-(1→3)-Glucanase e Beta-Glicosidase em Meio de Cultivo Líquido .....	60
5.3	COMPARAÇÃO DAS ATIVIDADES DE BETA-(1→3)-GLUCANASE DOS EXTRATOS ENZIMÁTICOS, EM VALORES DE PH E CONCENTRAÇÃO DE ETANOL DO VINHO .....	65
5.4	COMPARAÇÃO DA PRODUÇÃO DE BETA-(1→3)-GLUCANASE E BETA-GLICOSIDASE EXTRACELULARES PELOS ISOLADOS DE LEVEDURA 1WA1, 1WA2, 2WS2, 3WS5, EM DIFERENTES SUBSTRATOS .....	66
5.5	PADRONIZAÇÃO DO INÓCULO E EFEITO DA ADIÇÃO DE TWEEN 80 NA PRODUÇÃO DE BETA-(1→3)-GLUCANASE E BETA-GLICOSIDASE PELO ISOLADO DE LEVEDURA 1WA1 .....	69
5.6	EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE BIOMASSA MICELIAL DE BOTRYOSPHERIA RHODINA NA PRODUÇÃO DE BETA-(1→3)-GLUCANASE E BETA-GLICOSIDASE PELA LEVEDURA 1WA1 .....	71
5.7	CURVA DE PRODUÇÃO DE BETA-(1→3)-GLUCANASE E BETA-GLICOSIDASE PELA LEVEDURA 1WA1 UTILIZANDO-SE 1 % (M/V) DE BIOMASSA MICELIAL DE BOTRYOSPHERIA RHODINA .....	73
5.8	PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DA BETA-(1→3)-GLUCANASE E BETA-GLICOSIDASE PRODUZIDAS PELO ISOLADO DE LEVEDURA 1WA1 .....	76
5.8.1	Efeito do Tempo de Incubação na Atividade da Beta-(1→3)-Glucanase e Beta-Glicosidase .....	76
5.8.2	Efeito do Tampão e do pH de Incubação na Atividades de Beta-(1→3)-Glucanase e Beta-Glicosidase .....	78
5.8.3	Efeito da Temperatura de Incubação na Atividade da Beta-(1→3)-Glucanase e Beta-Glicosidase .....	81
5.9	CURVAS DE MICHAELIS-MENTEN E LINEWEAVER-BURK DA BETA-(1→3)-GLUCANASE PARA LAMINARINA .....	83
5.10	CURVAS DE MICHAELIS-MENTEN E LINEWEAVER-BURK DA BETA-GLICOSIDASE PARA PNPG (P-NITROFENIL-BETA-D-GLUCOPIRANOSÍDIO) .....	84
5.11	EFEITO DA PRESENÇA DE DIFERENTES SAIS NA ATIVIDADE DA BETA-(1→3)-GLUCANASE E DA BETA-GLICOSIDAS .....	85
5.12	OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE BETA-(1→3)-GLUCANASE E BETA-GLICOSIDASE PELA LEVEDURA 1WA1 .....	87
5.13	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA .....	92

<b>CONCLUSÕES</b> .....	97
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	98
<b>ANEXOS</b> .....	107
<b>ANEXO A</b> .....	108

## 1 INTRODUÇÃO

As enzimas Beta-(1→3)-glucanases (do tipo exo (EC 3.2.1.58) e endo (EC 3.2.1.39)) são hidrolases que catalisam a hidrólise de beta-(1→3)-D-glucanas tais como laminarina e botriosferana. Beta-glicosidases (EC 3.2.1.21) são enzimas capazes de catalisar a hidrólise de aril-alquil-glicosídeos. Estas enzimas podem ser secretadas no meio de cultivo por uma variedade de micro-organismos, incluindo-se leveduras.

Tanto as beta-glucanases como as beta-glicosidases são aplicáveis em vários processos biotecnológicos, como por exemplo, em processos de vinificação. Isto porque são capazes de hidrolisar ligações glicosídicas entre o monômero de glucose e os grupamentos agliconas de compostos fenólicos e aromáticos voláteis (monoterpenos, álcoois alifáticos), melhorando as propriedades organolépticas do vinho.

A maior dificuldade encontrada para se estudar estas enzimas é o elevado custo dos substratos, como por exemplo, a laminarina isolada de *Laminaria digitata*, ou beta-glucana isolada de *Saccharomyces cerevisiae*. Uma alternativa seria o uso de exopolissacarídeos secretados por fungos filamentosos, tais como *Sclerotium rolfsii* e *Botryosphaeria rhodina*.

O *B. rhodina*, um fungo filamentoso que vem sendo estudado pelo grupo de pesquisa do Departamento de Bioquímica e Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina, é produtor de uma beta-(1→3)(1→6)-D-glucana denominada botriosferana, a qual já foi utilizada previamente como fonte de carbono para produção de beta-glucanase por *Trichoderma harzianum*, assim como sua biomassa micelial.

Visando selecionar uma levedura que produzisse maiores níveis de beta-glucanase e beta-glicosidase para futura aplicação em vinhos, neste trabalho foram isoladas leveduras de diferentes viticulturas da região norte Paranaense, as quais foram avaliadas quanto à produção das referidas enzimas, utilizando-se a beta-glucana botriosferana ou a biomassa micelial do *B. rhodina* como substratos.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Isolar e selecionar leveduras de uvas (viníferas e de mesa) e de mosto do Norte do Paraná, produtoras de beta-(1→3)-glucanase e beta-glicosidase extracelulares.

Otimizar as condições de produção de ambas as enzimas pelo isolado que se destacar como melhor produtor destas hidrolases.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar leveduras de uvas viníferas e de mesa, de sucos e mostos de ecossistemas vînicos da região norte do Paraná;
- Desenvolver uma metodologia adequada para selecionar os isolados de leveduras produtores de beta-(1→3)-glucanase e beta-glicosidase;
- Selecionar dentre os isolados de levedura o melhor produtor de beta-(1→3)-glucanase e beta-glicosidase;
- Avaliar parâmetros bioquímico-fisiológicos (diferentes substratos, tempo de cultivo, adição de Tween 80), que interferem positivamente na produção de beta-(1→3)-glucanase e beta-glicosidase;
- Determinar parâmetros cinéticos da beta-(1→3)-glucanase e beta-glicosidase produzida pelo isolado de levedura selecionado;
- Otimizar a produção de beta-(1→3)-glucanase e beta-glicosidase pelo isolado de levedura selecionado, utilizando-se planejamento fatorial e análise por metodologia de superfície de resposta ;
- Verificar por microscopia eletrônica de varredura as células do isolado de levedura selecionado, e sua interação com a biomassa de *Botryosphaeria rhodina*.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 BETA-GLUCANAS

Polissacarídeos, também chamados glicanos, são polímeros de açúcares que podem ter centenas ou milhares de unidades monossacarídicas. Eles diferem entre si no tipo de unidades monossacarídicas e na ligação que os unem, no comprimento de suas cadeias, ou no grau de ramificação. Podem ser de origem vegetal, como a celulose, que possui cadeias lineares, ou de origem animal, como o glicogênio, que possui cadeias ramificadas (NELSON, COX, 2002). Também são produzidos por micro-organismos, participando da composição da parede celular, ou também podem ser secretados no meio de cultivo, recebendo a denominação de exopolissacarídeos (BARBOSA et al., 2004; CORRADI da SILVA et al., 2008; FUKUDA et al., 2009).

Segundo Seviour e colaboradores (1992), um único micro-organismo pode produzir mais de um tipo de exopolissacarídeo com estruturas químicas diversificadas. No ambiente natural em que os micro-organismos são encontrados, tais polímeros podem estar associados à patogenicidade, tanto no caso de plantas como no de animais, devido à facilidade de adesão e obstrução dos poros, causando necrose (CORSARO et al., 1998). As beta-glucanas também possuem funções associadas à interação planta-micro-organismo, proporcionando proteção à célula microbiana contra a dessecação ou ao ataque por bacteriófagos e protozoários (SUTHERLAND, 1999).

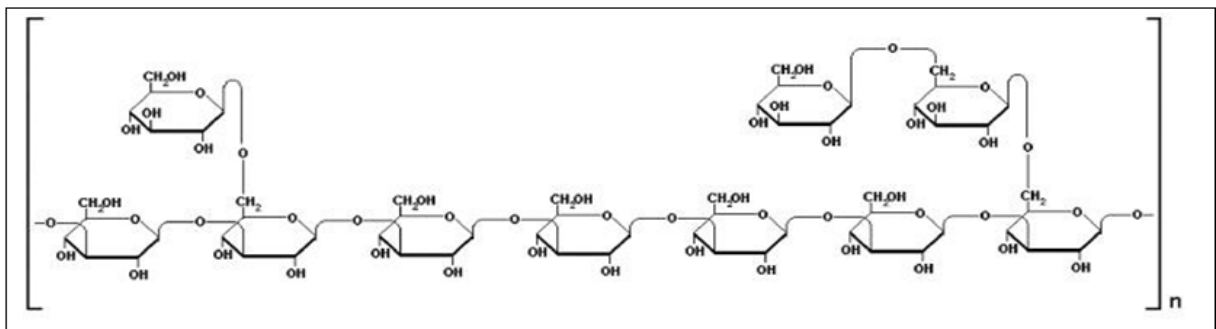
Beta-glucanas são polímeros constituídos por resíduos de glicose unidos por ligações beta-glicosídicas. Algumas glucanas possuem cadeias simples, com um único tipo de ligação, outras possuem cadeias mais complexas, ramificadas e com diferentes ligações glicosídicas (PITSON, SEVIOUR, McDOUGALL, 1993; STONE, CLARKE, 1992). A síntese das beta-glucanas fúngicas é realizada em três etapas principais: primeiro as reações de iniciação, seguida da de alongamento da cadeia e, por último a de ramificação. A reação de alongamento constitui a etapa mais estudada e é catalisada pela enzima glucana sintetase a partir de UDPG (uridina difosfato glucose) (RUIZ-HERRERA, 1991). As beta-glucanas tem como

função principal auxiliar na manutenção da rigidez e integridade da parede celular fúngica (SEVIOUR et al., 1992; STONE, CLARKE, 1992).

As beta-glucanas podem ser encontradas em diferentes micro-organismos como fungos filamentosos (BARBOSA et al., 2003) e leveduriformes (STRAUSS et al., 2001) como também nas bactérias (Yi et al., 2008). A levedura *Schizosaccharomyces pombe*, por exemplo, apresenta na composição de sua parede celular polímeros de beta-(1→3)-glucanas, alfa-(1→3)-glucanas e uma glucana ramificada, além de manoproteínas (MAGNELLI, CIPOLLO, ROBBINS, 2005).

O ascomiceto *Botryosphaeria rhodina* produz um exopolissacarídeo (EPS) do tipo beta-D-glucana quando cultivado em glicose (DEKKER, BARBOSA, 2001), que é responsável pelo aumento da viscosidade do meio nos cultivos (STELUTI et al., 2004). Este EPS foi descrito em 2003 por Barbosa e colaboradores e recebeu a denominação de botriosferana. Também foi caracterizado estruturalmente como uma beta-(1→3; 1→6)-D-glucana, com aproximadamente 22% de ramificações, as quais são constituídas por resíduos de glucose e gentiobiose, unidas à cadeia principal por ligações glicosídicas do tipo beta-(1→6), conforme mostra a Figura 1 (BARBOSA et al., 2003).

Segundo Silva e colaboradores (2005) a fonte de carbono utilizada para o crescimento do *Botryosphaeria rhodina* afeta o grau de ramificação da botriosferana produzida. A cadeia principal desta beta-glucana permanece a mesma, variando-se apenas o grau de ramificação, que quando produzida em sacarose apresenta 21% e quando em frutose, 31%.



**Figura 1** – Estrutura química da botriosferana [beta (1→3),(1→6)-D-glucana], apresentando as substituições por unidades glicosídicas e/ou gentiobiosídicas a cada cinco unidades na cadeia principal.

Fonte: Barbosa et al. (2003).

A baixa solubilidade em água e a formação de soluções viscosas são características estruturais das beta-glucanas, o que dificulta a aplicação destes biopolímeros. Uma solução para este problema é a fragmentação destas moléculas pela utilização de enzimas, o que aumentaria a sua solubilidade (GIESE et al., 2005). Estes polissacarídeos podem ser degradados por enzimas específicas denominadas polissacarases (SUTHERLAND, 1999), que quando hidrolisam as ligações beta-glicosídicas são classificadas como beta-glucanases (MANNERS et al., 1976).

### 3.2 BETA-(1→3)-GLUCANASES

A enzima beta-(1→3)-glucanase (do tipo exo (EC 3.2.1.58) e endo (EC 3.2.1.39)) é uma hidrolase extracelular que foi sistematicamente classificada pela União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB) pelo tipo de ligação beta-glicosídica que ela é capaz de hidrolisar. Esta classificação não leva em consideração as suas propriedades estruturais (I.U.B., 1992). Pode ser produzida por bactérias (FLEURI, SATO, 2008), leveduras (DAENEN et al., 2008), e fungos filamentosos (VÁSQUEZ-GARCIDUEÑAS, LEAL-MORALES, HERRERA-ESTRELLA, 1998). Entre as hidrolases podem ser encontradas enzimas como invertases, poligalacturonases, beta-(1→3)-glucanases, beta-(1→6)-glucanases, beta-D-glicosidases entre outras (BLASCO et al., 2006).

Muitos fungos são produtores de beta-(1→3)-glucanases extracelulares, algumas dessas enzimas são produzidas constitutivamente, embora a maioria parece ser induzida. O fungo filamentoso *Trichoderma harzianum*, por exemplo, sob indução, produz um complexo enzimático com pelo menos sete beta-(1→3)-glucanases, (VÁSQUEZ-GARCIDUEÑAS, LEAL-MORALES, HERRERA-ESTRELLA, 1998).

As beta-glucanases podem ser extra-celulares ou podem estar associadas à parede celular, onde desempenham um papel importante no processo morfogênico, que foi demonstrado em leveduras (ADAMS, 2004), visto que atuam durante a germinação, esporulação e também durante o crescimento celular, e são expressas de diferentes formas (McLEOD, SMART, FRY, 2003).

Na Tabela 1 podem ser observados alguns fungos filamentosos e leveduriformes produtores de diferentes beta-glucanases e beta-glicosidases.

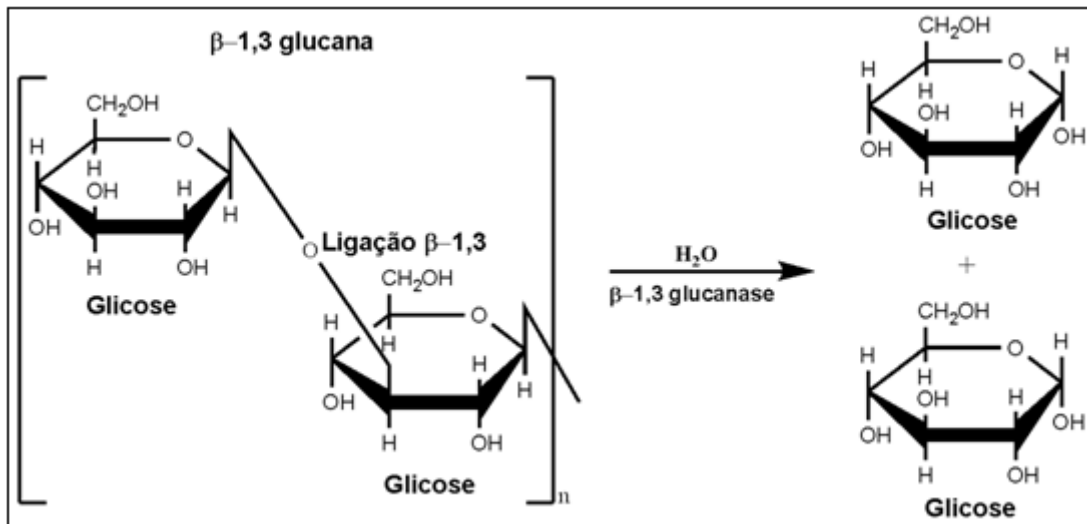
**Tabela 1** – Micro-organismos produtores de beta-glucanases e beta-glicosidases.

Enzimas	Micro-organismos	Referência
Exo-beta-(1→3)- Glucanase (EC 3.2.1.58)	<i>Candida albicans</i> <sup>a</sup>	STUBBS et al. (1999)
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <sup>a</sup>	SUZUKI et al. (2001)
	<i>Trichoderma viride</i> <sup>b</sup>	KULMINSKAYA et al. (2001)
	<i>Pichia membranifaciens</i> <sup>a</sup>	MASIH; PAUL (2002)
	<i>Candida oleophila</i> <sup>a</sup>	BAR-SHIMON et al. (2004)
Endo-beta-(1→3)- Glucanase (EC 3.2.1.39)	<i>Acremonium blochii</i> <sup>b</sup>	MARTIN et al. (2006)
	<i>Pichia membranifaciens</i> <sup>a</sup>	MASIH; PAUL (2002)
	<i>Schizosaccharomyces pombe</i> <sup>a</sup>	MARTÍN-CUADRADO et al. (2008)
Beta-(1→6)- Glucanase (EC 3.2.1.75)	<i>Acremonium persicinum</i> <sup>b</sup>	PITSON et al. (1997)
	<i>Streptomyces rochei</i> <sup>c</sup>	WU et al. (2002)
	<i>Acremonium</i> sp. IMI 383068 <sup>b</sup>	JAYUS et al. (2002)
	<i>Trichoderma harzianum</i> <sup>b</sup>	GIESE et al. (2006)
Beta-Glicosidase (EC 3.2.1.21)	<i>Botryosphaeria rhodina</i> <sup>b</sup>	GIESE et al. (2006)
	<i>Candida wickerhamii</i> <sup>a</sup>	SKORY et al. (1996)
	<i>Acremonium persicinum</i> <sup>b</sup>	PITSON et al. (1997)
	<i>Debaryomyces vanriijiae</i> <sup>a</sup>	BELANCIC et al. (2003)
	<i>Trichoderma harzianum</i> <sup>b</sup>	GIESE et al. (2006)
<i>Botryosphaeria rhodina</i> <sup>b</sup>	GIESE et al. (2006)	
<i>Brettanomyces</i> sp. <sup>a</sup>	DAENEN et al. (2008)	

<sup>a</sup> – Fungo Leveduriforme; <sup>b</sup> – Fungo Filamentoso; <sup>c</sup> - Bactéria

As beta-(1→3)-glucanases atuam em substratos compostos de seqüências lineares de unidades de glucose, unidas através de ligações glicosídicas do tipo beta-(1→3) contendo uma extremidade terminal não redutora. Entretanto, é permitido um grau moderado de substituições, e assim as enzimas podem atuar sobre ligações do tipo beta-(1→3; 1→6). A reação ocorre liberando glucose, através de sucessivas hidrólises a partir da extremidade não-redutora da beta-(1→3)-glucana de origem microbiana (Figura 2), ou com ligações mistas, como por exemplo, a beta-(1→3; 1→6)-glucana (BRENDA, 2008; SUTHERLAND, 1999). As

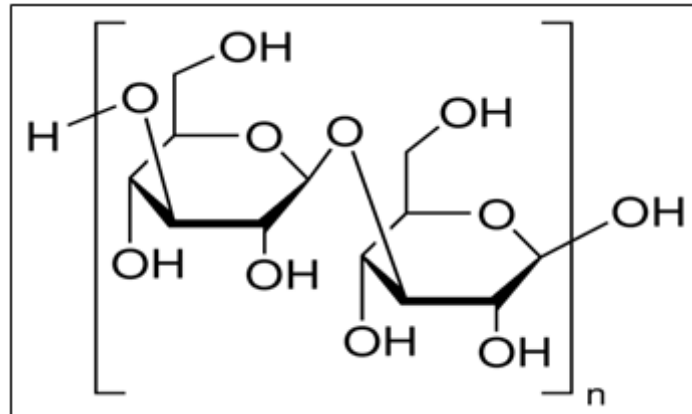
beta-glucanases constituem um complexo enzimático que apresentam diferentes mecanismos de ação, também complexos (STONE, CLARKE, 1992).



**Figura 2** – Esquema estrutural representativo da hidrólise da beta-(1→3)-glucana pela beta-(1→3)-glucanase

Manners e colaboradores (1976) estudaram uma beta-(1→3)-glucanase comercial de origem fúngica (63 kDa), capaz de atuar sobre beta-(1→3)(1→6)-glucanas, liberando glicose como produto principal da reação. Beta-(1→3)-gluco-oligossacarídeos como laminariobiose, laminariotriose e até laminarioheptaose também tem sido utilizados como substratos para estudar os diferentes mecanismos de ação dessas enzimas (MIYANISHI et al., 2003).

A laminarina (produzida pela alga *Laminaria digitata*), uma beta-(1→3)-glucana (Figura 3) tem sido amplamente utilizada como substrato na determinação da atividade de beta-(1→3)-glucanases (BROCK, 1965; STUBBS et al., 1999; MOLERO et al., 1999). Porém, é importante ressaltar que altas concentrações desses substratos podem reprimir sua atividade (SUZUKI et al., 2001).



**Figura 3** – Representação estrutural condensada da Laminarina, uma beta-(1→3)-glucana produzida pela alga *Laminaria digitata*

Fonte: Sigma-Aldrich (2010).

Uma característica interessante de beta-glucanases é que elas não são específicas para um único substrato, podendo hidrolisar tanto cadeias maiores como a de laminarina e de pustulana produzida pelo líquen *Umbilicaria papulosa* (Brock, 1965), como também substratos de cadeias menores como a laminariobiose, laminariotriose e *p*-nitrofenil-beta-D-glucopiranosídeo (*p*-NPG) (SUZUKI et al., 2001).

Há ocorrência de múltiplas beta-(1→3)-glucanases produzidas por um único micro-organismo, o que parece ser comum (PITSON, SEVIOUR, McDOUGALL, 1993; MARTIN et al., 2006). Os possíveis motivos da existência dessa multiplicidade enzimática incluem a expressão de genes diferentes e as possíveis modificações pós-traducionais dessas proteínas (JAYUS, McDOUGALL e SEVIOUR, 2002). No *Trichoderma harzianum*, pelo menos dez formas foram detectadas, apresentando diferentes pesos moleculares e pontos isoelétricos, variando de acordo com a fonte de carbono utilizada para seu crescimento (VASQUEZ-GARCIDUENAS et al. 1998). Pitson, Seviour e McDougall (1997) constataram que existe uma ação sinérgica entre beta-glucanases e beta-glicosidases produzidas por *Acremonium persicinum*, ou seja, os produtos de hidrólise de beta-(1→3) e beta-(1→6)-glucanases foram facilmente degradados pelas beta-glicosidases, gerando alguns oligossacarídeos e principalmente glicose.

Beta-glucanases podem ter a atividade inibida na presença de compostos como clorofórmio, benzenóides, organofosfatos, quelantes e outros, devido à concentração do substrato e também dos produtos reacionais (RANA et al., 2003). Yi e colaboradores (2008) observaram a inibição da beta-glucanase de

*Trichoderma viride* na presença de  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  e  $\text{Cu}^{2+}$ , no entanto, na presença de  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  e  $\text{Ca}^{2+}$ , a atividade foi estimulada.

### 3.2.1 Produção de Beta-(1→3)-Glucanases

A produção de beta-(1→3)glucanase por fungos pode ocorrer quando o micro-organismo é cultivado em várias fontes de carbono. A produção destas enzimas tem sido descritas em *Trichoderma harzianum*, o qual produziu a enzima quando cultivado em quitina, pustulana, glicerol, e também em fontes monoméricas de açúcares como glucose, frutose e galactose (CRUZ et al., 1993). Giese e colaboradores (2006) também observaram a produção de beta-(1→3)-glucanase pelos fungos *Trichoderma harzianum* e *Botryosphaeria rhodina* quando cultivados na beta-(1→3)-D-glucana botriosferana como única fonte de carbono.

A produção da beta-(1→3)-glucanase também tem sido observada em meio sólido. Gil e colaboradores (2005) detectaram a presença da beta-(1→3)-glucanase de *Saccharomyces cerevisiae* em colônias crescidas em placas de YPD- (extrato de levedura, peptona e dextrose)-cicloheximida com solução de 4-*metil-umbeliferil*-beta-D-glucopiranosídeo (MUG). As colônias positivas apresentaram um halo fluorescente sob iluminação ultravioleta, devido a liberação de 4-*metil-umbeliferil*-beta-D-glucorônido.

A produção de beta-glucanases pode ser influenciada por componentes do meio de cultivo como a concentração da fonte de carbono. O excesso de glucose ou outra fonte de carbono facilmente acessível pode reprimir a produção destas enzimas em alguns micro-organismos. Cruz e colaboradores descreveram em 1993, a repressão da produção de beta-(1→3)-glucanase pelo *Trichoderma harzianum* devido a presença de glucose. Vásquez-Garcidueñas e colaboradores, em 1998, comprovaram os resultados.

A Tabela 2 apresenta os tipos de meios de cultivo, tempo de cultivo, substratos e métodos de determinação da atividade de beta-glucanases por fungos filamentosos e leveduriformes.

