

# $\beta$ -1,3-Glucanases Fúngicas: produção e aplicações biotecnológicas

## Fungal $\beta$ -1,3-Glucanases: production and biotechnological applications

Anelize Bauermeister<sup>1</sup>; Maria Inês Rezende<sup>2</sup>; Ellen Cristine Giese<sup>3</sup>;  
Robert Frans Huibert Dekker<sup>4</sup>; Aneli de Melo Barbosa<sup>5\*</sup>

### Resumo

---

$\beta$ -1,3-Glucanases são enzimas que hidrolisam ligações glicosídicas do tipo  $\beta$ -1,3 presentes em  $\beta$ -D-glucanas, liberando glicose como produto principal. Estas enzimas são produzidas por fungos filamentosos e leveduriformes, assim como bactérias, apresentando amplas aplicações biotecnológicas. O objetivo do presente trabalho foi revisar a literatura publicada sobre  $\beta$ -1,3-glucanases fúngicas, enfatizando-se suas funções nos micro-organismos, alguns parâmetros utilizados para a determinação da atividade enzimática, substratos utilizados e condições de cultivo para a sua produção. Também foram relatadas aplicações destas enzimas na obtenção de oligossacarídeos bioativos, na caracterização da parede celular de micro-organismos, no controle biológico de patógenos de algumas plantas, como aditivos em rações para animais, além de sua adição em vinhos para melhorar as características organolépticas.

**Palavras-chave:** Enzimas.  $\beta$ -glucanas. Fungos filamentosos. Leveduras.

### Abstract

---

$\beta$ -1,3-Glucanases are enzymes that hydrolyze glycosidic linkages of the  $\beta$ -1,3 type present in  $\beta$ -D-glucans, liberating glucose as the main product. These enzymes are produced by filamentous fungi and yeasts, as well as bacteria and have wide biotechnological applications. The objective of this work was to review the published literature on fungal  $\beta$ -1,3-glucanases, emphasizing their biological functions, some parameters used to determine enzyme activity, the current substrates and culture conditions to produce these hydrolases. Also reported are their applications to obtain bioactive oligosaccharides, to structurally characterize microbial cell walls, their use in biological control of some plant pathogens, as feed additives, and also their addition to wines to improve the organoleptic characteristics.

**Key-words:** Enzymes.  $\beta$ -glucans. Filamentous fungi. Yeasts.

---

<sup>1</sup> Mestre pelo Programa de Biotecnologia, Departamento de Bioquímica e Biotecnologia, Universidade Estadual de Londrina. E-mail: ane\_qui@hotmail.com

<sup>2</sup> Professora Adjunto do Departamento de Bioquímica e Biotecnologia, Universidade Estadual de Londrina. E-mail: mirezende@uel.br

<sup>3</sup> Pós-doutoranda, Biorefining Research Initiative, Lakehead University, Thunder Bay, ON, Canada. E-mail: ellengiese@gmail.com

<sup>4</sup> Diretor do Biorefining Research Initiative, Lakehead University, Thunder Bay, ON, Canada. E-mail: rdekker@lakeheadu.ca

<sup>5</sup> Professora Associado C do Departamento de Bioquímica e Biotecnologia, Universidade Estadual de Londrina. E-mail: anelibrabosa@gmail.com

\*Autor para correspondência

## Introdução

As glucanas são polímeros de açúcar que podem ter centenas ou milhares de unidades monossacarídicas, e diferem entre si pelas ligações glicosídicas que as unem, comprimento de suas cadeias polissacarídicas, e também pelo grau de ramificação, quando presente. Estes polímeros podem ser de origem vegetal, como a celulose, que é uma molécula linear, não ramificada, constituída por unidades de glucose, unidas por ligações glicosídicas do tipo  $\beta$ -1,4 sendo, portanto, pertencente à classe das  $\beta$ -glucanas. Também existem as glucanas de origem animal, como o glicogênio, que possuem também resíduos de glucose unidos por ligações glicosídicas, porém do tipo  $\alpha$ -1,4, com ramificações de resíduos de glucose, interligados por ligações glicosídicas do tipo  $\alpha$ -1,6, sendo estas, pertencentes à classe das  $\alpha$ -glucanas. Um exemplo de  $\alpha$ -glucana vegetal é o amido que é constituído por dois tipos de polímeros, a amilose que contém apenas resíduos de glicose unidos por ligações do tipo  $\alpha$ -1,4 e a amilopectina, que possui resíduos de glucose unidos por ligações do tipo  $\alpha$ -1,4 e com ramificações de resíduos de glucose, interligados por ligações glicosídicas do tipo  $\alpha$ -1,6 (DELMER, 1999; NELSON; COX; 2002; ZOBEL, 2006).