**Tabela 2** – Fungos e leveduras produtores de beta-(1→3)glucanases, tipos de meios de cultivo, tempo de cultivo e métodos de determinação desta enzima

Fungos Filamentosos e Leveduriformes	Tipo de meio de cultivo	Tempo de cultivo	Substrato para Det. enzimática	Método de Det. da ativ. da enzima	Referência
<i>Candida stellata</i> <sup>1</sup>	Complexo	24 horas	Beta-glucana de cevada	Kit Trinder	STRAUSS et al. (2001)
<i>Candida stellata</i> <sup>1</sup>	Complexo	24 horas	Laminarina	**DNS	STRAUSS et al. (2001)
<i>Kloeckera apiculata</i> <sup>1</sup>	Complexo	24 horas	Beta-glucana de cevada	Kit Trinder	STRAUSS et al. (2001)
<i>Kloeckera apiculata</i> <sup>1</sup>	Complexo	24 horas	Laminarina	**DNS	STRAUSS et al. (2001)
<i>Pichia membranifaciens</i> <sup>1</sup>	Complexo ( <i>Botrytis cinérea</i> )	24 horas	Laminarina	Kit comercial de glucose oxidase	MASIH, PAUL (2002)
<i>Pichia guilliermondii</i> <sup>1</sup>	Complexo ( <i>Rhizopus nigricans</i> )	72 horas	*d.n.c.	*d.n.c.	ZHAO et al. (2008)
<i>Pichia membranaefaciens</i> <sup>1</sup>	Complexo ( <i>Penicillium expansum</i> )	48 horas	*d.n.c.	*d.n.c.	XU, TIAN (2008)
<i>Trichoderma harzianum</i> <sup>2</sup>	Complexo	2 – 4 dias	Laminarina	Somogyi (1945) e Nelson (1944)	CRUZ et al. (1993)
<i>Trichoderma harzianum</i> <sup>2</sup>	Complexo	48 horas	Laminarina	Somogyi (1945) e Nelson (1944)	VÁSQUEZ-GARCIDUEÑAS et al. (1998)
<i>Trichoderma viride</i> <sup>2</sup>	Complexo	72 horas	Laminarina	Glucose oxidase	KULMINSKAYA et al. (2001)
<i>Acremonium sp.</i> <sup>2</sup>	Simples	36 horas	Laminarina	*d.n.c.	JAYUS et al. (2002)
<i>Trichoderma harzianum</i> <sup>2</sup>	Complexo	36 horas	Laminarina	**DNS	RANA et al. (2003)
<i>Trichoderma harzianum</i> <sup>2</sup>	Botriosferana + ***Vogel	5 dias	Laminarina/ Botriosferana	Somogyi (1945) e Nelson (1944)	GIESE et al. (2006)
<i>Botryosphaeria rhodina</i> <sup>2</sup>	Botriosferana + Glucose + ***Vogel	10 dias	Laminarina/ Botriosferana	Somogyi (1945) e Nelson (1944)	GIESE et al. (2006)
<i>Trichoderma viride</i> <sup>2</sup>	Complexo (*d.n.c.)	4 dias	Laminarina	Somogyi (1945) e Nelson (1944)	YI et al. (2008)

\*d.n.c. - Dados não citados. \*\*DNS – Miller, 1959. \*\*\* Vogel (1956)

<sup>1</sup> Levedura. <sup>2</sup> Fungo filamentosos

Além do substrato, outros fatores também podem interferir na síntese de beta-(1→3)-glucanases, como por exemplo, diferentes concentrações de oxigênio, e mudanças na velocidade de aeração. A produção da beta-(1→3)-glucanase pelo *Acremonium sp.* IMI 383068 em pustulana, e principalmente em escleroglucana como fonte de carbono, foi aumentada concomitantemente com o

aumento da concentração de oxigênio dissolvido no meio (BARBARA, McDOUGALL, SEVIOUR, 2005). Jayus, McDougall e Seviour (2002) observaram que a atividade específica desta enzima produzida por *Acremonium* sp. IMI 383068 aumentou com o aumento da agitação até próximo de 400 rpm, e em velocidades acima desse valor a produção é reduzida.

Masih e Paul (2002) observaram que a produção de exo-beta-(1→3)-glucanase e endo-beta-(1→3)-glucanases pela levedura *Pichia membranifaciens* foi muito baixa quando cultivada na presença de glucose e elevada na de laminarina; entretanto, a produção aumentou consideravelmente quando a levedura foi cultivada na presença de um preparado de parede celular de *Botrytis cinerea*.

### 3.2.2 Propriedades das Beta-(1→3)-Glucanases

A laminarina é uma beta-(1→3)-glucana comumente utilizada como substrato nos ensaios de determinação da atividade de beta-(1→3)-glucanase (BLASCO et al., 2006; VÁSQUEZ-GARCIDUEÑAS, LEAL-MORALES, HERRERA-ESTRELLA, 1998; STUBBS et al., 1999). A escolha do substrato para a determinação desta atividade deve ser criteriosa, visto que as beta-glucanases podem ser confundidas com as beta-glicosidases, uma vez que esta última tem capacidade de hidrolisar o substrato cromogênico *p*-nitrofenil-beta-D-glucopiranosídeo (*p*-NPG), enquanto que as beta-glucanases não hidrolisam ligações simples de aril e alquil glicosídeos (BROCK, 1965), quando purificadas. Entretanto, beta-glucanases não purificadas podem hidrolisar *p*-NPG visto que a beta-glicosidase faz parte do complexo glucanólítico. Villa e colaboradores (1975) chamaram de beta-glucanase a enzima de *Pichia polymorpha* que determinaram utilizando *p*-nitrofenil-beta-D-glucopiranosídeo (*p*-NPG) como substrato. A síntese desta enzima não foi inibida na presença de 2-deoxi-D-glucose, um análogo da glucose não natural.

O tempo de incubação utilizado para a determinação da atividade de beta-glucanase “*in vitro*” varia entre 10 ou 20 minutos (GIESE et al., 2006; SIM e HANG, 1996) como também tempos mais longos como 1 hora (VÁSQUEZ-

GARCIDUEÑAS, LEAL-MORALES, HERRERA-ESTRELLA, 1998; DAENEN et al., 2008; PENG, CHI, WANG, 2009). Os tampões mais utilizados para a determinação desta enzima tem sido o tampão acetato de sódio (STRAUS et al., 2001), variando-se o pH desde 3,2 até 5,6 (STUBBS et al., 1999), tampão fosfato de potássio (pH 5,5) (BROCK, 1965) e acetato de potássio (pH 5,0) (MASIH, PAUL 2002).

A temperatura utilizada para a determinação da atividade de beta-(1→3)-glucanase tem sido geralmente 40 °C (GIESE et al., 2006; PENG, CHI e WANG, 2009), porém, também tem sido descritas temperaturas mais brandas como 25 °C (MASIH, PAUL 2002) ou até mais elevadas como 50 °C (BAR-SHIMON et al., 2004).

### 3.2.3 Aplicações das Beta-Glucanases

As beta-(1→3)-D-glucanases tem sido utilizadas como ferramentas na caracterização estrutural e conformacional de beta-glucanas bem como na determinação do seu próprio mecanismo de ação sobre estes substratos (PITSON, SEVIOUR, McDOUGALL, 1993). Também podem ser empregadas na obtenção de oligossacarídeos que possuem atividade biológica, tais como pré-bióticos. Algumas beta-glucanas apresentam atividade biológica, porém possuem características físico-químicas que lhes proporcionam baixa solubilidade e elevada viscosidade (SUTHERLAND, 1999), daí a importância de hidrolisá-las com beta-glucanases para obtenção de oligossacarídeos bioativos.

As beta-(1→3)-glucanases são também utilizadas na caracterização da parede celular de micro-organismos, na produção de protoplastos, em indústrias alimentícias na produção de bebidas como vinho e cerveja, ou ainda como suplemento alimentar em rações, devido a presença de beta-glucanas em cereais, como por exemplo, a aveia (YU, HSU, CHIOU, 1998; TADA et al., 2008).

### 3.2.3.1 Aplicação de beta-glucanases para obtenção de diferentes oligossacarídeos

Polissacarídeos podem apresentar múltiplas atividades farmacológicas, entretanto o controle da qualidade é um desafio, devido sua complicada estrutura e alta massa molecular (SEVIOUR et al., 1992). Uma vez que a atividade biológica de um polissacarídeo sempre mostra forte relação com sua massa molecular (CALAZANS et al., 2000), configuração e posição das ligações glicosídicas (CHAIDEDGUMJORN et al., 2002), entre outras características, justifica-se o emprego da hidrólise enzimática de glucanas como ferramenta para a obtenção de diferentes oligossacarídeos (GIESE et al., 2005).

A hidrólise enzimática e posterior análise cromatográfica foi aplicada por Guan e Li (2010) como um método útil para controlar a qualidade de medicamentos da medicina chinesa tradicional.

### 3.2.3.2 Caracterização de parede celular de micro-organismos

As enzimas beta-glucanases têm sido aplicadas na determinação da estrutura da parede celular de diversos micro-organismos. A levedura *Schizosaccharomyces pombe*, por exemplo, teve sua parede celular caracterizada utilizando-se conjuntamente beta-glucanases e outras enzimas, apresentando como componentes manoproteínas, beta-(1→3)-glucana, alfa-(1→3)-glucana, e uma glucana ramificada (MAGNELLI, CIPOLLO, ROBBINS, 2005).

Iorio e colaboradores (2008) utilizaram beta-(1→3) e beta-(1→6)-endo-glucanases para caracterizar a parede celular da levedura *Cândida albicans*, sendo esta constituída por uma cadeia linear de glucose unidas por ligações beta-(1→6) com ramificações laterais unidas por beta-(1→3) e grau de ramificação de 14%.

### 3.2.3.3 Aplicação das beta-glucanases no controle biológico

O desenvolvimento de métodos de controle biológico como uma alternativa aos fungicidas químicos, no controle de doenças vegetais, tem sido muito estudado nos últimos anos. Várias bactérias e leveduras têm sido descritas com características antagonistas a certos patógenos, como por exemplo, o *Penicillium expansum*, causador do mofo azul em cerejas (XU, TIAN, 2008).

A aplicação de beta-(1→3)-glucanases no controle de micro-organismos patogênicos está relacionada com a constituição química da parede celular composta de beta-glucanas (IORIO et al., 2008; FLEURI, SATO, 2005). Masih e Paul relataram, em 2002, sobre uma beta-(1→3)-glucanase secretada pela levedura *Pichia membranifaciens* isolada de uva, que foi capaz de degradar a parede celular de *Botrytis cinerea*, fungo causador da doença do mofo cinza em parreiras de uvas.

Além da ampla aplicação das beta-glucanases, o rápido crescimento de leveduras produtoras desta enzima fez com que sua aplicação no bio-controle tivesse sido altamente eficiente. A levedura *Pichia guilliermondii*, por exemplo, apresentou capacidade de controlar *Rhizopus nigricans*, encontrado em tomates durante o armazenamento, devido à produção de beta-glucanases (ZHAO et al., 2008).

Bar-Shimon e colaboradores (2004) observaram a indução da atividade de uma exo-beta-(1→3)-glucanase produzida pela levedura *Candida oleophila*, quando adicionaram aos cultivos fragmentos de parede celular do patógeno *Penicillium digitatum*, causador do bolor em frutas.

As beta-(1→3)-glucanases são produzidas por uma grande diversidade de fungos, dentre eles o *Trichoderma harzianum*, que tem sido estudado para controle biológico (VÁSQUEZ-GARCIDUEÑAS, LEAL-MORALES, HERRERA-ESTRELLA, 1998). Cruz e colaboradores (1993) já haviam relatado a presença de atividade lítica do *Trichoderma harzianum* quando cultivado na presença da parede celular de *Saccharomyces cerevisiae* e *Botrytis cinerea* como substrato, devido à produção de enzimas como beta-glucanases e quitinases. O *Trichoderma harzianum* também foi capaz de produzir a enzima na presença de outros micro-organismos

tais como *Mucor rouxii*, *Neurospora crassa* e *Rhizoctonia solani* (VÁSQUEZ-GARCIDUEÑAS, LEAL-MORALES, HERRERA-ESTRELLA, 1998).

A produção microbiana de beta-(1→3)-glucanases extracelulares está relacionada à degradação de polissacarídeos do tipo beta-(1→3)-D-glucanas, assim como para a sobrevivência e patogenicidade (PITSON, SEVIOUR, McDOUGALL, 1993). O produto comercial “Aspire”, que é recomendado para o controle de podridões pós-colheita de citros e de pomóideas (frutas com sementes, como maçã e pêra), tem como base a levedura *Candida oleophila*, devido à produção de beta-glucanases, pois acredita-se que estas enzimas estejam envolvidas na degradação da parede celular da célula fúngica. A levedura *C. oleophila*, de acordo com Bar-Shimon e colaboradores (2004), foi capaz de produzir várias enzimas degradadoras de parede celular de *Penicillium digitatum*, incluindo exo-beta-(1→3)-glucanase, quitinase e protease.

Xu e Tian (2008) observaram a indução da produção de beta-(1→3)-glucanase de *Pichia membranaefaciens* na presença de *Penicillium expansum*, causador de “stress” oxidativo em tomates. Portanto, a aplicação de beta-(1→3)-glucanases, ou de micro-organismos produtores dessas enzimas, é importante para retardar o crescimento de fungos patogênicos e diminuir a deterioração dos frutos causada por estes.

#### 3.2.3.4 Aplicação de beta-glucanases em suplementos alimentares

As beta-glucanas e pentosanas são observadas em diversos cereais, que quando em contato com a água, possuem capacidade de formar géis. As beta-glucanases podem ser aplicadas para diminuir a viscosidade e também para liberar açúcares em dietas ricas em cereais (Uniquímica, 2008). Na indústria de cervejas, por exemplo, a alta viscosidade das beta-glucanas, presentes no malte podem causar problemas de filtração (KETTUNEN et al., 1996).

Alguns estudos têm demonstrado um aumento da liberação de certos nutrientes devido à maior digestibilidade promovida pela presença das beta-glucanases. A cevada, por exemplo, um cereal muito encontrado na dieta animal, tem sua estrutura formada principalmente por glucoses unidas por ligações

glicosídicas do tipo beta-(1→3)(1→4) (TADA et al., 2008). A suplementação com beta-glucanases produzidas por *Trichoderma longibrachiatum* e *Aspergillus niger*, numa dieta animal que tem como base a cevada, apresentou aumento do peso corporal e no crescimento de frangos com apenas seis semanas (YU, HSU, CHIOU, 1998).

### 3.2.3.5 Aplicação de beta-glucanases no processo de vinificação

As enzimas desempenham um papel importante na fabricação dos vinhos, desde a fermentação até a maturação, visto que são capazes de catalisar diversas reações de biotransformação (VANDERHAEGEN et al., 2003; HUMBERT-GOFFARD et al., 2004; BLASCO et al., 2006).

As enzimas produzidas por leveduras selvagens associadas à uva poderiam ser aproveitadas para catalisar reações de biotransformação do vinho durante a fermentação. Strauss e pesquisadores (2001) isolaram diversas leveduras de uvas da África do Sul, sendo que a maioria dos isolados de *Candida stellata*, *Candida hellenica* e *Kloeckera apiculata* mostraram atividade de beta-glucanases.

As beta-glucanases, além de participarem do processo de clarificação dos vinhos e também das cervejas (DUBOURDIEU et al., 1985), auxiliam na liberação de compostos precursores do aroma e compostos fenólicos unidos à cadeia de beta-glucanas (GÜNATA et al., 1988). Daenen e colaboradores (2008) mostraram que a levedura *Saccharomyces cerevisiae* utilizada na produção da cerveja apresentou atividade de beta-glucanase envolvida na liberação de agliconas (isoflavonas) a partir de lúpulo, o que faz com que a enzima tenha um papel importante na bioflavorização.

A atividade das beta-glucanases também está relacionada com a filtrabilidade dos vinhos tintos e brancos (HUMBERT-GOFFARD et al., 2004), além da propriedade de melhorar seu aroma e sabor através da liberação de compostos voláteis unidos por ligações glicosídicas durante a fermentação. Uma beta-glucanase (EXG1) clonada em uma estirpe de *Saccharomyces cerevisiae* produtora de vinho, apresentou melhoria no perfil do vinho produzido, através do aumento da

liberação de alcoóis e terpenos como 2-fenil-álcool, nerol e geraniol (GIL et al., 2005).

Os níveis de enzimas hidrolíticas nos vinhos, como beta-(1→3)-glucanase, beta-(1→6)-glucanase e beta-glicosidase podem variar de acordo com o tempo de envelhecimento. Essas enzimas estão envolvidas no processo de fermentação e provêm dos próprios bagos da uva ou de micro-organismos envolvidos com a mesma (BLASCO et al., 2006).

As beta-(1→3)-glucanases podem ser encontradas tanto em vinho branco, como em vinho tinto, novos ou envelhecidos, apesar das condições de baixo pH e elevada concentração de etanol (HUMBERT-GOFFARD et al., 2004; BLASCO et al., 2006).

### 3.3 BETA-GLICOSIDASES

As beta-glicosidases (CE 3.2.1.21) são hidrolases com capacidade de catalisar a hidrólise de ligações alquil-aril e beta-glicosídicas, como também diglicosídeos e oligossacarídeos, e, por isso, elas podem liberar compostos aromáticos não-voláteis constituintes do vinho (STRAUSS et al., 2001).

A produção de beta-glicosidases tem sido maior quando em meio ácido. De acordo com Sim e Hang (1996), a produção desta enzima pelas leveduras *Candida wickerhamii* e *Candida molischiana* foi fortemente induzida na presença de salmora ácida, um subproduto resultante da produção de chucrute, através de fermentação láctica. As enzimas extra e intra-celulares podem ser produzidas tanto por via aeróbica quanto anaeróbica (SKORY, FREER, BOTHAST, 1996).

A Tabela 3 mostra a produção de beta-glicosidases por diferentes micro-organismos em diferentes condições de cultivo.

**Tabela 3** – Produção de beta-glicosidases por fungos, tipos de meios de cultivo, tempo de cultivo e substrato utilizado para determinar a atividade da enzima

Fungos	Meio de cultivo	Tempo de cultivo	Substrato para medir a atividade	Referência
<i>Trichoderma viride</i>	Complexo	72 horas	p-NPG	KULMINSKAYA et al. (2001)
<i>Debaryomyces vanriijiae</i>	Complexo	135 horas	p-NPG	BELANCIC et al. (2003)
<i>Cândida wickerhamii/Candida molischiana</i>	Complexo	48 horas	p-NPG	SIM, HANG (1996)

A atividade de beta-glicosidase pode ser inibida na presença de  $Fe^{++}$ ,  $Zn^{++}$ ,  $Cu^{++}$ ,  $Ca^{++}$ ,  $Mg^{++}$ , EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético), SDS (dodecil sulfato de sódio) (BELANCIC et al., 2003; BOWERS, RAGLAND, BYERS, 2007) e também em alcoóis como etanol, 2-propanol e 2-butanol (SKORY, FREER, BOTHAST, 1996), sendo que Belancic e colaboradores (2003) afirmaram que a inibição desta enzima na presença de etanol foi relativamente baixa, considerando-se a concentração encontrada em vinhos.

A presença de beta-glicosidase em sucos de uva pode possibilitar o aumento da concentração de diversos monoterpenos, como consequência de sua atividade hidrolítica (BELANCIC et al., 2003).

A importância da beta-glicosidase para a indústria vinícola reside no seu potencial de liberação de compostos flavonólicos a partir de precursores não voláteis do vinho, vinculados por ligações químicas. Alguns trabalhos têm relatado que leveduras de uvas não *Saccharomyces* apresentaram atividade glicosídica, o que mostrou o potencial de leveduras selvagens de uva na produção de uma ampla gama de enzimas extracelulares. O trabalho indicou a necessidade de se determinar o impacto que tais atividades possam ter sobre as propriedades sensoriais do vinho (STRAUSS et al., 2001).

### 3.4 VINHO

O vinho é uma bebida fermentada, obtida através da ação conjunta de leveduras e bactérias que podem ser encontradas naturalmente nas uvas, ou inoculadas pela indústria. O processo de vinificação é complexo, baseado nas diferentes interações de enzimas microbianas, que podem vir a partir da baga da uva, ou a partir dos micro-organismos envolvidos no processo (BLASCO et al., 2006). No processo de vinificação são utilizadas diferentes espécies de leveduras, assim como outros micro-organismos. A levedura *Saccharomyces beticus*, por exemplo, foi usada na produção de vinho do tipo Sherry, o qual requer alto nível de acetaldeído, um produto do metabolismo primário dessa levedura (VINE, 1981).

O sabor, aroma, e principalmente a qualidade dos vinhos, estão diretamente relacionados ao tipo de uva usado para sua fabricação, devido a sua composição. Caetano e colaboradores (2008) mostraram a variação da quantidade de compostos fenólicos das uvas PINOT GRIS e COUDERC 13. Os autores sugeriram ainda a utilização de biomassas residuais da indústria vitivinícola como fonte alternativa de compostos fenólicos, com relação às duas variedades estudadas, para aplicação nas indústrias, principalmente de fitoterápicos e de complementos alimentares, devido às suas propriedades antioxidantes.

Os constituintes que melhor diferenciam qualitativamente os vinhos tintos são os compostos fenólicos, pois interferem na cor, no extrato seco e, conseqüentemente, na qualidade desses vinhos. Os compostos fenólicos são encontrados praticamente em todo reino vegetal. São definidos como substâncias que possuem um anel aromático com um ou mais substituintes hidroxílicos, incluindo seus grupos funcionais (NACZK, SHAHIDI, 1994; VINSON et al., 1999).

Terpenos são típicos componentes dos óleos essenciais das flores e frutos, e podem estar presentes na forma livre ou glicosilados entre os metabólitos secundários de determinadas variedades de uvas de vinho. Assim, quando estes compostos estão presentes no vinho, são considerados como originários da uva e não da fermentação. Porém, Carrau e colaboradores (2005) mostraram que a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, por exemplo, foi capaz de produzir diversos terpenos, principalmente, linalol.

Naturalmente, as uvas carregam diferentes espécies de micro-organismos à vinícola. Por isso, os frutos recém-chegados são tratados com 50-75 ppm de dióxido de enxofre (SO<sub>2</sub>) pouco antes do esmagamento. Esse tratamento normalmente inibe boa parte das leveduras selvagens e outros micro-organismos presentes na floração. Após trituração e qualquer outra transformação imediata, a inoculação com leveduras cultivadas pode ter lugar. As estirpes são um pouco mais aclimatadas, preparadas para os efeitos do dióxido de enxofre livre em baixas concentrações. Isto permite que a levedura inoculada domine o processo de fermentação e predominem sobre qualquer levedura selvagem concorrente que pode permanecer viável (VINE, 1981).

Com relação às enzimas que participam do processo de fermentação do vinho, são normalmente encontradas na microflora da própria uva, originadas de leveduras e bactérias (HUMBERT-GOFFARD et al., 2004; VINE, 1981). Para facilitar o processo de vinificação, as indústrias incluem enzimas comerciais, como as que proporcionam decomposição de certos compostos que são de grande importância na fabricação do vinho. Mostos com alta concentração de sólidos suspensos podem liberar excessiva quantidade de dióxido de carbono durante a fermentação (etapa de produção de etanol), o que resulta num violento ponto de ebulição, e assim se torna difícil manter o controle da temperatura (VINE, 1981).

Este processo de aplicação de enzimas, denominado de “bioflavouring” proporciona o desenvolvimento de novas bebidas e a aumento de suas qualidades organolépticas. Esta técnica baseia-se na hidrólise enzimática, por métodos biológicos, dos compostos precursores do aroma. Estes compostos encontram-se vinculados por ligações químicas, e podem estar presentes em muitas plantas, flores e frutos. Em geral, vinhos tratados com beta-glucanase são caracterizados pela maior concentração de muitos compostos voláteis (MASINO et al., 2008).

Blasco e colaboradores (2006) afirmaram que as enzimas, beta-(1→3)-D-glucanases (EC 3.2.1.6), beta-glicosidases (CE 3.2.1.21), poligalacturonases (CE 3.2.1.15) e invertases (CE 3.2.1.26) estavam presentes no início da fermentação, sugerindo que elas eram originárias da própria uva. No entanto, no início da fermentação, os títulos de atividade de beta-glicosidases foram

muito baixos, o que deve ter sido ao efeito inibitório na síntese desta enzima causada pela alta concentração de glicose (STRAUSS et al., 2001).

Além de facilitar a produção e melhorar o assentamento, as beta-glucanases e outras enzimas são usadas no processamento de vinho tinto para ajudar a liberar a cor das uvas e diminuir a viscosidade. A clarificação do mosto é geralmente difícil devido à presença de pectinas extraídas durante a produção do vinho. As pectinas são compostos naturais encontrados nas uvas e agem como uma esponja, aumentando a viscosidade, o que dificulta a liberação do suco, assim, as partículas que turvam o mosto são mantidas em suspensão (DUNN, 2007, NOVOZYMES, 2008).

Para solucionar estes problemas, as vinícolas usam enzimas comerciais produzidas por, basicamente, duas famílias de micro-organismos: *Bacillus* sp. (bactéria) e *Aspergillus* sp., que particularmente são fáceis de manusear, crescem rapidamente e produzem enzimas de alto rendimento (DUNN, 2007, NOVOZYMES, 2008). Porém, o descobrimento das propriedades hepatotóxicas e hepatocarcinogênicas de algumas linhagens de *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus* em perus, na Inglaterra, no início da década de 1960, seguida pela elucidação da estrutura de seus metabólitos tóxicos, as aflatoxinas, fez surgir dúvidas quanto à aplicação de produtos desses micro-organismos em indústrias de alimentos (KOBAYASHI et al., 2007; GEORGIANNA, PAYNE, 2009; GEORGIANNA et al., 2010). Sendo assim, é de grande interesse a descoberta de novos micro-organismos, que tenham grau “GRAS” e que sejam bons produtores de enzimas, para aplicação na indústria de alimentos.

Apesar da existência de leveduras comerciais para aplicação na fermentação do vinho, é mais efetiva a utilização de leveduras que procedam da própria uva. As leveduras selecionadas têm sido utilizadas em muitos outros países, com excelentes resultados, onde os produtos finais obtidos são de melhor qualidade que os produzidos por fermentação espontânea. Portanto, a seleção da levedura adequada é uma estratégia importante para garantir a melhoria das características finais do vinho. Ainda que seja evidente que a qualidade do vinho esteja relacionada à variedade e qualidade da uva, as leveduras podem produzir alguns compostos que melhoram o produto final. Assim, com a finalidade de melhorar os parâmetros de qualidade do vinho, sugere-se utilizar leveduras selecionadas que poderão aprimorar

o processo fermentativo, e tornarão o vinho obtido mais competitivo no mercado (DEQUIN, 2001; LOPES et. al., 2002).

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 MATERIAL

#### 4.1.1 Reagentes

Os reagentes químicos utilizados para o preparo das principais soluções foram de grau analítico (PA).

Os reagentes específicos utilizados foram os substratos Laminarina de *Laminaria digitata* (Sigma), *p*NPG (*p*-nitrofenil-beta-D-glucopiranosídeo - Fluka), botriosferana (beta-glucana) e biomassa micelial de *Bothryosphaeria rhodina* obtida através de cultivos submersos e posterior liofilização.

#### 4.1.2 Equipamentos

- Balança Eletrônica semi-analítica GEHAKA B-440 e Balança Eletrônica Analítica AND HR-200;
- Autoclave vertical FABBE PRIMAR 103.04;
- Câmara de Refluxo Laminar VECO VLFS;
- Incubadora B.O.D. NOVA ÉTICA 411/D;
- Incubadora orbital (Shaker) com temperatura controlada, MARCONI MA 420;
- pHmetro DM-20 Digimed;
- Espectrofotômetro UV mini 1240 Shimadzu;
- Banho-Maria termostaticado Evlab-B.M.E.V:OIS;
- Centrífuga U-32R – Boeco-Germany;
- Microondas Píccolo PANASONIC;
- Máquina Everest Refrigeração EGC 50;
- Microscópio eletrônico de varredura;

- Critical Point Dryer – CPD 030 – BAL-TEC (para secagem das amostras submetidas à microscopia eletrônica de varredura até ponto crítico);
- Sputter Coater - SCD 050 – BAL-TEC (para metalização das amostras submetidas à microscopia eletrônica de varredura).

## 4.2 MÉTODOS GERAIS

### 4.2.1 Micro-organismos

O ascomiceto *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 utilizado foi isolado de cancro de eucalipto por Barbosa et al. (1996), e *Trichoderma harzianum* Rifai isolado por Barbosa (1992).

As leveduras espanholas, citadas na Tabela 4, foram gentilmente concedidas pela Dra Ana Briones Pérez da Universidad de Castilla La Mancha (UCLM) – Ciudad Real, Espanha.

**Tabela 4** – Leveduras espanholas provenientes da UCLM.

Leveduras Espanholas	Códigos
Z1B	ESP 1
QA23	ESP 2
ALB	ESP 3
RUS2, RA17	ESP 4
RUS1, QA23	ESP 5
RUS2, GRE	ESP 6
MAC152, RX60	ESP 7
BL1, ZIMAFLORE	ESP 8
FERMOL AROMF PLUS	ESP 9
URS	ESP 10
MAURIUIN CRU BLANC	ESP 11
MAURIUIN ARWI 796	ESP 12
RUS1 A62	ESP 13
LOC18 2007	ESP 14
ANCHOR WE 372	ESP 15

As uvas, sucos e mostos utilizados para isolar as leveduras e fungos filamentosos, foram coletados de diferentes propriedades e vinícolas da região norte do Paraná, Brasil.

#### 4.2.2 Manutenção dos Micro-organismos

Os fungos filamentosos foram mantidos em tubos de ensaio contendo meio sólido de BDA (batata dextrose ágar) inclinado, enquanto as leveduras em meio de YEPD (extrato de levedura, peptona e dextrose). Após o crescimento homogêneo das colônias em toda a superfície do meio sólido de cultivo, estas foram mantidas a 4 °C, e novos repiques para os respectivos meios foram desenvolvidos trimestralmente.

Para o desenvolvimento de cada experimento, as leveduras foram transferidas do meio de manutenção para placas contendo meio sólido (YEPD) e mantidos a  $28 \pm 2$  °C, durante 4 dias.

#### 4.2.3 Meios de Cultivo

##### 4.2.3.1 Meio extrato de levedura-peptona-glucose (YEPD)

Extrato de levedura	10 g
Peptona	20 g
Glucose	20 g

Após serem adicionados os reagentes, o volume foi completado com água destilada para 1000 mL. Para obtenção do meio sólido foram acrescentados 20 g de Agar. O pH não foi ajustado.

#### 4.2.3.2 Meio mínimo de sais de Vogel

Meio mínimo de Vogel (VOGEL, 1956) foi utilizado como meio basal para o desenvolvimento dos cultivos. Para o seu preparo foram dissolvidos, em 750 mL de água destilada, sucessivamente e com agitação constante à temperatura ambiente, os seguintes reagentes:

Citrato de Na 5 H <sub>2</sub> O	150 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> anidro	250 g
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> anidro	100 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	10 g
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	5 g
Solução de elementos traços	5 mL
Solução de biotina	2,5 mL

A solução de elementos traços foi constituída de:

Ácido Cítrico.1H <sub>2</sub> O	5 g
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	5 g
Fe(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	1 g
Cu(SO <sub>4</sub> ).5H <sub>2</sub> O	0,25 g
MnSO <sub>4</sub> .1H <sub>2</sub> O	0,05 g
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> anidro	0,05 g
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,05 g

O volume final da solução de elementos traços foi completado para 100 mL.

A solução de biotina foi preparada dissolvendo-se 5 mg de biotina (Merck) em 50 mL de água destilada. O pH ajustado na faixa de 5,8 a 6,0 e o volume final foi ajustado para 1 litro. Para o uso, este meio foi diluído 50 vezes em água destilada.

#### 4.2.3.3 Meio de batata-glucose-ágar (BDA)

Batata	200 g
Glucose (Dextrose)	20 g
Ágar	15 g

O volume foi completado com água destilada para 1000 mL. O pH não foi ajustado.

#### 4.2.3.4 Meio de Vogel-glucose-ágar (VGA)

Solução de Vogel	20 mL
Glucose	10 g
Ágar	20 g

O volume foi completado com água destilada para 1000 mL. O pH não foi ajustado.

#### 4.2.4 Isolamento das Leveduras de Uvas, Sucos e Mostos Procedentes da Região Norte do Paraná.

Foram coletadas em 13/04/2008 uvas do tipo Isabel (*Vitis labrusca*), Benitaka (verde) e Rubi (verde) no Sítio São José, propriedade de Silvio Cazone, no município de Rancho Alegre -PR.

Uma segunda coleta foi realizada em 08/05/2008, no município de Marialva – PR. Foram coletadas uvas do tipo Vênus, Itália (verde) e Rubi no Sítio São Gabriel, propriedade de Ubiratan Luiz Polônio; e uvas Takassumi, Itália, Benitaka e Brasil na Chácara Alegria, propriedade de Milton Alegria. Em Marialva, na

Vinícola Coaviti - Cooperativa Agroindustrial dos Viticultores foram também obtidas amostras de mosto constituído por uma mistura dos sucos de uvas Bordô e Isabel.

Em meados do mês de abril de 2008 foram obtidas amostras de uva do tipo Isabel, procedentes do Rio Grande do Sul, fornecidas pela Vinícola Guaravera.

A coleta em Warta, distrito de Londrina, foi realizada no dia 06 de dezembro de 2008, e foram obtidas uvas do tipo Moscato Bailey (verde e madura) e Isabel.

Os bagos de uva foram coletados em sacos de algodão, previamente esterilizados e acondicionados em sacos plásticos. As amostras foram transportadas até o laboratório, devidamente refrigeradas, para evitar o início da fermentação.

Dois ou três bagos de cada cultivar, dos diferentes cachos, foram transferidos assepticamente, com auxílio de uma pinça estéril, para frascos de Erlenmeyer (125 mL), três contendo 25 mL de salina fisiológica e outros três, de igual volume, contendo 25 mL de água destilada estéril, em triplicata. Os frascos foram mantidos à temperatura ambiente por até 48 horas, para que os micro-organismos da flora natural das uvas se proliferassem. Após este período de tempo, uma alíquota de cada frasco de Erlenmeyer foi transferida para placas de Petri contendo meio de YEPD, com uma pipeta estéril. Em seguida, a amostra foi estriada, sobre a superfície do meio sólido, e as placas foram incubadas a  $28 \pm 2$  °C até o desenvolvimento das colônias.

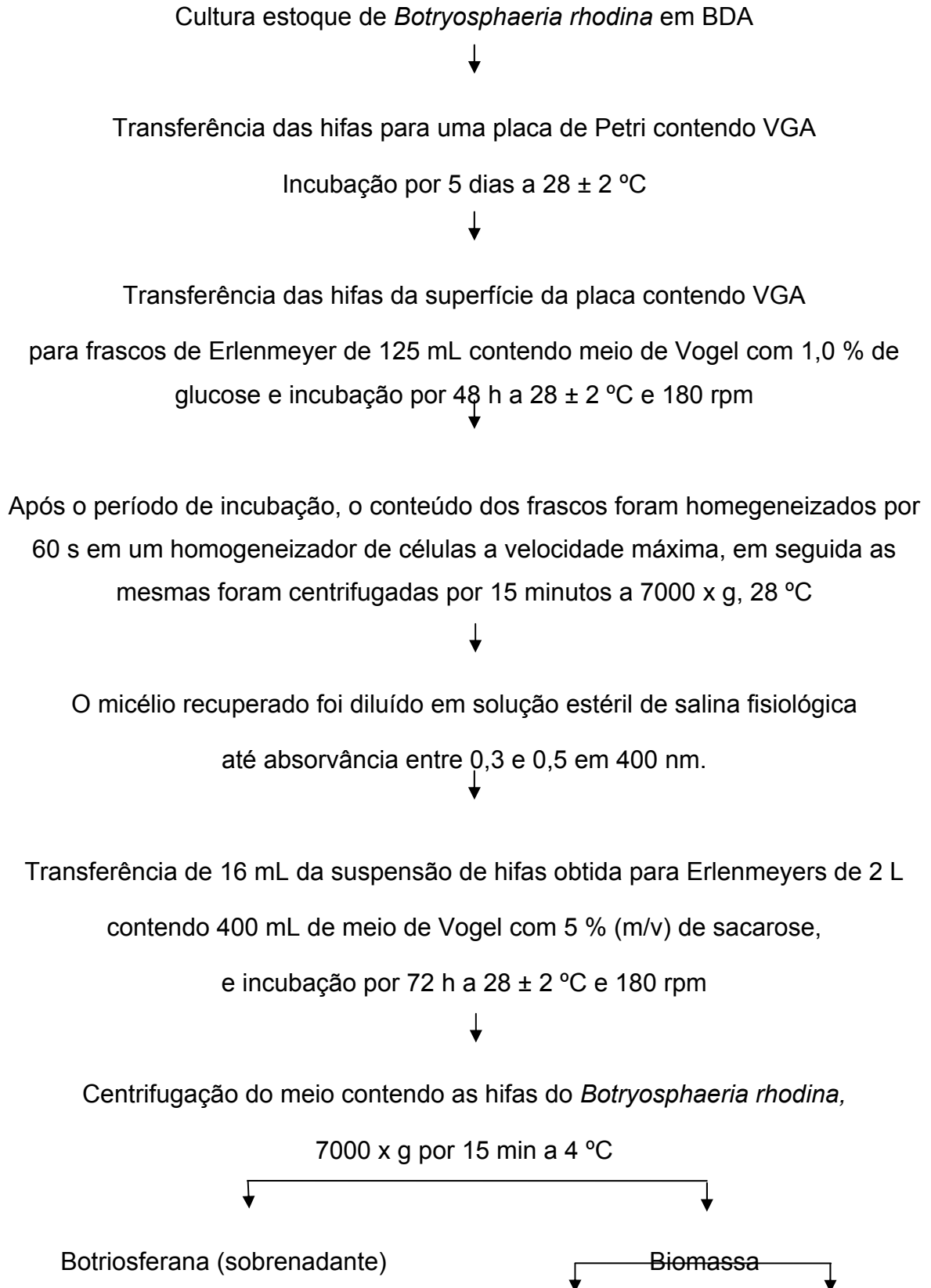
Em uma segunda etapa do isolamento, as leveduras obtidas foram transferidas para placas de Petri contendo YEPD com amoxicilina, pela técnica de esgotamento, para a obtenção de colônias puras. Cada isolado foi mantido em meio sólido inclinado de YEPD a 4 °C.

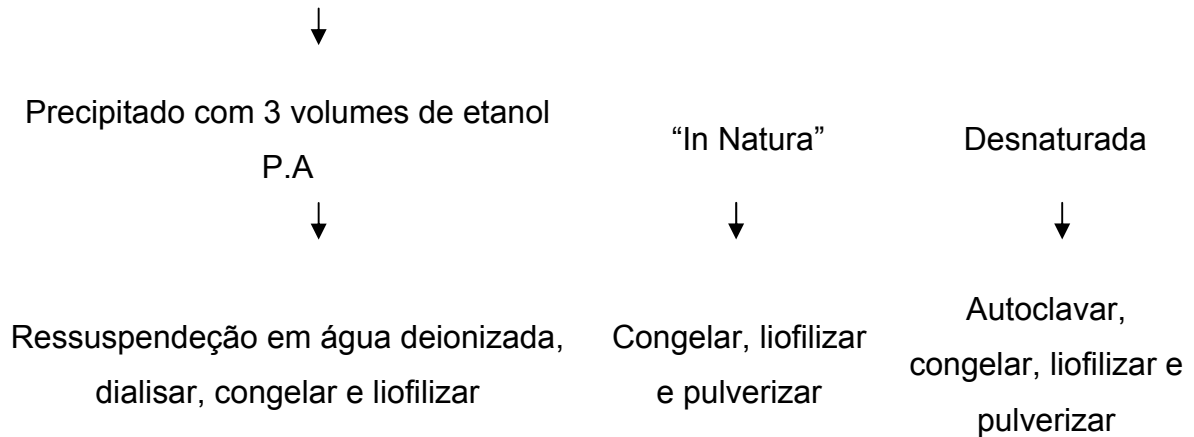
Etapa de isolamento apresentado no esquema no ANEXO A.

#### 4.2.5 Produção da Beta-(1→3; 1→6)-D-Glucana (Botriosferana)

Cultivos do ascomiceto *Botryosphaeria rhodina* foram desenvolvidos para a produção do exopolissacarídeo (EPS) botriosferana, e da biomassa micelial

utilizados como substrato nos cultivos com as leveduras. Estes procedimentos estão apresentados no fluxograma a seguir.





#### 4.2.6 Seleção de Leveduras Produtoras das Enzimas Extracelulares Beta-(1→3)-Glucanase e Beta-Glicosidase

A seleção das leveduras produtoras de beta-(1→3)-glucanase e beta-glicosidase foi desenvolvida na presença de botriosferana como única fonte de carbono em meio sólido e em meio líquido. Devido ao período diferenciado de coleta das uvas, houve a necessidade de desenvolver procedimentos distintos para seleção das leveduras, que estão abaixo descritos:

- Todos isolados de levedura e as quinze cepas de leveduras espanholas, foram cultivadas em placas de Petri contendo meio mínimo de Vogel (1956) e botriosferana 0,8 g/L. Após 120 horas de cultivo, foi avaliada a presença de halos de hidrólise, resultantes da atividade da beta-(1→3)-glucanase, pela adição de etanol P.A às placas;
- As leveduras isoladas de Rancho Alegre-PR, Marialva-PR e Rio Grande do Sul e as leveduras espanholas foram cultivadas em meio líquido mínimo de Vogel (VOGEL, 1956) acrescido de botriosferana 0,2 % (m/v), em tubos de ensaio, contendo 4 mL de meio e incubados a  $28 \pm 2^\circ\text{C}$  sob agitação a 180 rpm, por 72 horas;
- As leveduras isoladas de Warta (Distrito de Londrina-PR) foram cultivadas em frascos de Erlenmeyer (50 mL) contendo meio mínimo de Vogel (VOGEL, 1956) e botriosferana 0,1 % (m/v) como única fonte de carbono.

Os cultivos foram mantidos agitados a 180 rpm, durante 72 horas, a  $28 \pm 2^\circ\text{C}$ ;

- Para finalizar o processo de seleção, dezesseis isolados foram cultivados em botriosferana 0,06 % (m/v), sob agitação, por 96 horas.

Todos os cultivos em meio líquido foram interrompidos por centrifugação, os fluidos livres de células (sobrenadantes) foram utilizados para as determinações das atividades de beta-(1→3)-glucanase e beta-glicosidase.

O fungo *Trichoderma harzianum* foi também cultivado, paralelamente com as leveduras, visto que é produtor das referidas enzimas, sendo, portanto, utilizado como padrão positivo.

#### 4.2.7 Avaliação da Atividade da Beta-(1→3)-Glucanase em pH 3,5 e Etanol 15 % (v/v)

As leveduras selecionadas como melhores produtoras de beta-(1→3)-glucanase foram cultivadas em meio mínimo de Vogel (1956) contendo botriosferana 0,06 % (m/v), durante 96 horas a 180 rpm. Os cultivos foram interrompidos e no extrato livre de células a atividade da beta-(1→3)-glucanase foi avaliada em pH 3,5, na presença de 15 % de etanol, ou seja, em pH e concentração de etanol semelhantes às dos vinhos (RODRÍGUEZ, et al., 2007).

#### 4.2.8 Efeito do Substrato na Produção de Beta-(1→3)-Glucanase e Beta-Glicosidase

A produção das enzimas beta-(1→3)-glucanase e beta-glicosidase pelas leveduras selecionadas como melhores produtoras foram avaliadas em diferentes substratos: celobiose 1 % (m/v), biomassa micelial de *Botryosphaeria rhodina* 1 % (m/v), desnaturada e "in natura". Todos os cultivos foram mantidos por 4 dias a 180 rpm,  $28 \pm 2^\circ\text{C}$  e interrompidos por centrifugação.

#### 4.2.9 Avaliação de Parâmetros de Cultivo que Influenciam a Síntese de Beta-(1→3)-Glucanase e Beta-Glicosidase Extracelulares na Levedura 1WA1

A levedura selecionada 1WA1 foi cultivada em diferentes substratos, botriosferana (beta-(1→3)-D-glucana), celobiose e biomassa micelial de *Botryosphaeria rhodina* desnaturada e “in-natura” (conforme descrito no item 4.2.5). Avaliou-se também o efeito de diferentes concentrações, 0,5 %; 1,0 %; 1,5 %; 2,0 % e 3,0 %, do substrato escolhido para a produção de beta-(1→3)-glucanase e beta-glicosidase, em cultivos submersos contendo sais de Vogel (VOGEL, 1956) e incubados sob agitação a 180 rpm, a 28 °C durante 96 horas. Foram também avaliados a adição de Tween-80 (0,1% v/v), a influência do tempo (0 a 168 horas) e do pH inicial (2,5 a 7,5) de cultivo.

#### 4.2.10 Produção das Enzimas Beta-(1→3)-Glucanase e Beta-Glicosidase pela Levedura 1WA1

Os cultivos foram realizados em frascos de Erlenmeyer (2000 mL) contendo meio mínimo de Vogel (VOGEL, 1956) acrescido de biomassa de *B. rhodina* (1,0 %) como substrato. Cada frasco foi inoculado com uma suspensão de células (obtidas a partir de cultivo em meio sólido de YEPD de 96 horas), contendo  $1 \times 10^7$  células para cada 10 mL de meio de cultivo. Os frascos foram mantidos sob agitação a 180 rpm e  $28 \pm 2$  °C durante 4 dias.

Para obtenção do extrato enzimático, os cultivos foram centrifugados a  $7000 \times g$  durante 15 minutos. O extrato livre de células foi dialisado exaustivamente contra água deionizada e utilizado para determinação dos parâmetros cinéticos de ambas as enzimas.

#### 4.2.11 Propriedades Cinéticas da Beta-(1→3)-Glucanase e da Beta-Glicosidase da Levedura 1WA1

Foram determinadas as propriedades físico-químicas da beta-(1→3)-glucanase e da beta-glicosidase a partir do extrato livre de células, conforme descrito no item 4.2.8.

- **efeito do tempo, do pH e da temperatura:** para avaliar os efeitos do tempo, do pH e da temperatura na atividade da beta-(1→3)-glucanase e da beta-glicosidase, o extrato enzimático foi incubado, separadamente, em diferentes tempos (5 a 90 minutos). Após selecionado o melhor tempo, as enzimas foram avaliadas em diversos tampões com diferentes valores de pH (2.5 a 6.5), as temperaturas avaliadas compreenderam os intervalos de 30 a 85 °C para a beta-(1→3)-glucanase, e de 30 a 90 °C para a beta-glicosidase;
- **estabilidade térmica:** a enzima beta-(1→3)-glucanase foi mantida na ausência de substrato nas temperaturas de 30, 40, 45, 50, 55 e 60 °C, com intervalos de tempo entre 10 min e 24 h. Neste período foram retiradas alíquotas e ensaiadas para atividade enzimática. A beta-(1→3)-glucanase foi determinada em tampão citrato-fosfato pH 4,5, a 60 °C após 20 minutos de incubação.
- **efeito da concentração de substrato:** para determinação do  $K_M$  aparente e da  $V_{máx}$ , o extrato enzimático foi incubado na temperatura e pH ótimos em diferentes concentrações de laminarina (de 0,02 a 1,2 mg/mL) para a beta-(1→3)-glucanase e de pNPG (de 0,016 a 0,48 mg/mL) para a beta-glicosidase.
- **efeito de diferentes sais:** para a determinação do efeito de diferentes sais na atividade enzimática, ambas enzimas foram incubadas na presença de cloretos e/ou sulfatos de diferentes íons metálicos ( $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Mg^{++}$ ,  $Ca^{++}$ ,  $Mn^{++}$ ,  $Cu^{++}$ ,  $Fe^{+++}$  e  $Zn^{++}$ ) nas concentrações de 1mM e 10mM, individualmente.

#### 4.2.12 Otimização da Produção de Beta-(1→3)-Glucanase e Beta-Glicosidase

Com o objetivo de verificar os efeitos das principais variáveis selecionadas para o cultivo da levedura 1WA1, e otimizar a produção de beta-(1→3)-glucanase e beta-glicosidase, foi aplicado um delineamento fatorial  $3^2$  completo, descrito por Cochran e Cox (1957) apud Borsato (1983), para duas variáveis em três níveis de variação, totalizando 12 experimentos, dos quais três são repetições do ponto central.

As variáveis independentes estudadas para a otimização da produção de ambas as hidrolases foram:  $X_1$  = concentração de biomassa micelial de *Botryosphaeria rhodina* (% m/v) e  $X_2$  = pH inicial do cultivo e os níveis de variação estão apresentados na Tabela 5.

**Tabela 5** – Variáveis independentes e níveis de variação para a produção de beta-(1→3)-glucanase e beta-glicosidase

Fatores	Níveis de Variação		
	-1	0	1
$X_1$ Conc. de Biomassa	0,5	1,0	1,5
$X_2$ pH inicial	2,5	5,0	7,5

As variáveis independentes  $X_i$ , foram codificadas para -1, 0, 1 por meio da Equação 1:

$$x_i = \frac{X_i - x}{q} \quad \text{Eq. 1}$$

Onde,

$x_i$  é a variável codificada da variável independente  $X_i$ ;

$x$  é o valor do ponto central;

$q$  é a amplitude entre as variáveis.

A análise de variância (ANOVA) e a regressão linear foram realizadas usando o *software* STATISTIC versão 8.0.

#### 4.2.13 Determinações Analíticas

##### 4.2.13.1 Determinação da atividade da beta-(1→3)-glucanase

A atividade da beta-(1→3)-glucanase foi determinada pela quantificação dos açúcares redutores liberados da laminarina (beta-(1→3)-glucana), que foi utilizada como substrato, de acordo com Giese e colaboradores (2006), com modificações. O volume final do sistema de incubação foi de 0,5 mL, constituído de 150 µL de solução de laminarina a 0,4% (m/v) (substrato), 250 µL do extrato livre de células (fonte de enzima) e 50 µL de tampão acetato de sódio 0,25 M (pH 5,0). O tempo de incubação foi de 60 min a 37 °C. A reação enzimática foi interrompida pela adição de 50 µL de hidróxido de sódio (NaOH) 1,0 M, de acordo com a Tabela 6. A quantificação dos açúcares redutores liberados do substrato laminarina foi realizada de acordo com o método do cuproarsenato descrito por Somogyi (1945) e Nelson (1944). A unidade de atividade (U/mL) da beta-(1→3)-glucanase foi definida como o número de µmol de açúcares redutores liberado por minuto, por mL da solução do extrato enzimático, nas condições padrão de ensaio. O teor de açúcares redutores foi calculado por espectrofotometria a 540 nm, utilizando-se uma curva de calibração (padrão) construída a partir de uma solução de glicose (100 mg/mL) com intervalos de 0 a 100 µg/mL.

**Tabela 6** – Sistema de incubação para determinação da atividade da enzima beta-(1→3)-glucanase

	R <sub>1</sub> (µL)	R <sub>2</sub> (µL)	C <sub>1</sub> (µL)	C <sub>2</sub> (µL)
Substrato	150	150	---	150
Tampão	50	50	50	50
Fonte de enzima	250	250	250	---
Água destilada	---	---	150	250
NaOH	50	50	50	50

Onde  $R_1$  e  $R_2$  são duplicatas dos ensaios enzimáticos,  $C_1$  é o controle da enzima e  $C_2$  é o controle do substrato. A atividade da beta-(1→3)-glucanase foi determinada pela Equação 2:

$$\frac{U}{\text{mL}} = \text{gluc} \times \frac{1}{\text{Vol}} \times \frac{1}{180} \times \frac{1}{t} \times \text{Dil} \quad \text{Eq. 2}$$

Onde,

gluc = Quantidade de glucose ( $\mu\text{mol}$ ) liberada na reação calculada pelo método de Somogyi-Nelson;

Vol = Volume de enzima adicionado ao ensaio (mL);

180 = Peso Molecular da glucose (g/mol);

t = tempo de incubação (minutos).

Dil = Diluição

#### 4.2.13.2 Determinação da atividade da beta-glicosidase

A medida da atividade de beta-glicosidase foi desenvolvida utilizando-se o substrato *p*-nitrofenil-beta-D-glucopiranosídeo de acordo com Belancic e colaboradores (2003). O volume final do ensaio foi de 1,2 mL, o qual constituiu de 10  $\mu\text{L}$  de uma solução de *p*-NPG a 0,4% (m/v) (substrato), 100  $\mu\text{L}$  de extrato livre de células (fonte de enzima) e 90  $\mu\text{L}$  de tampão citrato fosfato (pH 4,0). Após a incubação durante 30 min a  $37 \pm 2$  °C, a reação foi interrompida com adição de 1,0 mL de uma solução de carbonato de sódio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) 0,25 M, de acordo com a Tabela 7. A unidade de atividade (U/mL) da beta-glicosidase foi definida como o número de  $\mu\text{mol}$  de *p*-nitrofenol liberado por minuto por mL da solução de extrato enzimático, nas condições padrão de ensaio. A liberação do *p*-nitrofenol, de coloração amarela, foi determinada espectrofotometricamente, a 410 nm.

**Tabela 7–** Sistema de incubação para determinação da atividade da enzima beta-glicosidase

	R1 (µL)	R2 (µL)	C1 (µL)	C2 (µL)
Substrato	10	10	----	10
Tampão	90	90	90	90
Fonte de enzima	100	100	100	----
Água destilada	----	----	10	100
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	1000	1000	1000	1000

Onde R1 e R2 são duplicatas dos ensaios enzimáticos, C1 é o controle da enzima e C2 é o controle do substrato. A atividade da beta-glicosidase foi determinado pela Equação 3:

$$\frac{U}{\text{mL}} = \frac{\text{Abs}}{\varepsilon} \times \frac{1}{\text{Vol}} \times \frac{1}{t} \times \frac{1}{1,2} \times 1000 \times \text{Dil} \quad \text{Eq. 3}$$

Onde,

Abs = Absorvância líquida foi encontrada pela Equação 4.

$\xi = 18.300 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  (Coeficiente de extinção molar do p-NPG);

Vol = Volume de enzima adicionado ao ensaio (mL);

t = tempo de incubação (minutos);

1,2 = Volume total de incubação (mL).

$$(\text{R1} + \text{R2})/2 - \text{C1} - \text{C2}$$

Eq. 4

#### 4.2.13.3 Açúcares totais solúveis

A determinação dos açúcares totais solúveis foi realizada pelo método do fenol-sulfúrico descrito por Dubois e colaboradores (1956), utilizando-se glucose como padrão. O método consiste na formação do derivado hidroximetil furfural a partir de hexoses ou furfural, a partir de pentoses, pela presença do ácido sulfúrico concentrado, que reage com o fenol, formando um complexo de cor.