Outros tipos de glucanas são produzidas por bactérias, fungos leveduriformes e filamentosos, as quais participam da composição da parede celular, enquanto outras são secretadas para o meio de cultivo, sendo então denominadas de exopolissacarídeos (EPS) (STRAUSS et al., 2001; BARBOSA et al., 2004; CORRADI DA SILVA et al., 2006, 2008; YI et al., 2008). Estes podem apresentar ligações tanto do tipo  $\alpha$  como  $\beta$ , havendo predominância das  $\beta$ -glucanas, sendo que um único micro-organismo pode produzir mais de um tipo de EPS com estruturas químicas diversificadas (SEVIOUR et al., 1992; BARBOSA et al., 2004).

A síntese de  $\beta$ -glucanas microbianas ocorre através de etapas que envolvem reações de iniciação, de alongamento da cadeia e de ramificação. A reação de alongamento é a etapa mais estudada, a qual é

catalisada pela enzima glucana sintetase a partir de unidades de UDPG (uridina difosfato glucose) (RUIZ-HERRERA, 1991). A principal função estrutural das  $\beta$ -glucanas é auxiliar na manutenção da rigidez e integridade da parede celular de fungos e leveduras (SEVIOUR et al., 1992; STONE, CLARKE, 1992). No ambiente natural em que os micro-organismos são encontrados, tais polímeros podem estar relacionados à patogenicidade (CORSARO et al., 1998), ou também estarem associados à interação planta-micro-organismo, proporcionando proteção à célula microbiana contra a dessecação ou ao ataque por bacteriófagos e protozoários (SUTHERLAND, 1999).

As  $\beta$ -glucanas podem ser degradadas pelas  $\beta$ -glucanases, que são enzimas multifuncionais que hidrolisam polissacarídeos como a celulose e outras  $\beta$ -glucanas (PITSON; SEVIOUR; MCDOUGALL, 1993, KUMAR; DEOBAGKAR, 1996). Estas hidrolases participam diretamente do processo de controle biológico porque hidrolisam  $\beta$ -1,3-1,6-glucanas constituintes da parede celular de alguns patógenos (IORIO et al., 2008; FLEURI; SATO, 2008).

As  $\beta$ -1,3-glucanases possuem diferentes aplicações biotecnológicas visto que atuam sobre diversas substâncias naturais que possuem ligações  $\beta$ -1,3- glicosídicas podendo ser aplicadas em indústrias de alimentos, como por exemplo, na produção de bebidas como vinhos e cervejas, e também na obtenção de oligossacarídeos que apresentam atividades funcionais, entre outros (DUBOURDIEU et al., 1985; KIRK; BORCHET; FUGLSANG, 2002; BLASCO et al., 2006; GIESE, BARBOSA; DEKKER, 2010; BARBOSA; DEKKER; GIESE, 2010).

O presente artigo objetivou relatar sobre  $\beta$ -1,3-glucanases fúngicas, enfatizando suas funções nos micro-organismos, alguns parâmetros utilizados para a determinação da atividade enzimática, substratos utilizados e condições de cultivo para a sua produção. Também estão descritas as principais aplicações biotecnológicas destas enzimas.

## β-1,3-Glucanases

### *Definição e modo de ação*

As enzimas β-1,3-glucanases hidrolisam as ligações β-(1,3)-D-glicosídicas de glucanas lineares ou parcialmente ramificadas e podem ser do tipo exo (EC 3.2.1.58) ou endo (EC 3.2.1.39) (NOMENCLATURE COMMITTEE OF THE INTERNATIONAL UNION OF BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY, 1992; STONE; CLARKE, 1992; SUTHERLAND, 1999).

As β-1,3-glucanases atuam em substratos constituídos de sequências lineares de unidades de glucose unidas através de ligações glicosídicas do tipo β-1,3 contendo uma extremidade terminal não redutora. Entretanto, é permitido um grau moderado de substituições, assim as enzimas podem atuar sobre ligações do tipo β-1,3-1,6 glicosídicas encontradas em β-1,3-1,6-glucanas. Como exemplo deste tipo de glucana pode ser citado a laminarina, isolada da alga *Laminaria digitata*, que possui apenas 10 % de grau de ramificação e tem sido muito utilizada como substrato para a determinação da atividade de β-1,3-glucanases (BROCK, 1965; STUBBS et al., 1999; MOLERO et al., 1999; BARSANTI et al., 2001).