#### 4.2.13.4 Açúcares redutores

Os açúcares redutores foram determinados de acordo com o método do cuproarseniato descrito por Somogyi (1945) e Nelson (1944). Estes açúcares aquecidos em meio alcalino transformam-se em enedióis que reduzem o íon cúprico a cuproso. O óxido assim formado, na presença do reativo de Nelson forma um complexo de coloração azul estável, cuja intensidade é proporcional a quantidade de açúcares redutores presentes na amostra. Foi utilizado glucose como padrão.

#### 4.2.13.5 Proteínas totais solúveis

As proteínas solúveis foram quantificadas pelo método de Lowry modificado por Hartree (1972). Foi utilizado como padrão albumina bovina. O método se baseia na formação de um complexo entre a proteína e o reativo cupro-alcalino seguida da redução de sais de fosfomolibdato e fosfotungstato do reativo de Folin Ciocalteu pela tirosina presente nas proteínas.

#### 4.2.14 Microscopia Eletrônica de Varredura

Foram realizadas micrografias eletrônicas de varredura (MEV) da levedura 1WA1 cultivada em glucose 1 % (m/v) e em biomassa de *Botryosphaeria rhodina* 1 % (m/v), ambos acrescidos aos sais de Vogel, mantidos sob agitação a 180 rpm a  $28 \pm 2$  °C, durante 4 dias. Foram realizadas também micrografias das hifas do fungo *B. rhodina* em diferentes etapas do seu preparo, hifas a fresco, após liofilizadas e após autoclavação.

Para uma amostra ser levada ao microscópio eletrônico de varredura, deve estar completamente seca e apresentar condutividade elétrica. Considerando-se que amostras biológicas não estão nestas condições, as mesmas devem passar por procedimentos técnicos específicos.

- Fixação: As amostras foram centrifugadas em eppendorf (aproximadamente 1,5 mL), a 5000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado, e à amostra foram adicionados, aproximadamente, 1,0 mL de fixador (glutaraldeído 2,5 % (m/v), *p*-formaldeído 2 % (m/v) e tampão fosfato 0,1 M (pH 7,2), logo após foram reservadas em geladeira “over-night”. Em seguida, foram lavadas por três vezes consecutivas com tampão fosfato 0,1 M (pH 7,2), para retirada total do fixador, imersas em OsO<sub>4</sub> 1,0 % em tampão fosfato 0,1 M, e reservadas por 1 hora; novamente lavadas com tampão fosfato 0,1 M (pH 7,2), por três vezes, para a retirada do ósmio.
- Desidratação: Após lavagem exaustiva da amostra, iniciou-se a fase de desidratação, cobrindo as amostras com etanol 70 % e reservando-as “over-night”. Em seguida, foram lavadas duas vezes com etanol 70 %, seguido de três vezes com etanol 80 %, depois 90 %, e por último, quatro vezes com etanol P.A. Nesta etapa, toda água das amostras foi substituída por etanol. As amostras foram mantidas a temperatura ambiente.
- Ponto Crítico: As amostras foram envoltas em papel de filtro, colocadas em um “container” para então serem levadas a uma câmara fechada para a secagem ao ponto crítico, ainda na presença de etanol P.A. para evitar a rehidratação. Neste aparelho, o etanol da amostra foi substituído lentamente por CO<sub>2</sub> líquido. Para isto, a câmara permaneceu a 4 °C e pressão de 50 barr. Quando todo etanol foi retirado, a câmara foi aquecida até 31 °C, com conseqüente aumento de pressão para 70 barr. Nestas condições, todo o CO<sub>2</sub> líquido passou para o estado gasoso.
- Metalização: A amostra foi colocada em uma superfície denominada “stuby” (uma plaquinha de alumínio de aproximadamente 1 cm de diâmetro) e levada para uma câmara em um metalizador. Nesta câmara foi gerado vácuo ( $5 \times 10^{-1}$  barr) e alta voltagem (40 mA), para o desprendimento de átomos de uma placa de ouro, e foram introduzidas pequenas quantidades de argônio, para retirar restos de umidade e impurezas, e gerar um movimento circular dos átomos de ouro (nuvem de átomos de ouro), facilitando sua deposição por toda a superfície da amostra.

- Microscópio eletrônico de varredura: O microscópio eletrônico de varredura é capaz de gerar um plasma de elétrons a partir de um filete de tungstênio e alta tensão, que pode chegar aproximadamente a 3000 °C. Deste plasma é originado um feixe de elétrons a partir de um orifício de  $\pm 200$  nm, e percorre uma coluna construída por diversas lentes, até incidir sobre a amostra revestida com ouro, ocasionando o despreendimento de elétrons deste metal. Os elétrons expelidos do ouro são captados e o seu sinal constituirá a imagem.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 ISOLAMENTO DAS LEVEDURAS A PARTIR DE UVAS, SUCOS E MOSTOS PROCEDENTES DA REGIÃO NORTE DO PARANÁ

Foram coletadas 8 variedades de uvas viníferas e de mesa (Vênus, Itália, Rubi, Isabel, Takassumi, Benitaka, Brasil e Moscato Bailey) e mostos de diferentes propriedades e vinícolas, da região norte do Paraná (Rancho Alegre, Marialva e Londrina).

O isolamento dos micro-organismos foi iniciado pela observação do crescimento de diversas colônias de leveduras e fungos filamentosos. As colônias apresentavam diferenças morfológicas, de coloração (brancas, amareladas ou rosadas), aspectos da superfície das colônias (lisa ou rugosa) e brilho (brilhantes ou opacas).

Os isolados foram procedentes de placas contendo meio sólido de YEPD e amoxicilina, que inibiu o crescimento de bactérias. As colônias foram observadas ao microscópio óptico em lâmina a fresco.

A metodologia aplicada para o isolamento dos micro-organismos permitiu obtenção de 108 micro-organismos, sendo estes oitenta e cinco leveduras e treze fungos filamentosos isolados de uvas viníferas e de mesa da região norte do Paraná, e dez leveduras isoladas de uva Isabel obtida do Rio Grande do Sul, as quais são listadas nas Tabelas 8 (leveduras) e 9 (fungos filamentosos), onde estão relacionados os micro-organismos pelo código e origem.

**Tabela 8** – Relação das leveduras isoladas de uvas e mosto

<b>Códigos</b>	<b>Fonte do isolamento (Tipos de uvas)</b>	<b>Procedência</b>
RAS1, RAS2, RAS3, RAS4, RAS5, RAS6, RAS7, RAS8, RAS9, RAS10, RAS11, RAS12, RAA1, RAA2	Isabel	Rancho Alegre PR
RSS1, RSS2, RSS3, RSS4, RSS5, RSS6, RSS7, RSA1, RSA2, RSA3	Isabel	Rio Grande do Sul
<u>1MS1</u> , <u>1MS2</u> , <u>1MS3</u> , <u>1MA1</u> , <u>1MA2</u>	Vênus	
<u>3MS1</u> , <u>3MS2</u> , <u>3MS3</u> , <u>3MA1</u> , <u>3MA2</u>	Rubi	
4MS1, 4MS2, 4MS3, 4MS4, 4MS5, 4MS6, 4MA1, 4MA2, <u>4MA3</u> , <u>4MA4</u> , <u>4MA5</u>	Takassumi	Marialva PR
<u>5MS1</u> , <u>5MS2</u> , <u>5MA1</u> , <u>5MA2</u>	Itália	
<u>6MA1</u> , <u>6MA2</u> , <u>6MA3</u> , <u>6MS1</u>	Benitaka	
<u>7MS1</u> , <u>7MA1</u> , <u>7MA2</u>	Brasil	
Mosto1, Mosto2, Mosto3, Mosto4	Isabel e Bordô	
1WA1, 1WA2, 1WA3, 1WA4, 1WS1, 2WA1, 2WS1, 2WS2, 2WS3	Moscato Bailey	
3WA1, 3WA2, 3WA3, 3WA4, 3WA5, 3WA6, 3WA8, 3WA9, 3WA10, 3WA11, 3WA12, 3WA13, 3WA14, 3WS1, 3WS2, 3WS3, 3WS5, 3WS6, 3WS7, 3WS8, 3WS10, 3WS11, 3WS12, 3WS13, 3WS14, 3WS15	Isabel	Warta PR

**Tabela 9** – Relação dos fungos filamentosos isolados de uvas e mosto

<b>Códigos</b>	<b>Fonte do isolamento (Tipos de uvas)</b>	<b>Procedência</b>
FRA1, FRA2, FRA9	Isabel	Rancho Alegre PR
FRA4, FRA5, FRA6	Benitaka	
FRA7, FRA11, FRA12	Rubi	
FM2	Itália	Marialva PR
FM3	Rubi	
FM6R, FM6V	Benitaka	

Guimarães em 2005 obteve quatorze leveduras isoladas da casca de uva da variedade Terci (Bordô), somando um total de sessenta e um micro-organismos, entre isolados de uva, sucos, mosto e vinho tinto de Colombo, região metropolitana de Curitiba. De todas as leveduras isoladas, apenas quatorze foram caracterizadas com perfil bioquímico compatível com a espécie *Saccharomyces cerevisiae* e características apropriadas para serem empregadas no processo artesanal de produção de vinho.

Embora o isolamento de micro-organismos tenha resultado na obtenção de leveduras e fungos filamentosos, foram utilizadas apenas as leveduras para dar continuidade ao trabalho, visto que o objetivo principal do projeto em que se insere este trabalho é utilizar enzimas de leveduras para melhoria da qualidade dos vinhos.

## 5.2 SELEÇÃO DE LEVEDURAS PRODUTORAS DAS ENZIMAS EXTRACELULARES BETA-(1→3)-GLUCANASE E BETA-GLICOSIDASE

### 5.2.1 Detecção da Atividade de Beta-(1→3)-Glucanase e Beta-Glicosidase em Meio Sólido, por Meio de Zimograma

As leveduras isoladas foram avaliadas quanto a produção do complexo glucanólítico através da observação de halo de hidrólise em placas contendo botriosferana. O diâmetro do halo de atividade apresenta valores maiores que o diâmetro da colônia, indicando a secreção e difusão dessas enzimas no meio. Através do método de zimograma desenvolvido (Figura 4), foi possível identificar leveduras produtoras das enzimas, porém não se pode comparar o tamanho do halo com os valores de atividade, pois esse método é apenas qualitativo.



**Figura 4** – Halo de atividade de beta-(1→3)-glucanase da levedura 1WA1

Sendo assim, surgiu a necessidade do desenvolvimento de cultivos submersos para avaliar a produção das enzimas beta-(1→3)-glucanase e beta-glicosidase pelas leveduras isoladas.

### 5.2.2 Seleção das Leveduras Produtoras de Beta-(1→3)-Glucanase e Beta-Glicosidase em Meio de Cultivo Líquido

As leveduras isoladas de Rancho Alegre, de Marialva e do Rio Grande do Sul e leveduras espanholas, foram avaliadas quanto a produção das enzimas beta-(1→3)-glucanase e beta-glicosidase através de cultivos submersos em tubos de ensaio com 4 mL de meio, contendo 0,2% (m/v) de botriosferana liofilizado e meio mínimo de Vogel 2% (v/v) (Tabela 10).

**Tabela 10** – Atividade de beta-(1→3)-glucanase e beta-glicosidase das leveduras isoladas de uvas de Rancho Alegre, Rio Grande do sul, Marialva e leveduras espanholas, cultivadas em 0,2 % (m/v) de botriosferana

<b>Leveduras (Código)</b>	<b>Beta-(1→3)-glucanase (U/mL)</b>	<b>Beta-glicosidase (U/mL)</b>
RAS1	0,0001	0,0
RAS2	0,0002	0,0
RAS3	0,0	0,0
RAS4	0,0001	0,0002
RAS5	0,0005	0,001
RAS6	0,0002	0,0003
RAS7	0,0002	0,0006
RAS8	0,0005	0,0
RAS9	0,0005	0,0005
RAS10	0,0005	0,0005
RAS11	0,0002	0,0007
RAS12	0,0001	0,0
RAA1	0,0004	0,0
RAA2	0,0002	0,0
RSS1	0,0002	0,0
RSS2	0,0002	0,0
RSS3	0,0001	0,0
RSS4	0,0002	0,0
RSS5	0,0002	0,0
RSS6	0,0002	0,0
RSS7	0,0009	0,0004
RSA1	0,0003	0,0
RSA2	0,0004	0,0
RSA3	0,0003	0,0
1MS1	0,0001	0,0002
1MS2	0,0002	0,0
1MS3	0,0004	0,0002
1MA1	0,0	0,0
1MA2	0,0002	0,0002
3MS1	0,0003	0,0
3MS2	0,0004	0,0
3MS3	0,0002	0,0
3MA1	0,0004	0,0
3MA2	0,0004	0,0
4MS1	0,0003	0,0
4MS2	0,0002	0,0004
4MS3	0,0003	0,0
4MS4	0,0002	0,0003
4MS5	0,0003	0,0
4MS6	0,0	0,0
4MA1	0,0002	0,0
4MA2	0,0003	0,0

Continuação da Tabela 10.

<b>4MA3</b>	<b>0,002</b>	<b>0,0</b>
4MA4	0,0002	0,0
<b>4MA5</b>	<b>0,001</b>	<b>0,0004</b>
5MS1	0,0004	0,0
5MS2	0,0004	0,0002
5MA1	0,0003	0,0
5MA2	0,0005	0,0
<b>6MS1</b>	<b>0,0055</b>	<b>0,004</b>
6MA1	0,0002	0,0001
<b>6MA2</b>	<b>0,006</b>	<b>0,0043</b>
6MA3	0,002	0,0
7MS1	0,0002	0,0
7MA1	0,0003	0,0
7MA2	0,0003	0,0
Mosto1	0,0005	0,0
Mosto2	0,0003	0,0
Mosto3	0,0004	0,0
Mosto4	0,0003	0,0
ESP 1	0,0002	0,0
ESP 2	0,0002	0,0
<b>ESP 3</b>	<b>0,0005</b>	<b>0,0</b>
ESP 4	0,0003	0,0
ESP 5	0,0	0,0
ESP 6	0,0002	0,0
ESP 7	0,0002	0,0
ESP 8	0,0005	0,0001
ESP 9	0,0003	0,0001
<b>ESP 10</b>	<b>0,001</b>	<b>0,0001</b>
ESP 11	0,0003	0,0
ESP 12	0,0003	0,0001
ESP 13	0,0002	0,0001
ESP 14	0,0003	0,0001
ESP 15	0,0004	0,0
<i>T. harzianum</i>	0,099	0,0024

De acordo com a Tabela 10, foi possível observar que algumas leveduras produziram maiores títulos de atividade enzimática, sendo elas: 4MA3, 4MA5, 6MS1 e 6MA2 entre as isoladas brasileiras e entre as espanholas ESP 3 e ESP 10.

Na Tabela 11, são apresentados os resultados de atividade das leveduras isoladas de Warta, cultivadas em frascos de Erlenmeyer (50 mL) contendo meio mínimo de Vogel e botriosferana 0,1 % (m/v), após 72 horas sob agitação a 180 rpm a 28 °C. Dentre as quais se destacaram as leveduras 1WA1, 1WA2, 2WS2,

3WS2, 3WS3, 3WS5, 3WS6, 3WS10, 3WS13 e 3WA10 na produção das enzimas beta-(1→3)-glucanase e beta-glicosidase

**Tabela 11** – Atividade de beta-(1→3)-glucanase e beta-glicosidase de leveduras isoladas de uvas de Warta, cultivadas em 0,1 % (m/v) de botriosferana

<b>Micro-organismos (Código)</b>	<b>Beta-(1→3)-glucanase (U/mL)</b>	<b>Beta-glicosidase (U/mL)</b>
<b>1WA1</b>	<b>0,113</b>	<b>0,0053</b>
<b>1WA2</b>	<b>0,086</b>	<b>0,0059</b>
1WA3	0,0001	0,0002
1WA4	0,0	0,0001
1WS1	0,0035	0,0002
2WA1	0,0001	0,0002
2WS1	0,031	0,0035
<b>2WS2</b>	<b>0,0415</b>	<b>0,0027</b>
2WS3	0,0305	0,0022
3WA1	0,0	0,0002
3WA2	0,017	0,0036
3WA3	0,001	0,0
3WA4	0,0	0,0001
3WA5	0,024	0,0089
3WA6	0,0	0,0002
3WA8	0,0005	0,0014
3WA9	0,0003	0,0
<b>3WA10</b>	<b>0,085</b>	<b>0,0052</b>
3WA11	0,0055	0,0002
3WA12	0,008	0,0003
3WA13	0,0001	0,0
3WA14	0,0375	0,0001
3WS1	0,0002	0,0002
<b>3WS2</b>	<b>0,091</b>	<b>0,0126</b>
<b>3WS3</b>	<b>0,017</b>	<b>0,0126</b>
<b>3WS5</b>	<b>0,0925</b>	<b>0,0068</b>
<b>3WS6</b>	<b>0,084</b>	<b>0,0056</b>
3WS7	0,0465	0,0053
3WS8	0,003	0,0
<b>3WS10</b>	<b>0,0015</b>	<b>0,0029</b>
3WS11	0,0003	0,0002
3WS12	0,0	0,0005
<b>3WS13</b>	<b>0,046</b>	<b>0,0044</b>
3WS14	0,0004	0,0001
3WS15	0,0004	0,0003
<i>T. harzianum</i>	0,15	0,0072

Entre todas leveduras estudadas, foram pré-selecionadas dezesseis como produtoras de beta-(1→3)-glucanase e beta-glicosidase, sendo elas: 1WA1, 1WA2, 2WS2, 3WS2, 3WS3, 3WS5, 3WS6, 3WS10, 3WS13, 3WA10, 4MA3, 4MA5, 6MA2, 6MA3, ESP 3 e ESP 10.

Dando sequência ao processo de seleção, as leveduras pré-selecionadas foram comparadas quanto a produção de beta-(1→3)-glucanase e beta-glicosidase, tendo sido cultivadas em frascos de Erlenmeyer (50 mL) com meio mínimo de Vogel acrescido de botriosferana 0,06 % (m/v). Os resultados estão descritos na Tabela 12. Em negrito, os isolados que se destacaram quanto a produção de ambas as enzimas.

**Tabela 12** – Comparação da produção de beta-(1→3)-glucanase e beta-glicosidase pelos isolados de levedura pré-selecionados cultivados em botriosferana 0,06%(m/v)

<b>Micro-organismos (código)</b>	<b>Beta-(1→3)-glucanase (U/mL)</b>	<b>Beta-glicosidase (U/mL)</b>
<b>1WA1</b>	0,095	<b>0,0029</b>
<b>1WA2</b>	<b>0,0825</b>	<b>0,0025</b>
<b>2WS2</b>	0,066	<b>0,0012</b>
3WS2	0,0415	0,0015
3WS3	0,0	0,0
<b>3WS5</b>	<b>0,075</b>	<b>0,0024</b>
3WS6	0,03	0,0016
3WS10	0,0275	0,0009
3WS13	0,032	0,0009
3WA10	0,022	0,0009
ESP 3	0,0003	0,0
ESP 10	0,001	0,0
4MA3	0,002	0,0
4MA5	0,0005	0,0001
6MA2	0,0015	0,0
6MS1	0,0001	0,0

Neste experimento quatro leveduras foram selecionadas por apresentarem os maiores títulos de atividade das enzimas, tendo sido todas isoladas de uvas da região da Warta: 1WA1, 1WA2, 2WS2 e 3WS5.

### 5.3 COMPARAÇÃO DAS ATIVIDADES DE BETA-(1→3)-GLUCANASE DOS EXTRATOS ENZIMÁTICOS, EM VALORES DE PH E CONCENTRAÇÃO DE ETANOL DO VINHO

O pH do vinho varia em torno de 3,5 (RODRÍGUEZ et al., 2007), enquanto que a concentração de etanol é próxima de 7,2 a 12,0 %, o que corresponde de 9 a 15 °GL (AQUARONE et al., 2001). Considerando-se que a seleção destas leveduras produtoras de beta-glucanase visa a aplicação desta enzima em processos de maturação de vinhos, para melhorar o aroma e o sabor, estas devem exercer atividade nos referidos valores de pH e concentração de etanol, hidrolisando ligações entre carboidratos e agliconas.

Portanto, os extratos enzimáticos obtidos a partir das quatro leveduras pré-selecionadas foram incubados em dois diferentes tampões: citrato (0,2 M) e citrato-fosfato (0,25 M) em pH 3,5, na presença e ausência de 15 % de etanol. Os resultados estão apresentados na Tabela 13.

A presença de 15 % de etanol não inibiu a atividade da beta-(1→3)-glucanase de nenhuma das quatro leveduras pré-selecionadas. Ao contrário, a adição de etanol no ensaio enzimático, das enzimas produzidas pelas quatro leveduras pré-selecionadas proporcionou um pequeno aumento na atividade da beta-(1→3)-glucanase.

O isolado de levedura 1WA1 foi o que apresentou maior atividade de beta-(1→3)-glucanase nos diferentes tampões e também na presença de etanol 15 %. Não foi possível comparar dados da literatura científica com os obtidos neste trabalho, visto que não tinham sido comparadas as atividades de beta-glucanases de leveduras, na ausência e presença de etanol. Entretanto, Strauss e colaboradores (2001), ao selecionarem leveduras produtoras de diferentes enzimas aplicáveis em vinho, determinaram a atividade de beta-(1→3)-glucanase, em pH 3,2, produzidas por leveduras isoladas de uvas da África do Sul, dentre elas *Candida stellata*, *Candida hellenica* e *Kloeckera apiculata*.

**Tabela 13** – Comparação da atividade de beta-(1→3)-glucanase, dos extratos enzimáticos dos isolados de leveduras 1WA1, 1WA2, 2WS2, 3WS5, em pH 3,5 e em 15 % de etanol

Tampão pH 3,5	Micro-organismos (Código)	Beta-(1→3)-glucanase (U/mL)	
		s/ etanol	c/ etanol 15%
Citrato	1WA1	0,128	0,146
	1WA2	0,108	0,130
	2WS2	0,092	0,107
	3WS5	0,099	0,114
Citrato- Fosfato	1WA1	0,133	0,145
	1WA2	0,113	0,128
	2WS2	0,091	0,105
	3WS5	0,097	0,112

(\*) Tempo de incubação utilizado: 30 minutos, 37 °C

Manners e colaboradores (1976) determinaram parâmetros cinéticos de uma exo-beta-(1→3)-gucanase comercial de origem fúngica em tampão citrato-fosfato (0,05 M). O mesmo tampão foi utilizado por Bar-Shimon (2004), na caracterização de uma beta-(1→3)-glucanase extracelular produzida por *Candida oleophila*.

Os resultados da atividade de beta-(1→3)-glucanase não apresentaram grande diferença entre os dois tampões avaliados. Portanto, optou-se por utilizar o tampão citrato-fosfato para os próximos experimentos, visto que este tem sido utilizado na determinação da atividade desta enzima por diferentes pesquisadores (MANNERS et al., 1976; BAR-SHIMON et al., 2004; PENG, CHI e WANG, 2009;).

#### 5.4 COMPARAÇÃO DA PRODUÇÃO DE BETA-(1→3)-GLUCANASE E BETA-GLICOSIDASE EXTRACELULARES PELOS ISOLADOS DE LEVEDURA 1WA1, 1WA2, 2WS2, 3WS5, EM DIFERENTES SUBSTRATOS

A beta-glucana laminarina é um substrato de alto custo para ser utilizado em cultivos submersos para a produção de beta-glucanase e beta-glicosidase. Porém, a beta-glucana botriosferana pode ser um substrato mais

acessível, visto que nosso grupo de pesquisa detém a patente da produção deste exopolissacarídeo (EPS) pelo fungo *Botryosphaeria rhodina*. A produção deste EPS é maior em sacarose comercial como fonte de carbono, em comparação com a glucose (STELUTTI et al., 2004). Entretanto, a biomassa micelial do *B. rhodina*, quando cultivado nas condições apropriadas para a produção do EPS botriosferana, além de estar envolta por quantidades apreciáveis deste EPS, também possui em sua composição química beta-(1→3)-;(1→6)-D-glucana e beta-(1→6)-D-glucana. Conseqüentemente, esta biomassa micelial pode também ser utilizada como substrato de baixo custo para a produção de beta-(1→3)-glucanases, visto que é um sub-produto da produção do botriosferana.

A celobiose vem sendo utilizada como substrato para a produção de beta-glicosidade (SKORY, FREER e BOTHAST, 1996). Porém, não tem sido descrito se pode atuar como fonte indutora de beta-glucanases para leveduras, visto que existem fungos filamentosos, como o *T. harzianum*, que secretam beta-glucanase quando cultivados em glucose como única fonte de carbono (GIESE et al., 2006). Conseqüentemente existem beta-glucanases que não são reprimidas por glucose.

Portanto, celobiose, botriosferana e biomassa micelial de *B. rhodina* foram utilizadas nos próximos experimentos para selecionar, dentre os quatro isolados de levedura, o melhor produtor de beta-glucanase e qual seria o substrato de menor custo e apropriado para se obter maiores títulos de beta-(1→3)-glucanase e beta-glicosidase.

A levedura 1WA1 se destacou quanto a produção da beta-(1→3)-glucanase em todos os substratos avaliados (Tabela 14), apresentando valores de atividade próximos tanto quando obtido de cultivos em biomassa de *B. rhodina* "in natura" (0,917 U/mL) como na forma desnaturada (0,930 U/mL).

Para as outras leveduras avaliadas, a biomassa micelial "in natura" foi o melhor substrato para a produção da beta-(1→3)-glucanase, mostrando que esta fonte é boa indutora para a produção desta enzima.

Esses resultados já tinham sido observados com outros micro-organismos. Masih e Paul em 2002 descreveram a atuação de uma levedura, *Pichia membranifaciens*, isolada de uva, sobre a parede celular do fungo filamentoso *Botrytis cinerea*, causador da doença mofo cinzento em videiras. Os autores

mostraram que a secreção da enzima beta-(1→3)-glucanase foi estimulada na presença do fitopatógeno.

**Tabela 14** – Comparação da produção de beta-(1→3)-glucanase pelas leveduras 1WA1, 1WA2, 2WS2, 3WS5, nos substratos botriosferana, celobiose, biomassa micelial de *B. rhodina* “in natura” e desnaturada, em cultivos submersos durante 96 h

Isolado de Levedura	Botriosferana (0,06%)	Celobiose (1,0 %)	Micélio <i>B. rhodina</i> “in natura” (1,0%)		Micélio <i>B. rhodina</i> Desnaturado (1,0%)	
	U/mL	U/mL	U/mL	U/mg	U/mL	U/mg
1WA1	0,145	1,047	0,917	3,380	0,930	4,010
1WA2	0,128	0,475	0,780	2,835	0,730	3,100
2WS2	0,105	0,519	0,765	2,848	0,498	2,175
3WS2	0,112	0,491	0,818	3,028	0,265	1,103

O ensaio enzimático para detectar a atividade da beta-(1→3)-glucanase foi realizado em tampão citrato-fosfato pH 3,5 e com adição de etanol 15%, enquanto que o da beta-glicosidase foi em tampão citrato-fosfato pH 4,0 sem adição de etanol.

O fungo filamentoso *Trichoderma harzianum* teve a produção da beta-(1→3)-glucanase estimulada quando ao seu cultivo foram adicionados 1,0 % (m/v) de fragmentos de *Botrytis cinerea* (1040 mU/mg de proteína) ou *Saccharomyces cerevisiae* (1000 mU/mg de proteína) (CRUZ et al., 1993).

Esta indução da produção da beta-(1→3)-glucanase pode ser devido a presença de beta-glucanas na parede celular de alguns micro-organismos (VÁSQUEZ-GARCIDUEÑAS, LEAL-MORALES e HERRERA-ESTRELLA, 1998).

Na Tabela 15 é possível observar que tanto a celobiose como a biomassa de *B. rhodina* foram bons substratos para a produção da enzima beta-glicosidase pelas quatro leveduras avaliadas. Porém, como já foi mencionado que a biomassa de *B. rhodina* é um substrato de menor custo, sendo a celobiose uma fonte comercial.

Skory, Freer e Bothast (1996) obtiveram melhor atividade de beta-glicosidase de *Candida wickerhamii* quando cultivada em celobiose como única fonte

de carbono em comparação com dextrose, etanol e glicerol, principalmente em condição anaeróbica.

A levedura 1WA1 também se destacou quanto a produção da beta-glicosidase em todos os substratos avaliados, apresentando valores de atividade próximos tanto quando foi cultivada em celobiose (0,027 U/mL) quanto em biomassa de *B. rhodina* “in natura” (0,030 U/mL).

**Tabela 15** – Comparação da produção de beta-glicosidase pelas leveduras 1WA1, 1WA2, 2WS2, 3WS5, nos substratos botriosferana, celobiose, biomassa micelial de *B. rhodina* “in natura” e desnaturada, em cultivos submersos durante 96 h

Isolado de Levedura	Botriosferana (0,06%)	Celobiose (1,0 %)	Micélio <i>B. rhodina</i> “in natura” (1,0%)		Micélio <i>B. rhodina</i> Autoclavado (1,0%)	
	U/mL	U/mL	U/mL	U/mg	U/mL	U/mg
1WA1	0,003	0,027	0,030	0,101	0,024	0,103
1WA2	0,002	0,028	0,024	0,085	0,021	0,085
2WS2	0,001	0,030	0,024	0,087	0,019	0,081
3WS2	0,002	0,026	0,027	0,102	0,012	0,048

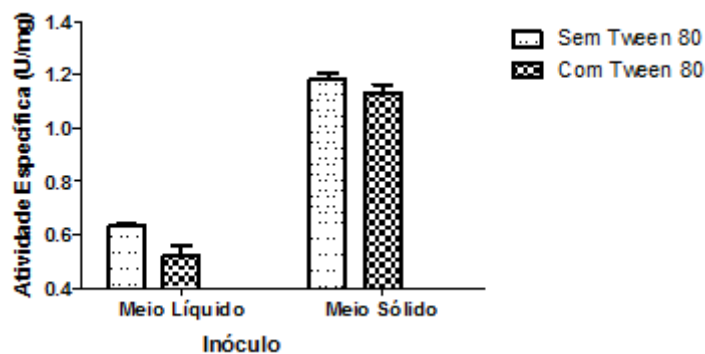
De acordo com os resultados apresentados, a levedura 1WA1 se destacou, dentre as quatro avaliadas, como uma boa produtora das enzimas beta-(1→3)-glucanase e beta-glicosidase.

#### 5.5 PADRONIZAÇÃO DO INÓCULO E EFEITO DA ADIÇÃO DE TWEEN 80 NA PRODUÇÃO DE BETA-(1→3)-GLUCANASE E BETA-GLICOSIDASE PELO ISOLADO DE LEVEDURA 1WA1

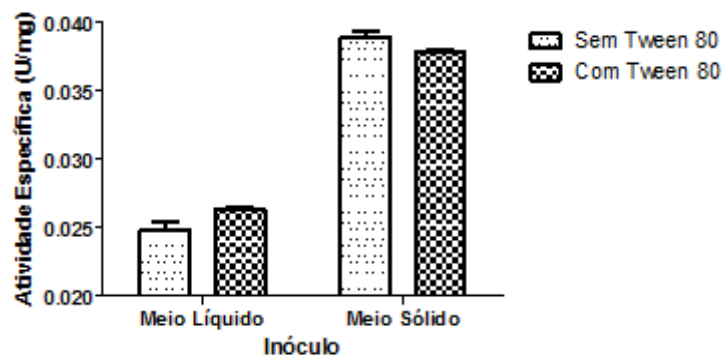
Com o objetivo de padronizar o inóculo, e paralelamente, avaliar se a procedência das células do isolado de levedura 1WA1, afetaria a produção de beta-glucanase e beta-glicosidase,  $1 \times 10^7$  células/10mL obtidas de cultivos em meio sólido de YEPD ou de meio líquido de Vogel com glucose 1,0 % (m/v) foram inoculadas em frascos de Erlenmeyer com meio mínimo de Vogel (VOGEL, 1956) e

1,0 % de biomassa de *B. rhodina* “in natura”. Os resultados destes experimentos estão apresentados nas Figuras 5 e 6.

É conhecido que a adição do surfatante Tween 80 ao meio de cultivo pode influenciar positivamente a liberação de algumas enzimas extracelulares, como por exemplo, glucoamilases (GONZÁLEZ, FARIÑA, FIGUEROA, 2008) e também lacases (DEKKER et al., 2007). Portanto, para avaliar o efeito da adição deste surfactante na produção de beta-glucanase e beta-glicosidase pela levedura 1WA1, foram realizados cultivos em meio mínimo de Vogel, acrescido de 1,0 % de biomassa de *B. rhodina* “in natura”, com ou sem Tween 80 0,1 % (m/v), mantidos sob agitação a 180 rpm, 28 °C por 96 horas. Estes resultados também estão apresentados nas Figuras 5 e 6.



**Figura 5** – Atividade específica da beta-(1→3)-glucanase da levedura 1WA1, inoculada a partir de meio sólido ou líquido, e cultivada na presença e na ausência de Tween 80



**Figura 6** – Atividade específica da beta-glicosidase da levedura 1WA1, inoculada a partir de meio sólido ou líquido, e cultivada na presença e ausência de Tween 80

Os resultados da Figura 5 mostram que houve maior produção de beta-(1→3)-glucanase (1,19 U/mg) e beta-glicosidase (0,04 U/mg) (Figura 6) quando o inóculo utilizado foram de células procedentes de meio sólido YEPD. A presença do Tween 80 não influenciou positivamente a produção de beta-(1→3)-glucanase e também de beta-glicosidase. Rana e colaboradores (2003) cultivaram o fungo *Trichoderma harzianum* em meio com adição de Tween 80 (0,2 g/L) para obtenção da enzima beta-(1→3)-glucanase, entretanto, não objetivaram um estudo sobre a influência da adição deste surfactante na produção da enzima. O Tween 80 pode ter sido utilizado para dispersar os conídios inoculados no meio de cultivo.

Não foram encontrados relatos na literatura científica, da comparação do efeito do Tween 80 na produção das enzimas beta-(1→3)-glucanase e beta-glicosidase, assim como se a procedência das células inoculadas, se de meio sólido ou líquido, afetam a produção destas enzimas.

Portanto, optou-se por utilizar células procedentes do meio sólido de YEPD e não adicionar Tween 80 nos próximos experimentos.

Conforme descrito no item 5.4 deste trabalho, a biomassa micelial do *B. rhodina* foi o melhor substrato para a produção de beta-(1→3)-glucanase e beta-glicosidase pelo isolado de levedura 1WA1. Entretanto, utilizou-se 1 % (m/v) deste substrato. Considerando-se que a concentração do substrato é um parâmetro de cultivo importante para que induza a síntese de beta-glucanase e beta-glicosidase, decidiu-se avaliar o efeito da concentração de biomassa micelial de *B. rhodina* na síntese destas enzimas.

## 5.6 EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE BIOMASSA MICELIAL DE *BOTRYOSPHERA RHODINA* NA PRODUÇÃO DE BETA-(1→3)-GLUCANASE E BETA-GLICOSIDASE PELA LEVEDURA 1WA1

Foram avaliadas as concentrações de biomassa: 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 e 3,0 % (m/v) em cultivos submersos na produção de beta-(1→3)-glucanase e beta-glicosidase pela levedura 1WA1, conforme descrito no 4.2.7 e os resultados estão apresentados nas Tabelas 16 e 17.

**Tabela 16** – Avaliação do efeito de diferentes concentrações de biomassa de *B. rhodina* “in natura” na produção de beta-(1→3)-glucanase e beta-glicosidase pela levedura 1WA1

Cultivos	Proteínas Totais Solúveis residuais (mg/mL)	Atividade Enzimática			
		(U/mL)		(U/mg)	
		Beta-(1→3)-glucanase	Beta-glicosidase	Beta-(1→3)-glucanase	Beta-glicosidase
0,5 %	0,239	0,227	0,010	0,950	0,042
1,0 %	0,386	0,332	0,016	0,860	0,042
1,5 %	0,529	0,426	0,023	0,805	0,044
2,0 %	0,730	0,465	0,031	0,637	0,043
3,0 %	0,974	0,546	0,035	0,561	0,036

**Tabela 17** – Açúcares totais e redutores solúveis iniciais e residuais dos cultivos da levedura 1WA1 em diferentes concentrações de biomassa de *B. rhodina*

Cultivos	Açúcares solúveis (mg / mL)			
	Inicial		Residual	
	Totais	Redutores	Totais	Redutores
0,5 %	0,841	0,351	0,493	0,002
1,0 %	1,530	0,717	0,886	0,009
1,5 %	2,256	1,006	1,232	0,009
2,0 %	2,756	1,508	1,586	0,017
3,0 %	4,105	3,198	2,131	0,019

A produção de beta-(1→3)-glucanase e beta-glicosidase aumentou com o aumento da concentração de biomassa micelial utilizada como substrato. Também aumentou a concentração de proteínas totais solúveis no extrato enzimático em 96 horas de cultivo, com o aumento da concentração de biomassa micelial. Conseqüentemente, quando calculados os valores de atividade específica destes extratos, houve diminuição com o aumento da concentração do substrato. Portanto, optou-se por utilizar 1% (m/v) a concentração do substrato, visto que a atividade específica (0,86 U/mg) para a beta-(1→3)-glucanase foi a segunda maior obtida, e que a concentração de açúcares totais residuais solúveis (0,89 mg/mL) (Tabela 17) proporcionaria, conjuntamente com a parte insolúvel da biomassa, quantidades de carbono e nitrogênio suficientes para o desenvolvimento da levedura

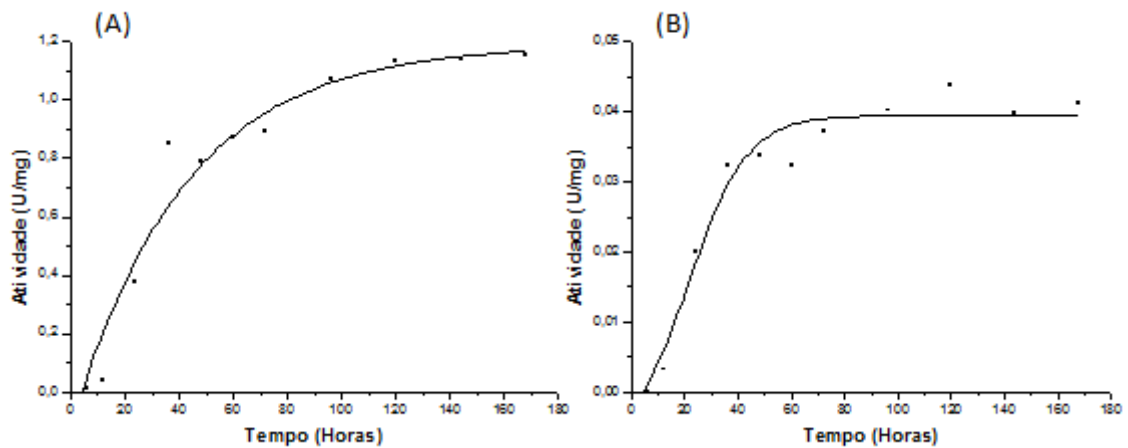
1WA1 em uma curva de crescimento, para determinar o tempo de cultivo no qual haveria a maior produção de ambas as enzimas em estudo.

Excetuando-se o trabalho descrito por Giese e colaboradores (2006), no qual avaliaram a produção de beta-glucanase pelo *Trichoderma harzianum* em biomassa micelial de *Botryosphaeria rhodina*, não foram relatados trabalhos que utilizam biomassa fúngica como substrato para a produção de beta-glucanases e beta-glicosidases por leveduras. Apenas um trabalho relatou o desenvolvimento da levedura, *Pichia membranifaciens*, sobre a parede celular do fungo filamentoso *Botrytis cinerea*, *in vivo*, com a finalidade de avaliar o controle biológico deste fungo pela beta-glucanase produzida pela levedura, a qual hidrolisa a beta-glucana da parede celular fúngica impedindo-o de sobreviver (MASIH; PAUL, 2002).

#### 5.7 CURVA DE PRODUÇÃO DE BETA-(1→3)-GLUCANASE E BETA-GLICOSIDASE PELA LEVEDURA 1WA1 UTILIZANDO-SE 1 % (M/V) DE BIOMASSA MICELIAL DE *BOTRYOSPHAERIA RHODINA*

Fungos filamentosos, como por exemplo, *Trichoderma harzianum* e *Botryosphaeria rhodina*, necessitam de maior tempo de cultivo, 5 e 10 dias, respectivamente, para a produção das enzimas glucanolíticas, quando cultivados em botriosferana como fonte de carbono (GIESE et al., 2005). As leveduras, ao contrário dos fungos filamentosos, produzem essas enzimas em menor intervalo de tempo, como por exemplo, a *Pichia anomala* YF07b produziu a beta-(1→3)-glucanase com apenas 3 dias de cultivo (WANG et al., 2007).

Com o objetivo de estudar o efeito do tempo na produção de beta-(1→3)-glucanase e beta-glicosidase, uma curva de crescimento da levedura foi acompanhada durante 168 horas, utilizando-se 1,0 % (m/v) de biomassa micelial de *B. rhodina* “*in-natura*”, interrompendo-se 3 cultivos nos seguintes intervalos de tempo: 0, 6, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 96, 120, 144, 168 horas. Os resultados estão apresentados na Figura 7 (A) e (B).



**Figura 7** – Produção de beta-(1→3)-glucanase (A) e beta-glicosidase (B), pelo isolado de levedura 1WA1 em 1 % de biomassa micelial de *B. rhodina*

Os resultados mostram que a produção de beta-(1→3)-glucanase foi aumentando até 96 horas (1,1 a 1,2 U/mg), quando houve um platô de atividade que permaneceu constante até 168 horas de cultivo. Entretanto, a maior produção de beta-glicosidase (0,03 a 0,04 U/mg) foi em 72 horas de cultivo, e também permaneceu estável até 168 horas. Portanto, escolheu-se o tempo de 96 horas de cultivo, visto que havia um platô de atividade de ambas as enzimas para os próximos experimentos. Os valores de açúcar total e redutor solúvel residual, proteína total solúvel, e pH final dos cultivos estão apresentados na Tabela 18.

Giese e colaboradores (2005) relataram a produção de beta-glucanase por *Trichoderma harzianum* e *Botryosphaeria rhodina*, utilizando como substrato 1 % de biomassa micelial de *B. rhodina*, em 10 dias de cultivo. A atividade enzimática foi 0,80 e 0,67 U/mL, respectivamente, utilizando-se laminarina como substrato.

**Tabela 18** – Açúcares totais e redutores solúveis residuais, proteínas totais solúveis, e pH final dos extratos enzimáticos obtidos durante a curva de crescimento da levedura 1WA1 em 1 % (m/v) de *Botryosphaeria rhodina*

Tempo Horas	Açúcares Solúveis Residuais (mg / mL)		Proteínas totais solúveis residuais (mg/mL)	pH*
	Totais	Redutores		
0	3,785	0,224	0,655	5,67
6	3,154	0,168	0,652	5,83
12	2,423	0,019	0,488	6,03
24	1,627	0,020	0,464	7,03
36	1,624	0,009	0,455	7,11
48	2,222	0,015	0,503	6,97
60	3,734	0,010	0,487	7,01
72	3,323	0,011	0,463	6,99
96	3,325	0,013	0,452	7,04
120	3,235	0,015	0,442	7,12
144	3,159	0,010	0,448	7,10
168	3,095	0,009	0,450	6,95

\* pH inicial = 5,8

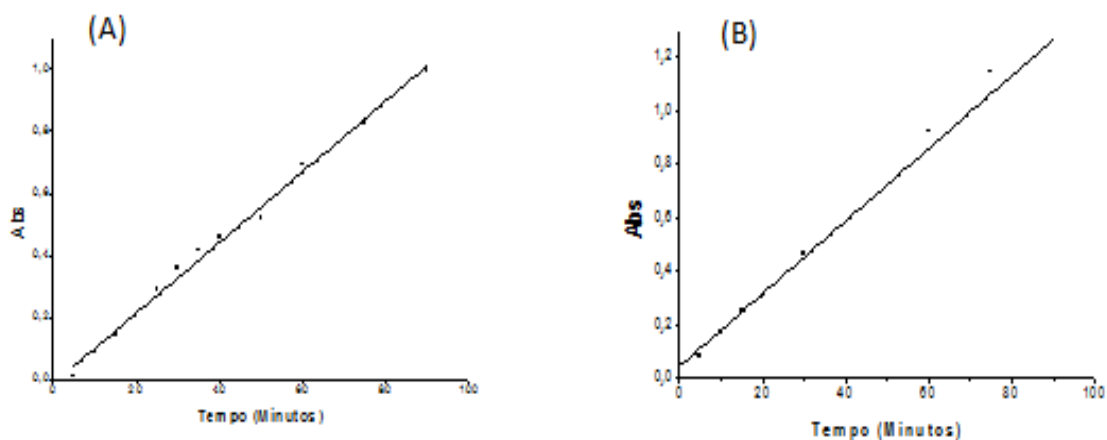
Os açúcares totais residuais presentes nos sobrenadantes dos controles do meio de cultivo foram solubilizados, durante o processo de autoclavação, a partir da biomassa micelial do *Botryosphaeria rhodina*. No tempo zero de cultivo, havia aproximadamente 3,8 mg/mL, ou seja, 0,38 g % de açúcares totais solúveis, disponíveis como substrato para a levedura 1WA1. Destes, 0,02 g% eram açúcares redutores e 0,06 g% proteínas solúveis e o pH inicial era 5,67 (pH do meio de Vogel). Depois de 36 horas de cultivo houve um consumo de 57 % dos açúcares totais solúveis, 96 % dos açúcares redutores e 30,5 % de proteínas totais solúveis. Em 60 horas de cultivo houve um aumento de açúcares totais solúveis atingindo os níveis de concentração do tempo zero de cultivo, demonstrando que as enzimas beta-glucanases e beta-glicosidases estavam exercendo suas respectivas atividades sobre a biomassa micelial fúngica, hidrolisando-a, visto que os níveis de produção de ambas atingiram o platô de produção após 60 horas de cultivo. Após este período de tempo, a quantidade de proteínas totais solúveis permaneceu relativamente constante até 168 horas. Entre 72 e 168 horas de cultivo a quantidade de açúcares totais e redutores residuais tiveram ligeiro decréscimo, enquanto que as atividades de ambas as enzimas permaneceram também relativamente estáveis. Os valores de pH também não apresentaram variações elevadas.

## 5.8 PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DA BETA-(1→3)-GLUCANASE E BETA-GLICOSIDASE PRODUZIDAS PELO ISOLADO DE LEVEDURA 1WA1

Para a determinação dos parâmetros cinéticos da beta-(1→3)-glucanase e beta-glicosidase, foi utilizado como extrato enzimático o sobrenadante do cultivo da levedura 1WA1, tendo sido utilizado 1,0 % (m/v) de biomassa de *B. rhodina* como substrato, e meio mínimo de Vogel (VOGEL, 1956), sob agitação por 96 horas.

### 5.8.1 Efeito do Tempo de Incubação na Atividade da Beta-(1→3)-Glucanase e Beta-Glicosidase

Com o objetivo de determinar o melhor tempo de incubação para padronizar o ensaio enzimático para avaliar a atividade das enzimas foram desenvolvidas as respectivas curvas da cinética de tempo, entre 5 e 90 minutos de incubação, a 37 °C, para a beta-(1→3)-glucanase Figura 8(A) e beta-glicosidase Figura 8(B).



**Figura-8** – Cinética de tempo da atividade das enzimas beta-(1→3)-glucanase (A) e beta-glicosidase (B) presentes no extrato enzimático do isolado de levedura 1WA1, obtido de cultivos com biomassa micelial de *B. rhodina* como substrato

A curva de tempo da atividade da beta-(1→3)-glucanase (Figura 8A) apresentou uma linearidade mais longa, até os 90 minutos avaliados, do que a da beta-glicosidase (Figura 8B), que iniciou uma curvatura a partir de 60 minutos, mostrando valores de absorvância mais elevados neste período de tempo. Portanto, optou-se pela escolha de um curto período de incubação, visto que os parâmetros cinéticos de pH e temperatura ótimos ainda deveriam ser estabelecidos. Considerando-se que os ensaios enzimáticos prévios tinham sido determinados em 30 minutos de incubação, optou-se por padronizar 20 minutos o tempo para os próximos ensaios para ambas as enzimas.

Diferentes tempos de incubação para determinar a atividade de beta-(1→3)-glucanase tem sido descritos na literatura, desde períodos mais curtos como apenas 10 minutos para beta-(1→3)-glucanase produzida por *Trichoderma harzianum* (GIESE et al., 2005; YI et al., 2008), como mais longos, até 1 hora de incubação para beta-(1→3)-glucanase de *Saccharomyces cerevisiae* (DAENEN et al., 2008). Outra beta-(1→3)-glucanase de levedura *Saccharomyces cerevisiae* clonada em *Escherichia coli*, descrita por Suzuki e colaboradores (2001) teve também o ensaio enzimático padronizado com 20 minutos de incubação.

O tempo descrito para a determinação da atividade de beta-glicosidase para quatro leveduras do gênero *Candida* tem sido 20 minutos (SIM; HANG, 1996), assim como para outra levedura *Debaryomyces vanriijiae*, nativa de uva (BELANCIC et al., 2003). Entretanto, para esta mesma enzima produzida por *Pichia pastoris* Turan e Zheng (2005) determinaram após 30 minutos de incubação.

Uma vez estabelecido o tempo de incubação para determinar a atividade da beta-(1→3)-glucanase e beta-glicosidase do isolado de levedura 1WA1 foram desenvolvidos os ensaios para a determinação do pH e temperatura ótimos destas enzimas descritos a seguir.

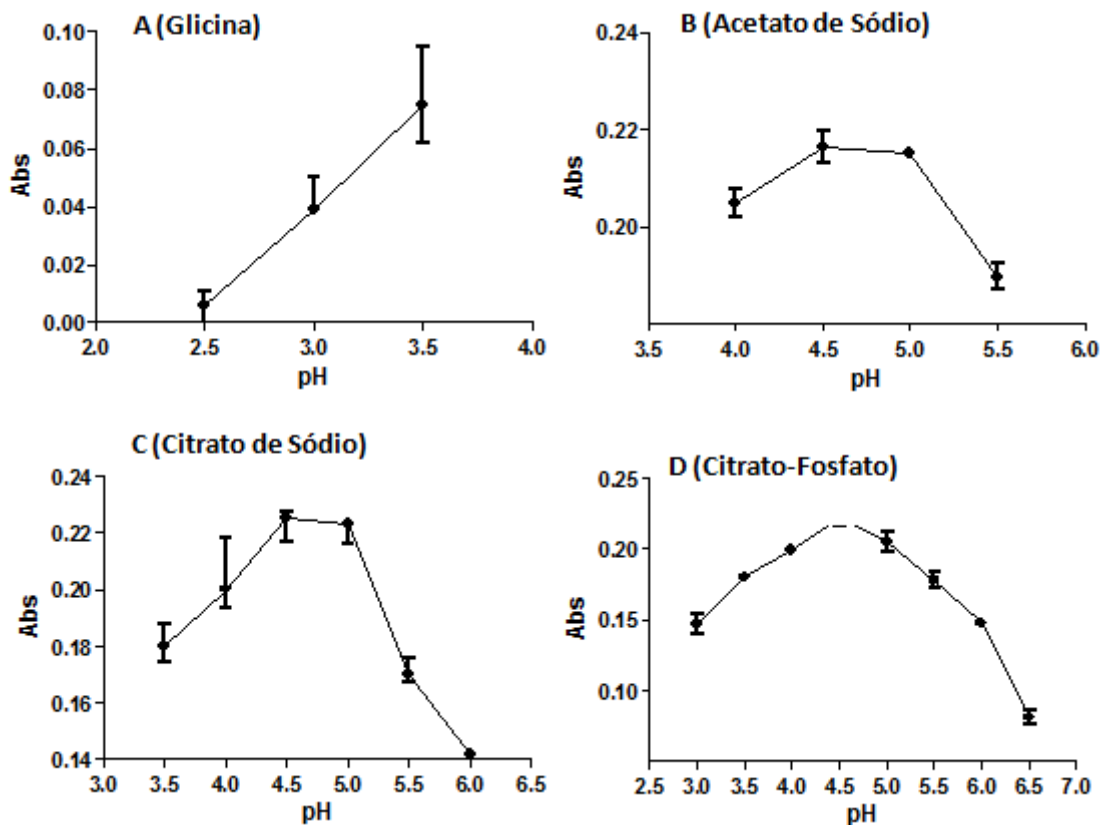
### 5.8.2 Efeito do Tampão e do pH de Incubação na Atividade de Beta-(1→3)-Glucanase e Beta-Glicosidase

Para determinar o pH ótimo da atividade da beta-(1→3)-glucanase e beta-glicosidase, o extrato enzimático foi incubado com quatro diferentes tampões: glicina, acetato de sódio, citrato de sódio e citrato-fosfato, na faixa de pH de 2,5 a 6,5.

A faixa de pH utilizada para a determinação da atividade tem sido de 3,2 em acetato de sódio, para leveduras isoladas de uvas (STRAUS et al., 2001), até 5,6 para uma beta-(1→3)-glucanases produzida por *Cândida albicans*, utilizando-se o mesmo tampão (STUBBS et al., 1999).

Em 1965 Brock relatou a determinação do extrato bruto de uma beta-(1→3)-glucanase de levedura de fermento, na qual foi utilizada tampão fosfato de potássio pH 5,5. Em 2002, esta hidrolase, produzida por *Pichia membranifaciens* FY-101 foi determinada em tampão acetato de potássio, em pH 5,0, por Masih e Paul.

Na Figura 9 pode ser observado que a beta-(1→3)-glucanase do isolado de levedura 1WA1, apresentou máxima atividade em pH 4,5 nos tampões avaliados que contemplavam este valor de pH. Os tampões citrato de sódio e citrato-fosfato proporcionaram um perfil melhor desta curva.

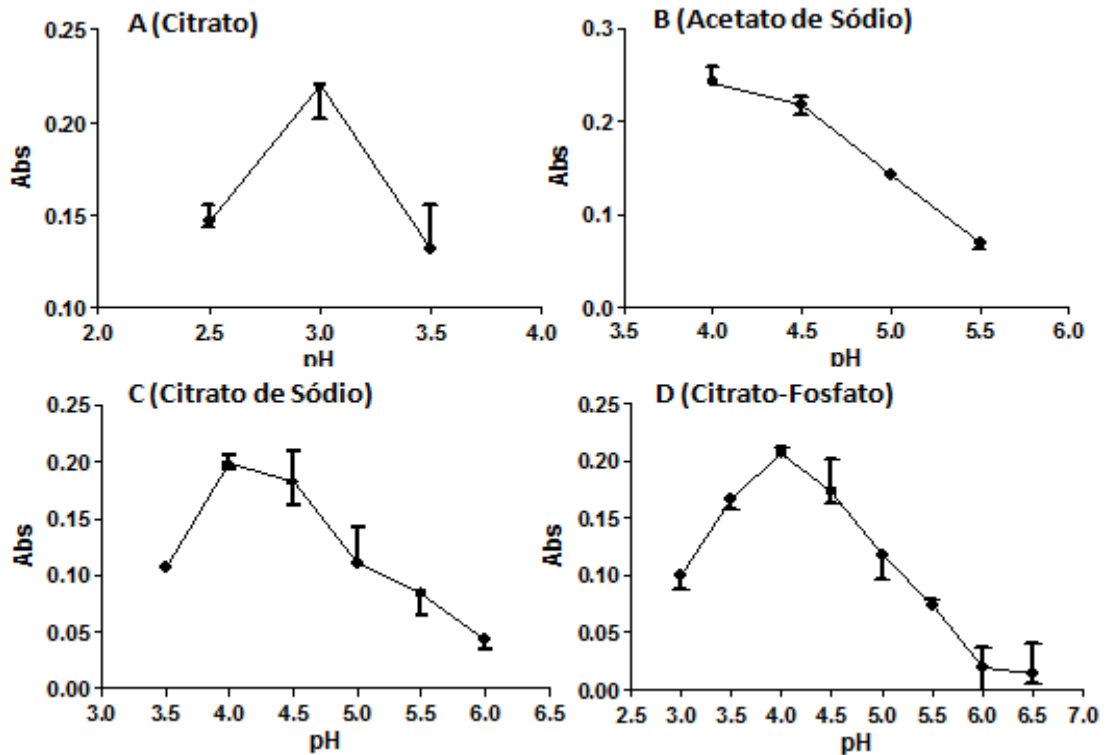


**Figura 9** – Atividade da beta-(1→3)-glucanase em diferentes pH e tampões: (A) Glicina, (B) Acetato de sódio, (C) Citrato de sódio e (D) Citrato-fosfato

O tampão citrato-fosfato foi selecionado como padrão para a determinação da atividade da beta-(1→3)-glucanase do isolado de levedura 1WA1. Wang e colaboradores (2007) também utilizaram este tampão para determinar a atividade de uma beta-(1→3)-glucanase purificada de levedura *Pichia anomala* YF07b, cujo pH ótimo foi também 4,5. Entretanto, a beta-(1→3)-glucanase purificada da levedura marinha *Williopsis saturnus* WC91-2, apresentou atividade ótima a pH 4.0 em tampão acetato (PENG, CHI e WANG, 2009). Portanto, o pH ótimo do extrato bruto da beta-(1→3)-glucanase produzida pela levedura 1WA1 está dentro da faixa citada na literatura.

A Figura 10 mostra as curvas de pH da beta-glicosidase do isolado de levedura 1WA1 com os tampões glicina, acetato de sódio, citrato-fosfato e citrato de sódio. Com exceção do tampão glicina, no qual a maior atividade foi observada a pH 3,0, a enzima beta-glicosidase apresentou maior atividade a pH 4,0, com destaque para o tampão acetato de sódio.

O pH ótimo do extrato bruto das beta-glicosidases produzidas pelas leveduras *Candida pulcherrima* e *Kloeckera apiculata* foi a pH 4,0 utilizando-se tampão McIlvaine (RODRÍGUEZ et al., 2007). Entretanto, o pH ótimo desta enzima produzida pela *Candida guilliermondii* foi a pH 6,0 em tampão citrato-fosfato.



**Figura 10** – Atividade da beta-glicosidase em diferentes pHs e tampões: (A) Glicina, (B) Acetato de sódio, (C) Citrato de sódio e (D) Citrato-fosfato

A atividade das beta-glicosidases é geralmente determinada em tampão acetato (SIM; HANG, 1996; OH et al., 1999; MURRAY et al., 2004). Por exemplo, a beta-glicosidase da levedura *Debaryomyces vanriijiae* isolada de uva foi determinada em tampão acetato a pH 5,0 (BELANCIC et al., 2003). O pH ótimo relatado para o extrato bruto da beta-glicosidase produzida por *Cladosporium resinae* foi a pH 4,5 neste referido tampão (OH et al., 1999). Portanto, o pH ótimo desta beta-glicosidase do isolado de levedura 1WA1 também está dentro dos valores de pH relatados na literatura para esta hidrolase.

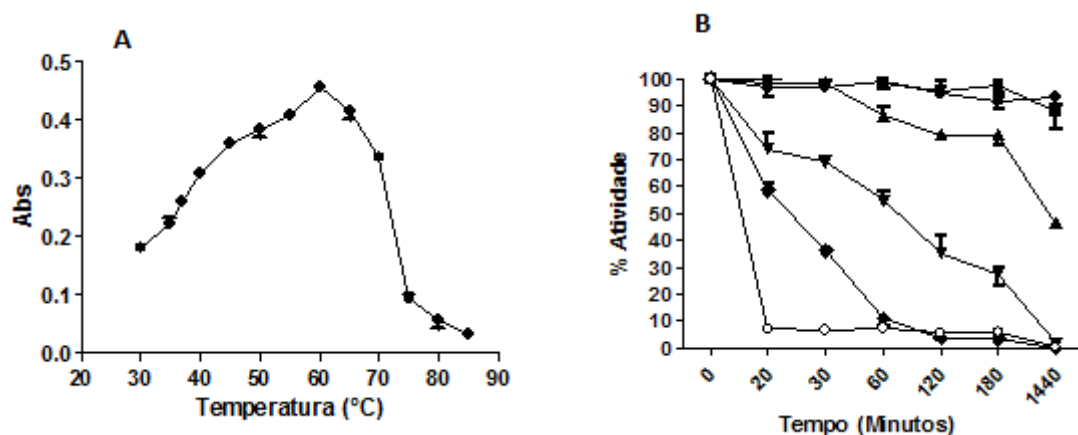
Uma vez estabelecidos o tampão e pH ótimo para determinar a atividade das enzimas beta-(1→3)-glucanase e beta-glicosidase produzidas pela

levedura 1WA1 foi avaliado o efeito de diferentes temperaturas, na atividade destas enzimas.

### 5.8.3 Efeito da Temperatura de Incubação na Atividade da Beta-(1→3)-Glucanase e Beta-Glicosidase

A Figura 11 (A) apresenta o perfil de atividade da beta-(1→3)-glucanase produzida pela levedura 1WA1, na faixa de temperatura de 30 a 85°C. A temperatura ótima foi obtida em 60°C. Na Figura 11 (B) pode ser observada a estabilidade desta enzima na faixa de temperatura entre 30 e 60°C. Apesar desta enzima ter apresentado temperatura ótima em 60°C, sua maior estabilidade foi no intervalo de 30 a 40 °C por mais de 24 horas.

A determinação da atividade da beta-(1→3)-glucanase tem sido desenvolvida em diferentes temperaturas, podendo variar de 25 °C (MASIH, PAUL, 2002) até 50°C (BAR-SHIMON et al., 2004).



**Figura 11 –** (A) Atividade da beta-(1→3)-glucanase em diferentes temperaturas e (B) estabilidade em tampão citrato-fosfato pH 4,5 (●) 30 °C, (■) 40 °C, (▲) 45 °C, (▼) 50 °C, (◆) 55 °C e (○) 60 °C

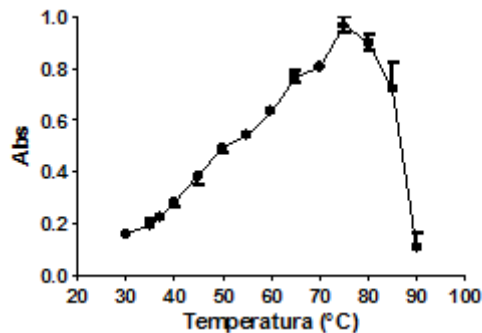
Algumas beta-(1→3)-glucanases purificadas tem apresentado temperaturas ótimas na faixa de 40 °C a 55 °C (BELANCIC et al. 2003; GIL et al.,

2005). Uma exo-beta-(1→3)-glucanase purificada produzida por *Williopsis saturnus* WC91-2, por exemplo, apresentou atividade ótima a 40 °C e manteve-se estável entre 20 e 50 °C por 24 horas, no pH ótimo (4.0) (PENG, CHI e WANG, 2009).

Rana e colaboradores (2003) utilizaram a metodologia de superfície de resposta para determinar a atividade ótima de uma beta-(1→3)-glucanase de *Trichoderma harzianum* NCIM 1185, combinando o pH e temperatura, que foram 3,6 e 41 °C, respectivamente.

A temperatura ótima da beta-(1→3)-glucanase do isolado de levedura 1WA1 apesar de elevada (60 °C), sua estabilidade foi maior entre 30 e 40 °C por mais de 24 horas, o que poderá favorecer sua aplicação durante o processo de maturação do vinho, que acontece entre 25 e 28 °C (DAUDT et al., 1975).

A Figura 12 apresenta o perfil de atividade da beta-glicosidase da levedura 1WA1 na faixa de temperatura entre 30 e 90 °C. A temperatura ótima foi a 75°C. Murray e colaboradores (2004), também relataram uma temperatura ótima elevada (71,5 °C) de uma beta-glicosidase produzida pelo fungo filamentoso *Talaromyces emersonni* clonada em *Trichoderma reesei*.



**Figura 12** – Atividade da beta-glicosidase em diferentes temperaturas

Barbagallo e colaboradores (2004) compararam a atividade da beta-glicosidase de *Aspergillus niger*, de fonte comercial, com a de leveduras isoladas de mosto e vinho; a temperatura ótima da preparação comercial foi de 62 °C, enquanto que para as cepas de leveduras foi de 20 °C.

Uma beta-glicosidase extracelular purificada, produzida pelo fungo filamentoso *Cladosporium resinae*, apresentou atividade ótima a 50 °C (OH et al.,

1999), enquanto que esta mesma enzima produzida pela levedura *Debaryomyces vanriijae* isolada de vinhedo no Chile, apresentou melhor atividade a 40 °C (BELANCIC et al., 2003).

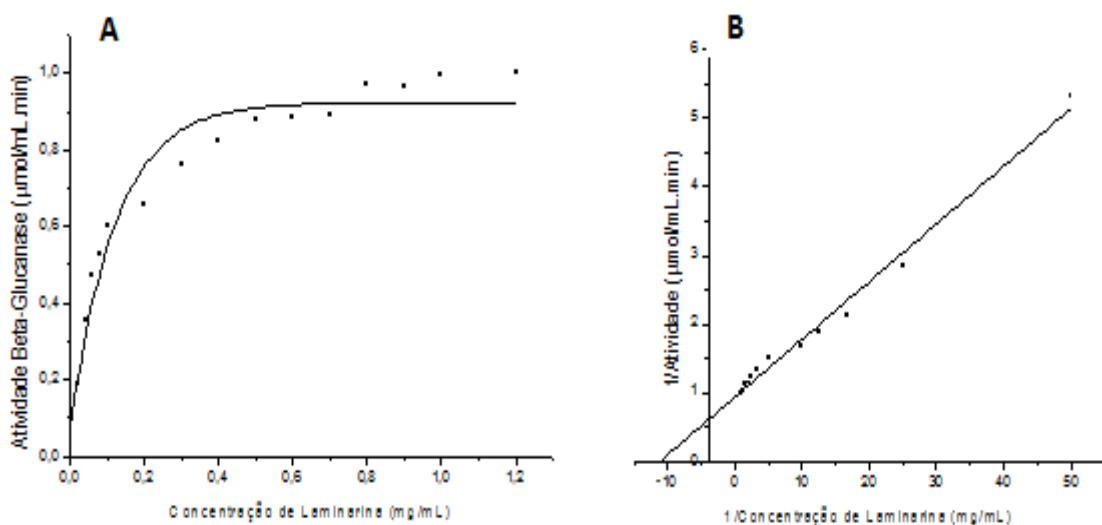
Portanto, a beta-glicosidase do isolado da levedura 1WA1 é interessante para novos estudos, visto que possui elevada temperatura ótima.

A temperatura ótima encontrada para a beta-(1→3)-glucanase foi 60 °C e esta enzima foi estável por mais de 24 horas nas temperaturas entre 30 e 40 °C. Enquanto que a temperatura ótima para a beta-glicosidase foi 75 °C.

### 5.9 CURVAS DE MICHAELIS-MENTEN E LINEWEAVER-BURK DA BETA-(1→3)-GLUCANASE PARA LAMINARINA

Para analisar seu perfil cinético, a beta-(1→3)-glucanase foi incubada em diferentes concentrações de laminarina (0,02 a 1,2 mg/mL).

Os resultados estão apresentados na Figura 13, onde (A) mostra que o perfil da enzima está de acordo com o de Michaelis-Menten e (B) o plote de Lineweaver-Burk. O  $K_M$  aparente da beta-(1→3)-glucanase foi 0,09 mg/mL para laminarina e a  $V_{m\acute{a}x}$  da reação nas condições padronizadas foi 1,07 U/mL.



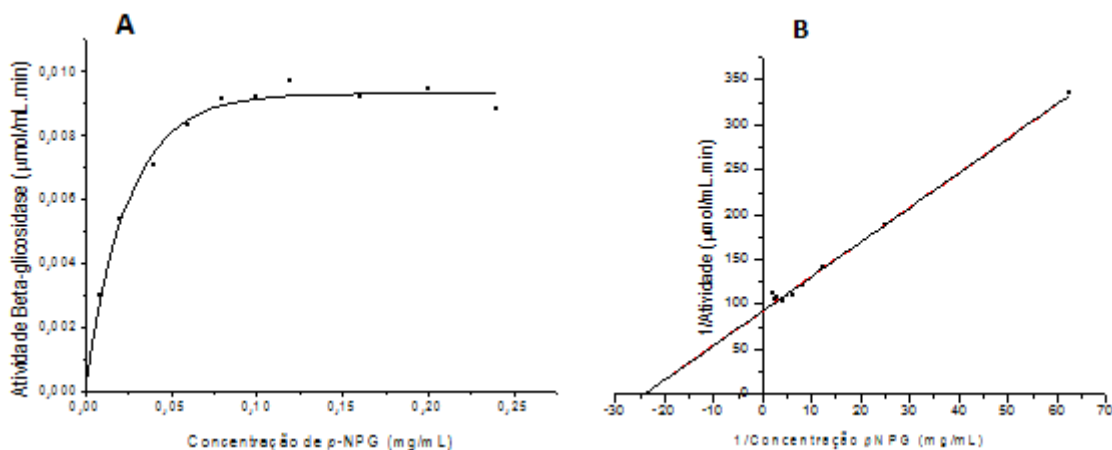
**Figura 13** – (A) Curvas de Michaelis-Menten e (B) Lineweaver-Burk ( $K_M$  aparente), da beta-(1→3)-glucanase para laminarina

O  $K_M$  aparente da beta-(1→3)-glucanase é relativamente baixo, ou seja, a hidrolase possui alta afinidade pela laminarina. Xu, Shih e Poulton (2006) encontraram para a mesma enzima de *Pichia pastoris*,  $K_M$  aparente igual a 3,5 mg/mL. Rana e colaboradores (2003) relataram o  $K_M$  aparente de uma beta-(1→3)-glucanase de *Trichoderma harzianum* NCIM 1185 igual a 0,173 g/L.

Na literatura científica não foi encontrado valor de  $K_M$  aparente menor que o da beta-(1→3)-glucanase da levedura 1WA1 para laminarina. O valor de  $K_M$  aparente mais próximo encontrado para esta enzima foi relatado por Marco e Feliz (2007), no qual a beta-(1→3)-glucanase produzida por *Trichoderma harzianum* 1051 apresentou 0,099 mg/mL.

#### 5.10 CURVAS DE MICHAELIS-MENTEN E LINEWEAVER-BURK DA BETA-GLICOSIDASE PARA pNPG (P-NITROFENIL-BETA-D-GLUCOPIRANOSÍDIO)

Com o objetivo de analisar o perfil cinético da beta-glicosidase, a enzima foi incubada em diferentes concentrações de pNPG (0,008 a 0,24 mg/mL). Na Figura 14 (A) foi possível observar o perfil Michaeliano da beta-glicosidase da levedura 1WA1, e em (B) o plote de Lineweaver-Burk, sendo os valores encontrados de  $K_M$  aparente igual a 0,04 mg/mL para p-NPG e da  $V_{MÁX}$  0,011 U/mL.



**Figura 14** – (A) Curvas de Michaelis-Menten e (B) Lineweaver-Burk ( $K_M$  aparente), da beta-glicosidase para pNPG

**Tabela 19** – Comparação de  $K_M$  aparente e  $V_{MÁX}$  da beta-glicosidase para *p*-NPG

Micro-organismo	$K_M$ aparente	$V_{MÁX}$	Referência
Levedura 1WA1	0,04 mg/mL	0,011 U / min / L	BARBAGALLO et al. (2004)
<i>Pichia anomala</i>	0,47 mM	6,94 U / mg	
<i>Hanseniaspora. uvarum</i>	0,61 mM	1,81 U / mg	
<i>Sacharomyces cerevisiae</i>	2,53 mM	1,75 U / mg	

### 5.11 EFEITO DA PRESENÇA DE DIFERENTES SAIS NA ATIVIDADE DA BETA-(1→3)-GLUCANASE E DA BETA-GLICOSIDASE

O efeito dos sais sobre as enzimas tem sido muito estudado, pois estes têm a capacidade de aumentar ou inibir a atividade enzimática (BOWERS, RAGLAND e BYERS, 2007; YI et al., 2008). Com o objetivo de avaliar o efeito de diferentes sais sobre as enzimas estudadas, o extrato enzimático produzido pela levedura 1WA1 foi avaliado na presença de diferentes sais de cloreto e de sulfato. A Tabela 20 mostra os resultados obtidos para a beta-(1→3)-glucanase e a Tabela 21 para a beta-glicosidase.

**Tabela 20** – Efeito da presença de diferentes sais de cloreto e de sulfato na atividade da beta-(1→3)-glucanase

Cátion	Atividade Relativa	
	Cloretos (%)	Sulfatos (%)
Controle	100,0	100,0
K <sup>+</sup> (1.mM)	95,4	103,4
K <sup>+</sup> (10.mM)	93,7	98,3
Na <sup>+</sup> (1.mM)	96,0	101,1
Na <sup>+</sup> (10.mM)	100,7	102,8
Mg <sup>++</sup> (1.mM)	92,4	98,9
Mg <sup>++</sup> (10.mM)	86,4	88,6
Ca <sup>++</sup> (1.mM)	93,7	n.d.
Ca <sup>++</sup> (10.mM)	88,1	n.d.
Mn <sup>++</sup> (1.mM)	0	17,6
Mn <sup>++</sup> (10.mM)	f.p.	f.p.
Cu <sup>++</sup> (1.mM)	90,7	84,7
Cu <sup>++</sup> (10.mM)	31,1	48,3
Fe <sup>+++</sup> (1.mM)	83,8	81,3
Fe <sup>+++</sup> (10.mM)	f.p.	f.p.
Zn <sup>++</sup> (1.mM)	86,4	83,0
Zn <sup>++</sup> (10.mM)	41,4	60,8

f.p. – formação de precipitado

n.d. – não desenvolvido

Nenhum dos sais avaliados proporcionou um aumento significativo da atividade da beta-(1→3)-glucanase, porém alguns atuaram como inibidores da enzima. Na concentração de 1mM a enzima foi fortemente inibida apenas na presença do cátion  $Mn^{++}$ .

Quando incubada em maior concentração dos sais (10 mM), a enzima foi inibida apenas na presença de  $Cu^{++}$  e  $Zn^{++}$ . Com excessão do  $ZnSO_4$ , que a beta-(1→3)-glucanase apresentou 60,8% de atividade, na presença dos cloretos e sulfato dos respectivos cátions, a enzima apresentou menos de 50%.

Uma beta-glucanase produzida por *Trichoderma viride* teve sua atividade inibida na presença de  $Fe^{+++}$ ,  $Mg^{++}$ ,  $Mn^{++}$  e  $Cu^{++}$ , no entanto, na presença de  $Fe^{++}$ ,  $Zn^{++}$  e  $Ca^{++}$ , a atividade foi estimulada (Yl et al., 2008)

**Tabela 21** – Efeito da presença de diferentes sais de cloreto e de sulfato na atividade da beta-glicosidase

Cátion	Atividade Relativa	
	Cloretos (%)	Sulfatos (%)
Controle	100,0	100,0
$K^+$ (1.mM)	102,1	65,6
$K^+$ (10.mM)	100,5	98,9
$Na^+$ (1.mM)	105,8	102,2
$Na^+$ (10.mM)	103,1	88,86
$Mg^{++}$ (1.mM)	108,1	71,71
$Mg^{++}$ (10.mM)	100,1	99,75
$Ca^{++}$ (1.mM)	104,6	---
$Ca^{++}$ (10.mM)	106,4	---
$Mn^{++}$ (1.mM)	<b>30,2</b>	64,43
$Mn^{++}$ (10.mM)	---	---
$Cu^{++}$ (1.mM)	89,4	65,27
$Cu^{++}$ (10.mM)	<b>7,8</b>	75,99
$Zn^{++}$ (1.mM)	96,2	65,27
$Zn^{++}$ (10.mM)	71,1	63,37

f.p. – formação de precipitado

n.d. – não desenvolvido

Os sais avaliados também não apresentaram efeito positivo significativo na atividade da beta-glicosidase. Porém a presença de alguns sais mostrou inibição da enzima.

Na presença de 1 mM de sais a beta-glicosidase teve mais de 50% de sua atividade inibida por  $MnCl_2$ . Porém com relação aos outros sais avaliados, somente o  $CuCl_2$  (10 mM) causou mais de 50% de inibição da atividade da enzima.

Bowers, Ragland e Byers (2007) relataram o efeito de inibição na atividade de uma beta-glicosidase comercial na presença de sais de  $Fe^{++}$ ,  $Zn^{++}$ ,  $Cu^{++}$ ,  $Ca^{++}$  e  $Mg^{++}$ .

## 5.12 OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE BETA-(1→3)-GLUCANASE E BETA-GLICOSIDASE PELA LEVEDURA 1WA1

Com o objetivo de otimizar a produção de beta-(1→3)-glucanase pela levedura 1WA1, 8 experimentos com três repetições do ponto central foram realizados em diferentes combinações de concentração de biomassa de *Botryosphaeria rhodina* (% m/v) e pH inicial, por meio do delineamento fatorial completo  $3^2$ . Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 22, onde  $x_i$  são as variáveis codificadas e  $X_1$  a concentração de biomassa em % (g/mL) e  $X_2$  o pH.

**Tabela 22** – Respostas obtidas do delineamento fatorial  $3^2$  para a produção da beta-(1→3)-glucanase e da beta-glicosidase pela levedura 1WA1

Experimento	Fatores				Beta-(1→3)-glucanase		Beta-glicosidase	
	$x_1$	$x_2$	$X_1$	$X_2$	(U/mL)	(U/mg)	(U/mL)	(U/mg)
1	-1	-1	0,5	2,5	0,85	3,88	0,29	1,32
2	-1	0	0,5	5,0	0,35	1,52	0,11	0,45
3	-1	1	0,5	7,5	0,26	0,72	0,06	0,17
4	0	-1	1,0	2,5	1,87	4,88	0,62	1,63
5	0	0	1,0	5,0	0,53	1,15	0,18	0,39
6	0	1	1,0	7,5	0,45	0,59	0,12	0,17
7	1	-1	1,5	2,5	3,37	5,96	1,00	1,77
8	1	0	1,5	5,0	1,31	1,77	0,23	0,31
9	1	1	1,5	7,5	0,51	0,60	0,13	0,16
10	0	0	1,0	5,0	0,60	1,25	0,16	0,32
11	0	0	1,0	5,0	0,49	1,05	0,19	0,40
12	0	0	1,0	5,0	0,53	1,13	0,18	0,38

Avaliando separadamente as respostas, por meio da aplicação de análise de regressão sobre os dados experimentais, a equação polinomial, com os termos significativos em nível de 1 % ( $p \leq 0,01$ ) e ajustado 98,33%, foi encontrada para explicar os dados obtidos para a atividade da beta-(1→3)-glucanase, e esta representada pela Equação 5.

$$\gamma = 1,219 + 0,368x_1 - 2,135x_2 + 0,278x_1^2 + 1,368x_2^2 - 0,550x_1x_2 \quad \text{Eq. 5}$$

De acordo com a Tabela 23 a variável mais importante para a produção da beta-(1→3)-glucanase pela levedura 1WA1 é o termo linear do pH inicial, sendo que o termo quadrático da concentração de biomassa não foi significativo.

**Tabela 23**– Análises dos efeitos e interações para a produção de beta-(1→3)-glucanase pela levedura 1WA1

Fatores	Coefficientes	Erro Padrão	Graus de Liberdade	Valor-p
Intercepto	1,2192	0,1071	11,3851	0,000028
X <sub>1</sub> linear	0,3683	0,0958	3,8457	0,008503
X <sub>1</sub> quadrático	0,2775	0,1437	1,9315	0,101628
X <sub>2</sub> linear	-2,1350	0,0958	-22,2909	0,000001
X <sub>2</sub> quadrático	1,3675	0,1437	9,5184	0,000077
X <sub>1</sub> .X <sub>2</sub>	-0,5500	0,1173	-4,6886	0,003366

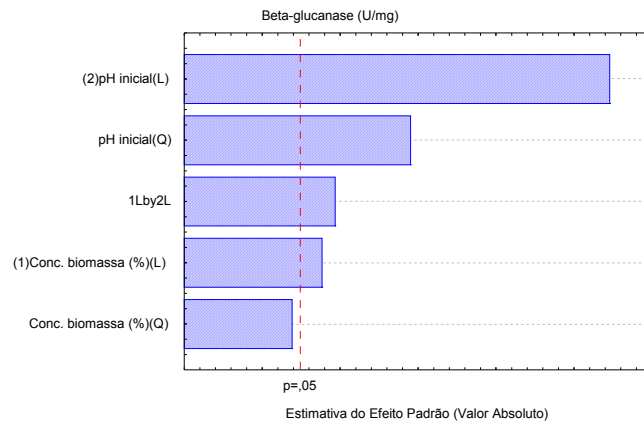
A análise de variância (ANOVA) para os termos lineares, quadráticos e de interação para a beta-(1→3)-glucanase, está apresentada na Tabela 24.

**Tabela 24** – Análise de variância (ANOVA) para a produção de beta-(1→3)-glucanase pela levedura 1WA1

Fatores	SQ	GL	Quadrado médio	Teste de significância F	P
Termo linear x <sub>1</sub>	0,8140	1	0,8140	14,7891	0,008503
Termo quadrático x <sub>1</sub>	0,2054	1	0,2054	3,7308	0,101628
Termo linear x <sub>2</sub>	27,3494	1	27,3494	496,8845	0,000001
Termo quadrático x <sub>2</sub>	4,9868	1	4,9868	90,6008	0,000077
Interação	1,2100	1	1,2100	21,9833	0,003366
Erro	0,3303	6	0,0550		
Soma dos quadrados	36,3038	11			

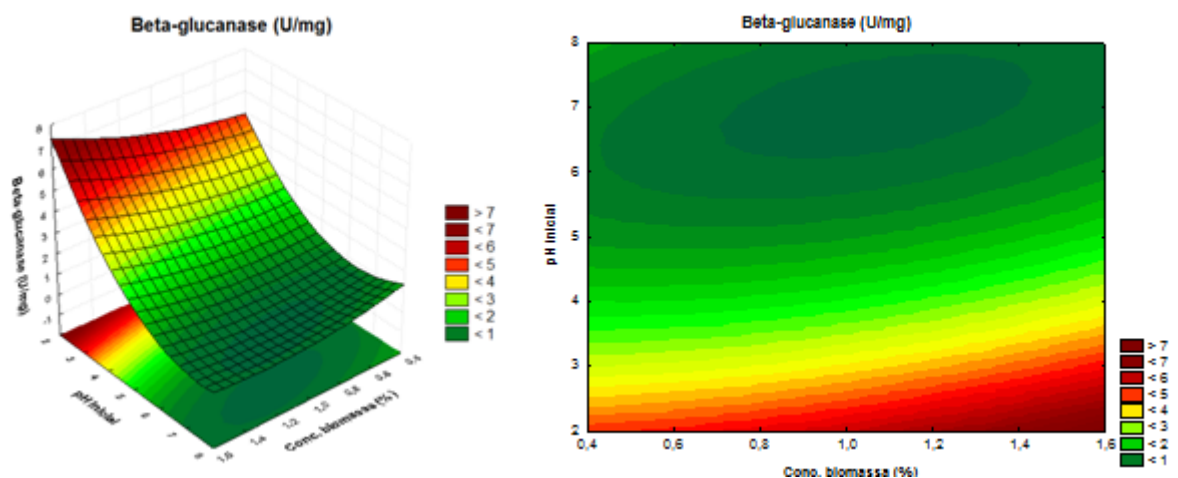
SQ: Soma dos Quadrados; GL: Grau de Liberdade; QM: Quadrado Médio; P: Probabilidade

O gráfico de Pareto, representado na Figura 15, confirma os resultados demonstrados na Tabela 23, ou seja, demonstra que com excessão do termo quadrático da concentração de biomassa, todos os efeitos avaliados foram significativos em 5 %.



**Figura 15** – Gráfico de Pareto determinado pelo planejamento fatorial para produção de beta-(1→3)-glucanase pela levedura 1WA1

Os diferentes efeitos das variáveis avaliadas na produção da beta-(1→3)-glucanase pela levedura 1WA1 podem ser observados nos diagramas de superfície de resposta (Figura 16).



**Figura 16** – Superfície de Resposta e curvas de níveis com os resultados do delineamento fatorial  $3^2$  para a produção de beta-(1→3)-glucanase

Através dos resultados obtidos foi possível observar uma maior produção da beta-(1→3)-glucanase com o aumento da concentração de biomassa de *B. rhodina* e diminuição do pH inicial. A melhor produção de beta-(1→3)-glucanase (5,96 U/mg) foi obtida quando a levedura 1WA1 foi cultivada em 1,5 % de biomassa micelial de *B. rhodina* e em pH inicial 2,5 (Valor preditivo 5,92 U/mg).

Para a produção de beta-glicosidase pela levedura 1WA1 foi obtida a equação de regressão, apenas com os termos significativos em nível de 5 % ( $p \leq 0,05$ ), representada pela Equação 6. O alto coeficiente de correlação obtido ( $R = 0,9755$ ) indica que esta equação pode ser utilizada para fins preditivos.

$$\gamma = 0,381 + 0,050x_1 - 0,703x_2 - 0,019x_1^2 + 0,501x_2^2 - 0,115x_1x_2 \quad \text{Eq. 6}$$

A Tabela 25 mostra que a variável mais importante para a produção da beta-glicosidase pela levedura 1WA1 é o termo linear do pH inicial, sendo que o termo linear e quadrático da concentração de biomassa não foi significativo.

**Tabela 25** – Análises dos efeitos e interações para a produção de beta-glicosidase pela levedura 1WA1

Fator	Coefficientes	Erro Padrão	Graus de Liberdade	Valor-p
Intercepto	0,3813	0,0421	9,0558	0,000102
x <sub>1</sub> linear	0,0500	0,0377	1,3278	0,232515
x <sub>1</sub> quadrático	-0,0188	0,0565	-0,3320	0,751212
x <sub>2</sub> linear	-0,7033	0,0377	-18,6781	0,000002
x <sub>2</sub> quadrático	0,5013	0,0565	8,8743	0,000114
x <sub>1</sub> .x <sub>2</sub>	-0,1150	0,0461	-2,4936	0,046934

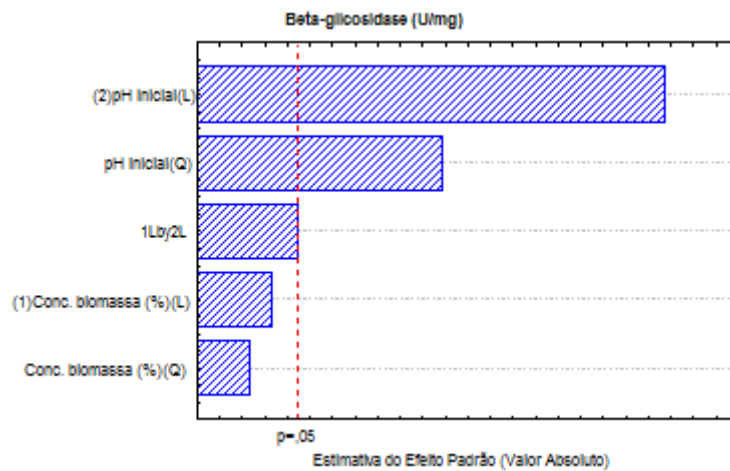
A análise de variância (ANOVA) para os termos lineares, quadráticos e de interação para a beta-glicosidase, está apresentada na Tabela 26.

**Tabela 26** – Análise de variância (ANOVA) para a produção de beta-glicosidase pela levedura 1WA1

Fatores	SS	GL	Quadrado médio	Teste de significância F	P
Termo linear x <sub>1</sub>	0,0150	1	0,0150	1,7631	0,232515
Termo quadrático x <sub>1</sub>	0,0009	1	0,0009	0,1102	0,751212
Termo linear x <sub>2</sub>	2,9681	1	2,9681	348,8708	0,000002
Termo quadrático x <sub>2</sub>	0,6700	1	0,6700	78,7532	0,000114
Interação	0,0529	1	0,0529	6,2179	0,046934
Erro	0,0529	6	0,0085		
Soma dos quadrados	3,8230	11			

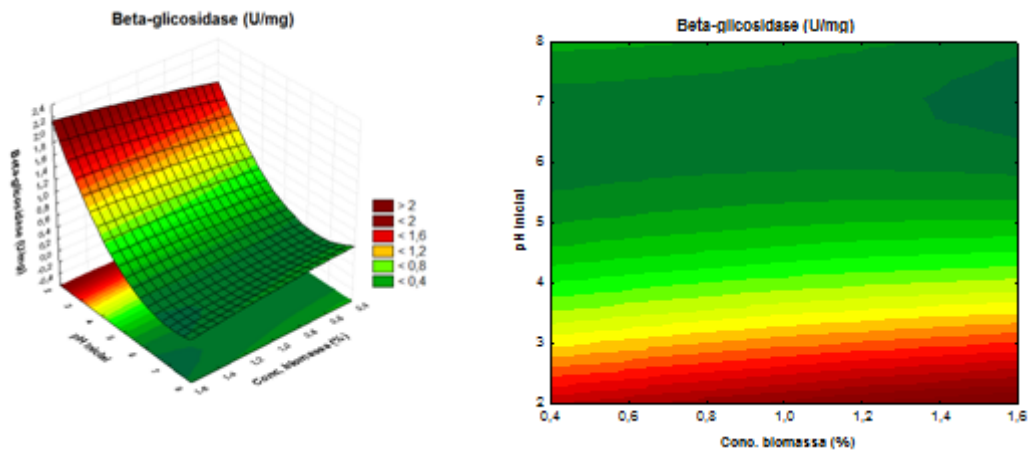
SQ: Soma dos Quadrados; GL: Grau de Liberdade; QM: Quadrado Médio; P: Probabilidade

A Figura 17 apresenta o gráfico de Pareto, onde demonstra os resultados já observados na Tabela 25, que apenas o efeito do pH inicial foi significativo em 5 %.



**Figura 17** – Gráfico de Pareto determinado pelo planejamento fatorial para produção de beta-glicosidase pela levedura 1WA1

As superfícies de resposta apresentadas na Figura 18 representam os efeitos das variáveis na produção da beta-glicosidase pela levedura 1WA1



**Figura 18** – Superfície de Resposta e curvas de níveis com os resultados do delineamento fatorial  $3^2$  para a produção de beta-glicosidase

O resultado obtido mostrou uma maior produção de beta-glicosidase com a diminuição do pH inicial. A atividade específica ótima (1,77 U/mg) foi observada em 1,5 % de biomassa micelial de *B. rhodina* e em pH inicial 2,5 (Valor preditivo 1,73 U/mg).

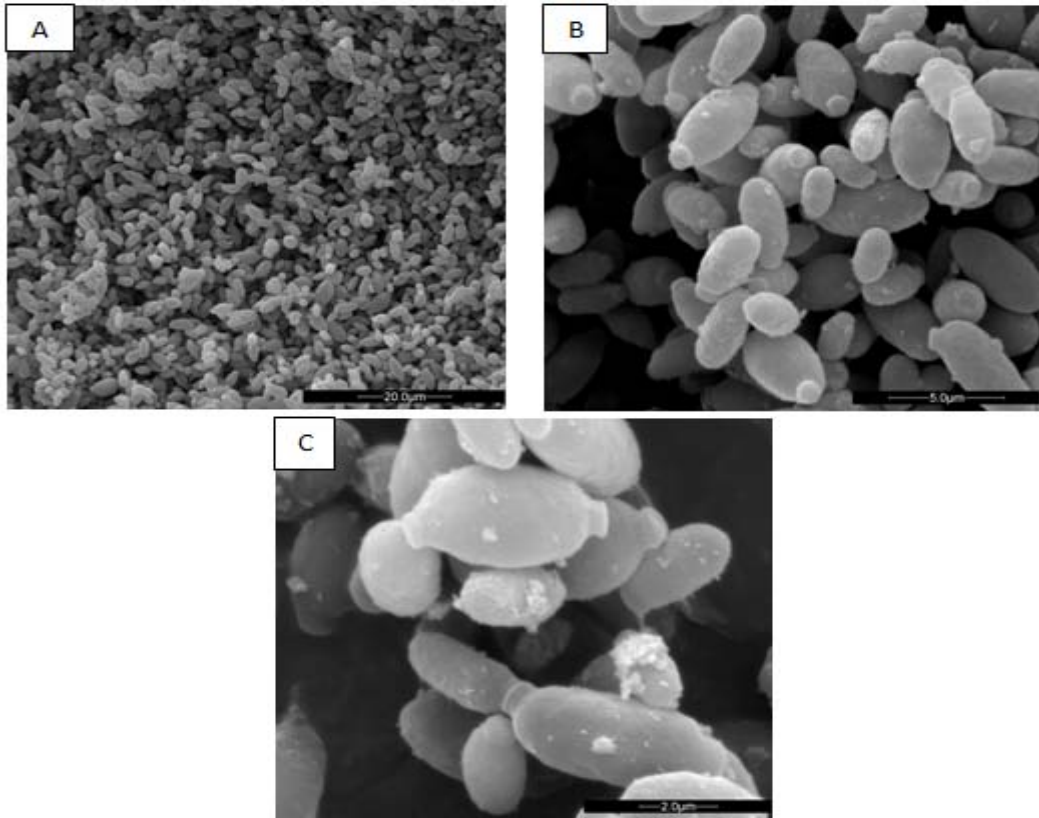
Não foram encontrados relatos, na literatura científica, estudos avaliando diferentes concentrações de biomassa fúngica e pH inicial do meio de cultivo para a produção de beta-(1→3)-glucanase por leveduras.

### 5.13 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

Considerando-se que até o presente momento a levedura não foi identificada, com o objetivo de observar estruturalmente a levedura 1WA1, as hifas do *Botryosphaeria rhodina*, a integração das leveduras e biomassa micelial e a ação das enzimas na parede celular do fungo, foram realizadas micrografias eletrônicas de varredura (MEV).

As células da levedura 1WA1 foram obtidas através de centrifugação de cultivos submersos realizados em sais de Vogel com 1 % (m/v) de glucose.

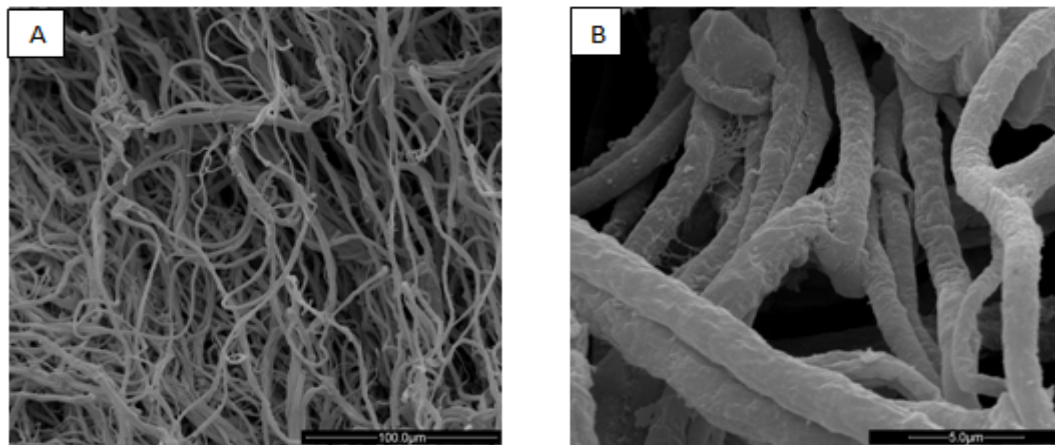
A Figura 19 apresenta MEV da levedura 1WA1 cultivada em glucose 1 % (m/v) em diferentes aumentos.



**Figura 19** – MEV da levedura 1WA1 cultivada em 1 % (m/v) de glicose em diferentes aumentos (A) 2400x; (B) 12000x; (C) 20000x

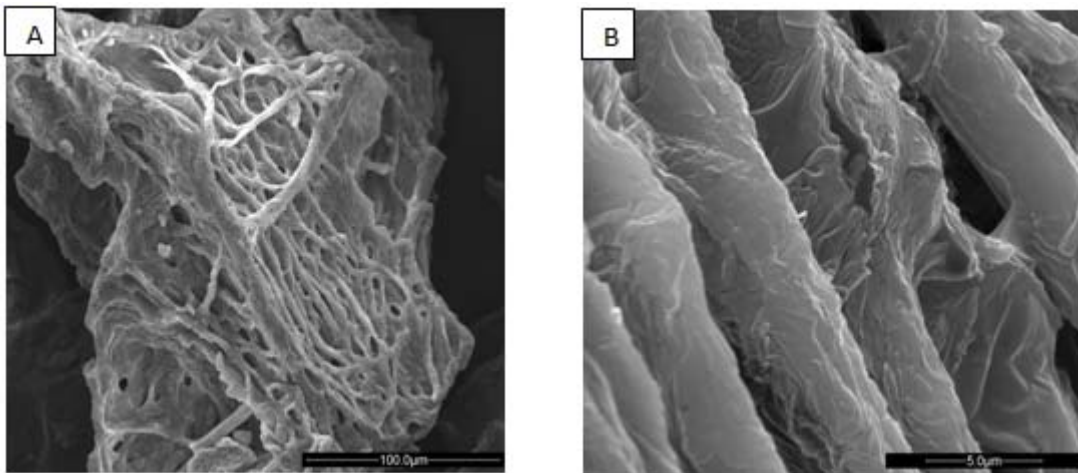
As hifas utilizadas para realização das MEV do fungo filamentosos *Botryosphaeria rhodina*, foram retiradas de colônia crescida em placa de BDA.

A Figura 20 mostra hifas a fresco do fungo *Botryosphaeria rhodina*.



**Figura 20** – MEV do fungo filamentosos *B. rhodina* “In vivo” (A) 1000x; (B) 12000x

Com o objetivo de avaliar se houve alguma modificação na estrutura das hifas durante o processo de preparo da biomassa micelial, foram realizadas MEV das hifas desidratadas (liofilizada). Na Figura 21 foi possível observar que o processo de liofilização da biomassa não causou qualquer degeneração na parede celular do fungo. As hifas desta etapa foram produzidas nas condições otimizadas de produção do botriosferana, ou seja, as hifas estão cobertas pela beta-glucana.

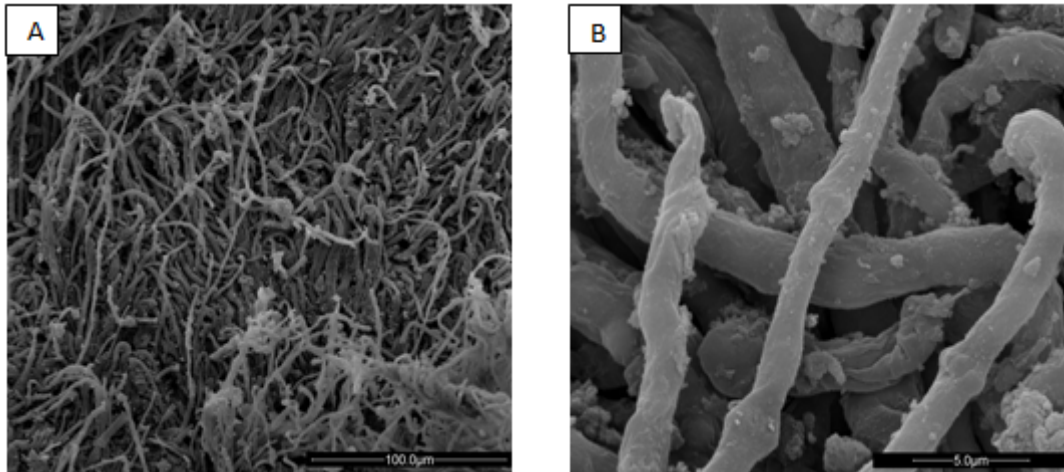


**Figura 21** – MEV das hifas de *B. rhodina* desidratadas (liofilizadas) (A) 1000x; (B) 12000x

Antes de entrar em contato com a levedura, a biomassa do *Botryosphaeria rhodina* passa pelo processo de autoclavação, ou seja, após ser desidratada e triturada, a biomassa foi adicionada no meio de cultivo líquido e este foi esterilizado (autoclavado).

Com o objetivo de verificar se o processo de autoclavação promoveu alguma alteração estrutural nas hifas do *B. rhodina*, foram realizadas MEV do controle dos cultivos, ou seja, sem levedura.

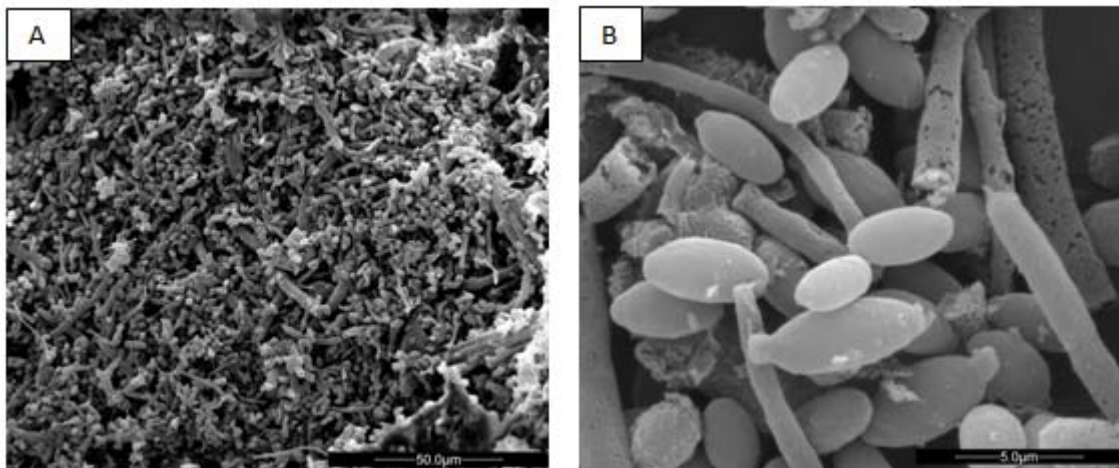
Apesar do processo de autoclavação ocorrer em alta temperatura e pressão, a mesma não causou nenhum dano às hifas do fungo filamentoso (Figura 22). Assim, se confirma que as hifas do *B. rhodina*, utilizadas como substrato para a levedura 1WA1, apresentavam-se intactas quando adicionadas ao meio de cultivo como substrato para as leveduras.



**Figura 22** – MEV hifas do *Botryosphaeria rhodina* após autoclavação (A) 1000x; (B) 12000

Com a finalidade de se comprovar a atuação das enzimas glucanólíticas da levedura 1WA1 sobre as hifas do *B. rhodina*, foram realizadas MEV dos cultivos, após o crescimento da levedura na presença da biomassa fúngica.

Após ter sido demonstrado que as hifas do *B. rhodina* permanecem intactas até entrar em contato com a levedura, a Figura 23 demonstra sinais de degradação da parede celular fúngica pela levedura 1WA1.



**Figura 23** – MEV do cultivo da levedura 1WA1 em biomassa do *B. rhodina*, após 96 horas (A) 1200x; (B) 12000x

Estas MEV apresentam a degradação das hifas do *B. rhodina* pela levedura, devido ao uso de componentes presentes na parede celular do fungo para o crescimento e produção de enzimas.

## CONCLUSÕES

- Foram isolados 108 micro-organismos, dentre eles 95 leveduras e 13 fungos filamentosos;
- Foi desenvolvido um método de zimograma (meio sólido) utilizando-se botriosferana como única fonte de carbono e meio mínimo de Vogel, o qual foi eficiente para selecionar micro-organismos produtores de beta-(1→3)-glucanase;
- A levedura que produziu os maiores títulos de beta-(1→3)-glucanase e beta-glicosidase foi o isolado da uva moscato bailey 1WA1;
- A biomassa micelial de *Botryosphaeria rhodina* foi o substrato que proporcionou maiores títulos de beta-(1→3)-glucanase e beta-glicosidase pelo isolado 1WA1. A adição de Tween 80 não aumentou a produção destas enzimas;
- O pH ótimo da beta-(1→3)-glucanase extracelular do isolado de levedura 1WA1 foi 4,5, e da beta-glicosidase foi 4,0. A temperatura ótima foi 60 °C e esta hidrolase foi estável por mais de 24 h nas temperaturas entre 30 e 40 °C. A temperatura ótima para a beta-glicosidase foi 75°C;
- O  $K_M$  aparente da beta-(1→3)-glucanase foi 0,09 mg/mL para laminarina e a  $V_{máx}$  da reação foi 1,07 U/mL, enquanto que para a beta-glicosidase em *p*-NPG, o valor do  $K_M$  aparente foi 0,04 mg/mL e a  $V_{MÁX}$  0,011 U/mL;
- A condição otimizada para a produção das enzimas beta-glucanase e beta-glicosidase extracelulares pelo isolado de levedura 1WA1, utilizando-se o modelo matemático, foi 1,5 g% de biomassa micelial, pH inicial 2,5 durante 96 h, com inóculo padrão de  $1 \times 10^7$  células/mL para cada 10 mL de meio de cultivo, mantido a 180 rpm e 28 °C;
- A produção de beta-(1→3)-glucanase prevista pelo modelo matemático foi 5,92 U/mg, enquanto que a produção obtida na validação experimental foi 5,96 U/mg. Para a beta-glicosidase o valor preditivo foi 1,73 U/mg, enquanto que o experimental 1,77 U/mg nas mesmas condições ótimas de cultivo descritas pelo modelo matemático para ambas as enzimas;
- A microscopia eletrônica de varredura mostrou que o isolado de levedura 1WA1 promoveu degradação parcial na parede celular do micélio do *B. rhodina* MAMB-05.

## REFERÊNCIAS

- ADAMS, D. J. Fungal cell wall chitinases and glucanases. *Microbiology*, v. 150, p. 2029–2035, 2004.
- AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U. de A. *Biotechnologia Industrial – Biotechnologia na produção de alimentos*. 1ª ed. São Paulo: Edgard Blücher, p. 23, 2001.
- BAR-SHIMON, M.; YEHUDA, H.; COHEN, L.; WEISS, B.; KOBESHNIKOV, A.; DAUS, A.; GOLDWAY, M.; WISNIEWSKI, M.; DROBY, S. Characterization of extracellular lytic enzymes produced by the yeast biocontrol agent *Candida oleophila*. *Current Genetics*, v. 45, p. 140–148, 2004.
- BARBAGALLO, R. N.; SPAGNA, G.; PALMERI, R.; RESTUCCIA, C.; GIUDICI, P. Selection, characterization and comparison of  $\beta$ -glucosidase from mould and yeasts employable for enological applications. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 35, p. 58–66, 2004.
- BARBARA, J.; McDOUGALL, M.; SEVIOUR, R. J. The effect of dissolved oxygen concentrations on (1 $\rightarrow$ 3) and (1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -glucanase production by *Acremonium* sp. IMI 383068 in batch culture. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 36, p. 176–181, 2005.
- BARBOSA, A. M.; DEKKER, R. F. H.; HARDY, G.E. Veratryl alcohol as a inducer of laccase by na ascomycete, *Botryosphaeria* sp., when screened on the polymeric dye Poly R-478. *Letters in Applied Microbiology*, v.23, p.93-96, 1996.
- BARBOSA, A. M.; CUNHA, P. D. T.; PIGATTO, M. M.; CORRADI da SILVA, M. L. Produção e Aplicações de Exopolissacarídeos Fúngicos. *Semina*, v. 25, p. 29-42, 2004.
- BARBOSA, A. M. Seleção de microrganismos xilanolíticos e produção de xilanase pelo *Trichoderma harzianum* Rifai em bagaço de cana. Tese de Doutorado apresentada à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Bioquímica da UFPR, 1992.
- BARBOSA, A. M.; STELUTI, R. M.; DEKKER, R. F. H.; CARDOSO, M. S.; SILVA, M. L. C. da. Structural characterization of botryosphaeran: a (1,3; 1,6)-beta-D-glucan produced by ascomyceteous fungus, *Botryosphaeria* sp. *Carbohydrate Research*, v. 338, p.1691–1998, 2003.
- BELANCIC, A.; GUNATA, Z.; VALLIER, M.-J.; AGOSIN, E.  $\beta$ -Glucosidase from the Grape Native Yeast *Debaryomyces vanriijiae*: Purification, Characterization, and Its Effect on Monoterpene Content of a Muscat Grape Juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 51, p. 1453-1459, 2003.
- BLASCO, L.; VEIGA-CRESPO, P.; POZA, M.; VILLA, T. G. Hydrolases as markers of wine aging. *World Journal Microbiology and Biotechnology*, v. 22, p.1229–1233, 2006.

BORSATO, D. Análise de sistemas alimentares através de delineamentos fatoriais: Otimização. Londrina, 1983. Dissertação (Mestrado) – Mestrado em Ciências de Alimentos – Universidade Estadual de Londrina. 1983.

BOWERS, E. M.; RAGLAND, L. O.; BYERS, L. D. Salt effects on  $\beta$ -glucosidase: pH-profile narrowing. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1774, p. 1500–1507, 2007.

BRENDA. The Comprehensive Enzyme Information System. Disponível em: <<http://www.brenda-enzymes.org/>>. Acessado em 03 de junho de 2008.

BROCK, T. D.  $\beta$ -Glucanase of yeast. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 19, n. 5, p. 623-629, 1965.

CAETANO, C. B.; CALIARI, V.; GONZAGA, L. V. KUSKOSKI, E. M.; FETT, R. Atividade antioxidante e conteúdo fenólico de resíduo agroindustrial da produção de vinho. *Semina*, v. 29, p.93, 2008.

CALAZANS, G. M. T.; LIMA, R. C.; FRANÇA, F. P.; LOPES, C. E. Molecular weight and antitumour activity of *Zymomonas mobilis* Levans. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 27, p. 245–247, 2000.

CARRAU, F. M.; MEDINA, K.; BOIDO, E.; FARINA, L.; GAGGERO, C.; DELLACASSA, E.; VERSINI, G.; HENSCHKE, P. A. De novo synthesis of monoterpenes by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts. *FEMS Microbiology Letters*, v. 243, p. 107–115, 2005.

CHAIDEDGUMJORN, A. C.; TOYODA, H.; WOO, E. R.; LEE, K. B.; KIM, Y. S.; TOIDA, T.; IMANARI, T. Effect of (1\_3)- and (1\_4)-linkages of fully sulfated polysaccharides on their anticoagulant activity. *Carbohydrate Research*, v. 337, p. 925–933, 2002.

CORRADI da SILVA, M. L.; FUKUDA, E. K.; VASCONCELOS, A. F. D.; DEKKER, R. F. H.; MATIAS, A. C.; MONTEIRO, N. K.; CARDOSO, M. S.; BARBOSA, A. M.; SILVEIRA, J. L. M.; SASSAKI, G. L.; CARBONERO, E. R. Structural characterization of the cell wall D-glucans isolated from the mycelium of *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05. *Carbohydrate Research*, v. 343, p. 793–798, 2008.

CORSARO, M. M.; CASTRO, C.; EVIDENTE, A.; LANZETTA, R.; MOLINARO, A.; MUGNAI, L.; PARRILLI, M.; SURICO, G. Chemical structure of two phytotoxic exopolysaccharides produced by *Phomopsis phoeniculi*. *Carbohydrate Research*, v. 308, p. 349–357, 1998.

CRUZ, J. de la; REY, M.; LORA, J. M.; HIDALGO-GALLEGO, A.; DOMÍNGUEZ, F.; PINTOR-TORO, J. A.; LLOBELL, A.; BENÍTEZ, T. Carbon source control on  $\beta$ -glucanases, chitobiase and chitinase from *Trichoderma harzianum*. *Archives of Microbiology*, v. 159, p. 316-322, 1993.

DAENEN, L.; SAISON, D.; STERCKX, F.; DELVAUX, F. R.; VERACHTERT, H.; DERDELINCKX, G. Screening and evaluation of the glucoside hydrolase activity in *Saccharomyces* and *Brettanomyces* brewing yeasts. *Journal of Applied Microbiology*, v. 104, p. 478-488, 2008.

DAUDT, C. E.; BRUM, M. A.; OUGH, C. S. Controle das altas temperaturas de fermentação na fabricação de vinhos brancos. *Revista do Centro de Ciências Rurais*, v. 5, p. 71-78, 1975.

DEKKER, R. F. H.; BARBOSA, A. M. The effects of aeration and veratryl alcohol on the production of two laccases by the ascomycete *Botryosphaeria sp.* *Enzyme and Microbial Technology*, v. 28, p. 81–88, 2001.

DEKKER, R. F. H.; BARBOSA, A. M.; GIESE, E. C.; GODOY, S. D.S.; COVIZZI, L. G. Influence of nutrients on enhancing laccase production by *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05. *International Microbiology*, v. 10, p.177-185, 2007.

DEQUIN, S. The potential of genetic engineering for improving brewing, wine-making and baking yeasts. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 56, n. 5-6, p. 577-588, 2001.

DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBER, P.A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, v. 6, p. 28-350, 1956.

DUBOURDIEU, D.; DESPLANQUES, C.; VILLETAZ, J-C.; RIBÉREAU-GAYON, P. Investigations of an industrial B-D-Glucanase from *Trichoderma harzianum*. *Carbohydrate Research*, v. 144, p. 277-287, 1985.

DUNN, P. Vinícola do ano usa enzimas da Novozymes. *Biotimes*, nº 1, p. 12, 2007.

FLEURI, L. F.; SATO, H. H.  $\beta$ -1,3 Glucanases e quitinases: aplicação na lise de leveduras e inibição de fungos. *Ciência Agrotecnologia*, v. 32, n. 4, p. 1224-1231, 2008.

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

FUKUDA, E. K.; VASCONCELOS, A. F. D.; MATIAS, A. C.; BARBOSA, A. M.; DEKKER, R. F. H.; CORRADI da SILVA, M. L. Polissacarídeos de parede celular fúngica: purificação e caracterização. *Semina*, v. 30 (1), p. 117-134, 2009.

GEORGIANNA, D. R.; FEDOROVA, N. D.; BURROUGHS, J. L.; DOLEZAL, A. L.; BOK, J. W.; HOROWITZ-BROWN, S.; WOLOSHUK, C. P.; YU, J.; KELLER, N. P.; PAYNE, G. A. Beyond aflatoxin: four distinct expression patterns and functional roles associated with *Aspergillus flavus* secondary metabolism gene clusters. *Molecular Plant Pathology*, v. 11, p. 213–226, 2010.

GEORGIANNA, D. R.; PAYNE, G. A. Genetic regulation of aflatoxin biosynthesis: From gene to genome. *Fungal Genetics and Biology*, v. 46, p. 113–125, 2009.

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

GIESE, E.C., COVIZZI, L.G., DEKKER, R.F.H., MONTEIRO N.K., CORRADI DA SILVA, M.L., BARBOSA, A.M. Enzymatic hydrolysis of botryospheran and laminarin  $\beta$ -1,3-glucanases produced by *Botryosphaeria rhodina* and *Trichoderma harzianum* Rifai. *Process Biochemistry*, v. 41, p.1234-1466, 2006.

GIL, J. V.; MANZANARES, P.; GENOVÉS, S.; VALLÉS, S.; GONZÁLEZ-CANDELA, L. Over-production of the major exoglucanase of *Saccharomyces cerevisiae* leads to an increase in the aroma of wine. *International Journal of Food Microbiology*, v. 103, p. 57– 68, 2005.

GONZÁLEZ, C. F.; FARIÑA, J. I.; FIGUEROA, L. I. C. Optimized amylolytic enzymes production in *Saccharomycopsis fibuligera* DSM-70554 An approach to efficient cassava starch utilization. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 42, p. 272–277, 2008.

GUAN, J.; LI, S. P. Discrimination of polysaccharides from traditional Chinese medicines using saccharide mapping—Enzymatic digestion followed by chromatographic analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 51, p. 590–598, 2010.

GUIMARÃES, T. M. Isolamento, identificação e seleção de cepas de levedura *Saccharomyces cerevisiae* para elaboração de vinho. Curitiba, 2005. Dissertação (Mestrado) – Departamento de Ciências Farmacêuticas – Universidade Federal do Paraná. 2005.

GÜNATA, Y.; BITTEUR, S.; BRILLOUT, J-M.; BAYONOVE, C. L. ; CORDONNIER, R. E. Sequential enzymatic hydrolysis of potential aromatic from grape. *Carbohydrate Research*, v. 184, p. 139-149, 1988.

HARTREE, E.F. Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Analytical Biochemistry*, v. 48(2), p. 422-427, 1972.

HUMBERT-GOFFARD, A.; SAUCIER, C.; MOINE-LEDOUX, V.; CANALLAUBÈRES, R. M.; DUBOURDIEU, D.; GLORIES, Y. An assay for glucanase activity in wine. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 34, p.537–543, 2004.

IORIO, E.; TOROSANTUCCI, A.; BROMURO, C.; CHIARI, P.; FERRETTI, A.; GIANNINI, M.; CASSONEB, A.; PODO, F. *Candida albicans* cell wall comprises a branched b-D-(1,6)-glucan with b-D-(1,3)-side chains. *Carbohydrate Research*, v. 343, p. 1050–1061, 2008.

I.U.B (1992) *Enzyme Nomenclature; Recommendations of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry*. Academic Press, Orlando.

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

KETTUNEN, A.; HÄMÄLÄINEN, J. J.; STENHOLMH, K.; PIETILA, K. A Model for the Prediction of  $\beta$ -Glucanase Activity and  $\beta$ -Glucan Concentration during Mashing. *Journal of Food Engineering*, v. 29, p.185-200, 1996.

KOBAYASHI, T.; ABE, K.; ASAI, K.; GOMI, K.; JUVVADI, P. R.; KATO, M.; KITAMOTO, K.; TAKEUCHI, M.; MACHIDA, M. Genomics of *Aspergillus oryzae*. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, v. 71, p. 646-670, 2007.

KULMINSKAYA, A. A.; THOMSEN, K. K.; SHABALIN, K. A.; SIDORENKO, I. A.; ENEYSKAYA, E. V.; SAVEL'EV, A. N.; NEUSTROEV, K. N. Isolation, enzymatic properties, and mode of action of na exo-1,3-b-glucanase from *Trichoderma viride*. *European Journal of Biochemistry*, v. 268, p. 6123–6131, 2001.

LOPES, C. A. et al. *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast populations in a cold region in Argentinean Patagonia: a study at different fermentation scales. *Journal of Applied Microbiology*, v. 93, p. 608-615, 2002.

MAGNELLI, P. E.; CIPOLLO, J. F.; ROBBINS, P W. A glucanase-driven fractionation allows redefinition of *Schizosaccharomyces pombe* cell wall composition and structure: assignment of diglucan. *Analytical Biochemistry*, v. 336, p. 202–212, 2005.

MANNERS, D. J.; STARK, J. R.; WILSON, G.; BRODIE, J. Y. Some properties of a fungal B-D-Glucanase preparation. *Carbohydrate Research*, v. 49, p. 383-388, 1976.

MARCO, J. L.; FELIZ, C. R. Purification and Characterization of a b-Glucanase Produced by *Trichoderma harzianum* Showing Biocontrol Potential. *Brazilian archives of biology and technology*, v. 50, p. 21-29, 2007.

MARTÍN-CUADRADO, A. B.; DEDO, J. E. del; MEDINA-REDONDO, M. de; FONTAINE, T.; REY, F. del; LATGÉ, J. P.; ALDANA, C. R. V. de. The *Schizosaccharomyces pombe* endo-1,3-b-glucanase Eng1 contains a novel carbohydrate binding module required for septum localization. *Molecular Microbiology*, v. 69, n. 1, p. 188–200, 2008.

MARTIN, K. L.; MCDOUGALL, B. M.; UNKLES, S. E.; SEVIOUR, R. J. The three b-1,3-glucanases from *Acremonium blochii* strain C59 appear to be encoded by separate genes. *Mycological Research*, v. 110, p. 66 – 74, 2006.

MASIH, E. I.; PAUL, B. Secretion of  $\beta$ -1,3-Glucanases by the Yeast *Pichia membranifaciens* and Its Possible Role in the Biocontrol of *Botrytis cinerea* Causing Grey Mold Disease of the Grapevine. *Current Microbiology*, v. 44, p. 391–395, 2002.

MASINO, F.; MONTEVECCHI, G.; ARFELLI, G.; ANTONELLI, A. Evaluation of the Combined Effects of Enzymatic Treatment and Aging on Lees on the Aroma of Wine from *Bombino bianco* Grapes. *Journal Agricultura and Food Chemistry*, v. 56, p. 9495–9501, 2008.

McLEOD, A.; SMART, C. D.; FRY, W. E. Characterization of 1,3-b-glucanase and 1,3;1,4-b-glucanase genes from *Phytophthora infestans*. *Fungal Genetics and Biology*, v. 38, p. 250–263, 2003.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determining reducing sugars. *Analytical Chemistry*, v. 31, p. 426-429, 1959.

MIYANISHI, n.; MATSUBARA, Y.; HAMADA, N.; KOBAYASHI, T.; IMADA, C.; WATANABE, A. The Action Modes of an Extracellular p- 1,3-Glucanase Isolated from *Bacillus clausii* NM- 1 on p- 1,3-Glucooligosaccharides. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 96, p. 32-37, 2003.

MOLERO, G.; CID, V. J.; VIVAR, C.; NOMBELA, C.; SAÈNCHEZ-PEÈREZ, M. *Candida albicans* exoglucanase as a reporter gene in *Schizosaccharomyces pombe*. *FEMS Microbiology Letters*, v. 175, p. 143-148, 1999.

MURRAY, P.; ARO, N.; COLLINS, C.; GRASSICK, A.; PENTTILÄ, M.; SALOHEIMO, M.; TUOHY, M. Expression in *Trichoderma reesei* and characterization of a thermostable family 3  $\beta$ -glucosidase from the moderately thermophilic fungus *Talaromyces emersonii*. *Protein Expression and Purification*, v. 38, p. 248–257, 2004.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of chromatography*, v. 1054, p. 95-111, 1994.

NELSON, D. L.; COX, M. M. *Lehninger Princípios de Bioquímica*. 3 ed. São Paulo: Sarvier, p.282-285, 2002.

NELSON, N. A. Colorimetric adaptation of the Somogyi method for determination of glucose. *Journal of Biological Chemistry*, v. 153, p.376-380, 1944.

NOVOZYMES. Disponível em:

<[http://www.novozymes.com.br/produtosesolucoes\\_enzimas\\_como.htm](http://www.novozymes.com.br/produtosesolucoes_enzimas_como.htm)>. Acessado em 13 de outubro de 2008.

OH, K.-B.; HAMADA, K.; SAITO, M.; LEE, H.-J.; MATSUOKA, H. Isolation and properties of an extracellular  $\beta$ -glucosidase from a filamentous fungus, *Cladosporium resinae*, isolated from kerosene. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, v. 63, p. 281-287, 1999.

PENG, Y.; CHI, Z.-M.; WANG, X.-H.; LI, J. Purification and molecular characterization of exo- $\beta$ -1,3-glucanases from the marine yeast *Williopsis saturnus* WC91-2. *Appl. Microbiology and Biotechnology*, v. 85, p. 85–94, 2009.

PITSON, S. M.; SEVIOUR, R. J.; MCDOUGALL, B. M. Noncellulolytic fungal  $\beta$ -glucanases: their physiology and regulation. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 15, p.178–190, 1993.

PITSON, S. M.; SEVIOUR, R. J.; MCDOUGALL, B. M. Purification and characterization of an extracellular  $\beta$ -glucosidase from the filamentous fungus *Acremonium persicinum* and its probable role in  $\beta$ -glucan degradation. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 21, p. 182-190, 1997.

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

RODRÍGUEZ, M. E.; LOPES, C.; VALLES, S.; GIRAUDO, M. R.; CABALLERO, A. Selection and preliminary characterization of  $\beta$ -glycosidases producer Patagonian wild yeasts. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 41, p. 812–820, 2007.

RUIZ-HERRERA, J. Biosynthesis of  $\beta$ -glucans in fungi. *Antonie van Leeuwenhoek*, v. 60, p. 73-81, 1991.

SEVIOUR, R.; STASINOPOULOS, S.; AUER, D; GIBBS, P. Production of pullulan and other exopolysaccharides by filamentous fungi. *Critical Reviews in Biotechnology*, v. 12, p. 279-298, 1992.

SIGMA-ALDRICH. Laminarin from *Laminaria digitata*. Disponível em: [http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?lang=en&N4=L9634|SIGMA&N5=SEARCH\\_CONCAT\\_PNO|BRAND\\_KEY&F=SPEC&cm\\_sp=DETAIL-GROUP-DETAIL\\_RELATED\\_PRODUCT-Customers\\_Also\\_Purchased--L0145|SIGMA--SIGMA|L9634](http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?lang=en&N4=L9634|SIGMA&N5=SEARCH_CONCAT_PNO|BRAND_KEY&F=SPEC&cm_sp=DETAIL-GROUP-DETAIL_RELATED_PRODUCT-Customers_Also_Purchased--L0145|SIGMA--SIGMA|L9634). Acessado em 26 de junho de 2010.

SILVA, M. de L. C.; IZELI, N. L.; MARTINEZ, P. F.; SILVA, I. R.; CONSTANTINO, C. J. L.; CARDOSO, M. S.; BARBOSA, A. M.; DEKKER, R. F. H.; SILVA, G. V. J. da. Purification and structural characterisation of (1/3;1/6)-b-D-glucans (botryosphaerans) from *Botryosphaeria rhodina* grown on sucrose and fructose as carbon sources: a comparative study. *Carbohydrate Polymers*, v. 61, p. 10–17, 2005.

SIM, S. L.; HANG, Y. D. Sauerkraut Brine: a Potential Substrate for Production of Yeast  $\alpha$ -Glucosidase. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, v. 29, p. 365–367, 1996.

SKORY, C. D.; FREER, S. N.; BOTHAST, R. J. Properties of an intracellular  $\beta$ -glucosidase purified from the cellobiose-fermenting yeast *Candida wickerhamii*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 46, p.353 - 359, 1996

SOMOGYI, MA. A new reagent for determination of sugars. *Journal of Biological Chemistry*, v.16, p.61-68, 1945.

STELUTI R, M.; GIESE, E. C.; PIGATO, M. M.; SUMIYA, A. F. G.; COVIZZI, L. G.; JOB, A. E. Comparasion of Botryosphaeran production by the ascomyceteous fungus *Botryosphaeria* sp., grow on different carbohydrate carbon sources, and their partial structural features. *Journal Basic microbial*, v. 44, p. 480-486, 2004.

STONE, B.; CLARKE, A. Chemistry and biology of (1,3)- $\beta$ -Glucans. La Trobe University Press, Melbourne, 1992.

STRAUSS, M. L. A.; JOLLY, N. P.; LAMBRECHTS, M. G.; RENSBURG, P. V. Screening for the production of extracellular hydrolytic enzymes by non-*Saccharomyces* wine yeasts. *Journal Applied Microbiology*, v. 91, p. 182–190, 2001.

STUBBS, H. J. BRASCH, D. J.; EMERSON, G. W.; SULLIVAN, P. A. Hydrolase and transferase activities of the  $\beta$ -1,3-exoglucanase of *Candida albicans*. *European Journal of Biochemistry*, v. 263, p. 889-895, 1999.

SUTHERLAND, I.W. Polysaccharases for microbial exopolysaccharides. *Carbohydrate Research*, v. 38, p.319–328, 1999.

SUZUKI, K.; YABE, T.; MARUYAMA, Y.; ABE, K.; NAKAJIMA, T. Characterization of recombinant yeast exo- $\beta$ -1,3-glucanase (Exg 1p) expressed in *Escherichia coli* cells. *Bioscience Biotechnology Biochemistry*, v. 65, p. 1310–1314, 2001.

TADA, R.; ADACHI, Y.; ISHIBASHI, K-I.; TSUBAKI, K.; OHNO, N. Binding Capacity of a Barley  $\beta$ -D-Glucan to the  $\beta$  Glucan Recognition Molecule Dectin-1. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 56, p. 1442–1450, 2008.

TURAN, Y.; ZHENG, M. Purification and Characterization of an Intracellular  $\beta$ -Glucosidase from the Methylophilic Yeast *Pichia pastoris*. *Biochemistry*, v. 70, n. 12, p. 1363-1368, 2005.

UNIQUÍMICA. Disponível em:

<[http://www.uniquimica.com/htmls/noticias/index\\_noticias.php?cid=2&idm=&nid=2137&swf=no](http://www.uniquimica.com/htmls/noticias/index_noticias.php?cid=2&idm=&nid=2137&swf=no)>. Acessado em: 06 de novembro de 2008.

VÁSQUEZ-GARCIDUEÑAS, S.; LEAL-MORALES, C. A.; HERRERA-ESTRELLA, A. Analysis of the  $\beta$ -(1,3)-Glucanolytic system of the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. *Applied and environmental microbiology*, v. 64, n. 4, p. 1442-1446, 1998.

VANDERHAEGEN, B.; NEVEN, H.; COGHE, S.; VERSTREPEN, K. J.; DERDELINCKX, G.; VERACHTERT, H. Bioflavoring and beer refermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 62, p. 140–150, 2003.

VILLA, T. G.; NOTARIO, V.; BENÍTEZ, T.; VILLANUEVA, J. R. Synthesis of  $\beta$ -Glucanase and Other Extracellular Proteins by Cells and Protoplasts of the Yeast *Pichia polymorpha*: Effect of 2-Deoxy-D-Glucose. *Archives of Microbiology*, v. 105, p. 335-337, 1975.

VINE, R. P. *Commercial Winemaking: Processing and Controls*. United States of America: Saybrook, p. 110-113, 265-269, 1981.

VINSON, J.A.; JANG, J.; YANG, J.; DABBAGH, Y.; LIANG, X.; SERRY, M.; PROCH, J.; CAI, S. Vitamins and especially flavonoids in common beverages are powerful in vitro antioxidants which enrich lower density lipoproteins and increase their oxidative resistance after ex vivo spiking in human plasma. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 47, p. 2502-2504, 1999.

VOGEL HJ. A convenient growth medium for *Neurospora crassa*. *Genetic Bull*, v.13, p.42-43, 1956.

XU, Z.; SHIH, M. C.; POULTON, J. E. An extracellular exo- $\beta$ -(1, 3)- glucanase from *Pichia pastoris*: purification, characterization, molecular cloning, and functional expression. *Protein Expression and Purification*, v. 47, p. 118–127, 2006.

XU, X. B.; TIAN, S. P. Reducing oxidative stress in sweet cherry fruit by *Pichia membranaefaciens*: a possible mode of action against *Penicillium expansum*. *Journal of Applied Microbiology*, v. 105, p. 1170–1177, 2008.

ZHAO, Y.; TU, K.; SHAO, X.; JING, W.; SU, Z. Effects of the yeast *Pichia guilliermondii* against *Rhizopus nigricans* on tomato fruit. *Postharvest Biology and Technology*, v. 49, p. 113–120, 2008.

YI, H.; XIONG, S.; DU, M.; ZHANG, L. Purification and partial characterization of  $\beta$ -glucanase produced by *Trichoderma viride* TP09 isolated from sewage of beer-making. *European Food Research and Technology*, v. 227, p. 821-826, 2008.

YU, B.; HSU, J.-C.; CHIOU, P. W. S. Effects of  $\beta$ -glucanases supplementation of barley diets on growth performance of broilers. *Animal Feed Science Technology*, v. 70, p. 353-361, 1998.

WANG, X. H.; CHI, Z. M.; YUE, L. X.; LI, J. Purification and characterization of killer toxin from a marine yeast *Pichia anomala* YF07b against the pathogenic yeast in crab. *Current Microbiology*, v. 55, p. 396–40, 2007.

WU, H.; SHIMOI, H.; ITO, K. Purification and characterization of  $\beta$ -1,6-glucanase of *Streptomyces rochei*: Application in the study of yeast cell wall proteins. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, v. 66, n. 11, p. 2515-2519, 2002.

## **ANEXOS**

## ANEXO A

**ESQUEMA DE COMO FOI REALIZADA A COLETA E O ISOLAMENTO DOS MICRO-ORGANISMOS UTILIZADOS NESTE TRABALHO.**

**Isolamento das leveduras de uvas, sucos e mostos procedentes da região norte do Paraná**