A ação das β-1,3-glucanases ocorre através de hidrólises sucessivas a partir da extremidade não-redutora da glucana (SUTHERLAND, 1999), obtendo-se glucose e oligossacarídeos como produtos finais da reação, e em um período mais longo, apenas moléculas de glucose, como demonstrado por Giese et al. (2006), quando estudaram uma glucanase não purificada de *T. harzianum*.

Os gluco-oligossacarídeos com diferentes graus de polimerização (GP), como laminaribiose (GP=2), laminaritriose (GP=3) e laminariheptaose (GP=7) também têm sido descritos como substratos para avaliar os diferentes mecanismos de ação de β-1,3-glucanases (MIYANISHI et al., 2003). Porém, é importante ressaltar que concentrações elevadas desses substratos podem inibir a atividade desta enzima (SUZUKI et al., 2001). Sánchez,

Villanueva e Villa (1982) isolaram duas exo-β-1,3-glucanases produzidas por uma cepa de *Saccharomyces cerevisiae* que apresentaram atividade em laminarina (100%), pustulana (45%) e também no substrato cromogênico *p*-nitrofenil-β-D-glucopiranosídeo (*p*-NPG) (15-35%). A β-glucanase produzida pela *Candida utilis* apresentou atividade sobre laminarina, pustulana, β-1,3-1,4-glucana isolada de aveia e *p*-NPG (NOTARIO; VILLA; VILLANUEVA, 1976).

### *Algumas funções fisiológicas das β-1,3-glucanases nos micro-organismos*

As β-1,3-glucanases são produzidas por bactérias (FLEURI; SATO, 2008), leveduras (NEBREDÁ et al., 1987, DAENEN et al., 2008), e fungos filamentosos (VÁSQUEZ-GARCIDUEÑAS; LEAL-MORALES; HERRERA-ESTRELLA, 1998).

Muitos fungos filamentosos e leveduriformes são produtores de β-1,3-glucanases extracelulares, produzindo-as constitutivamente ou indutivamente, podendo também serem encontradas associadas à parede celular ou somente no interior da célula (RAPP, 1989; PITSON; SEVIOUR; MCDUGALL, 1993). O fungo filamentoso *Trichoderma harzianum*, por exemplo, sob indução, produz um complexo enzimático com pelo menos sete β-1,3-glucanases (VÁSQUEZ-GARCIDUEÑAS; LEAL-MORALES; HERRERA-ESTRELLA, 1998). A levedura *Saccharomycopsis fibuligena* é produtora de β-1,6-glucanases extracelulares e intracelulares (MULENGA; BERRY, 1994).

As β-glucanases desempenham um papel importante no processo morfogênico principalmente em leveduras, onde estão relacionadas aos processos de germinação, esporulação e no crescimento celular. Assim como as quitinases e outras hidrolases, as β-glucanases também estão associadas com a quebra de ligações intra e inter poliméricas dos constituintes da parede celular de micro-organismos, bem como com o alongamento destes polímeros através de

reações de síntese reversa (BHAGWAT et al., 1996; RAST et al., 2003).

A proporção de  $\beta$ -glucanas na parede celular microbiana está relacionada com o nível de secreção de  $\beta$ -glucanases, uma vez que estas atuam na modificação da parede, durante a fase de crescimento do micro-organismo e, posteriormente, no processo de autólise (HERNANDEZ, OLIVERO; LARRIBA, 1983; McLEOD; SMART; FRY, 2003; ADAMS, 2004).

#### *Parâmetros para a determinação da atividade enzimática*

A escolha do substrato para a determinação da atividade de  $\beta$ -1,3-glucanases deve ser criteriosa, visto que as  $\beta$ -glucanases podem ser confundidas com as  $\beta$ -glicosidases (VILLA et al., 1975), uma vez que esta última tem capacidade de hidrolisar o *p*-NPG, enquanto que as  $\beta$ -glucanases apresentam baixa especificidade para hidrolisar ligações simples de aril e alquil glicosídeos (TINGLE; HALVORSON, 1971).

Uma característica interessante das  $\beta$ -1,3-glucanases é que estas hidrolases não apresentam especificidade para um único substrato (BROCK, 1965). Suzuki et al. (2001) estudaram uma  $\beta$ -1,3-glucanase (45 kDa) de *Saccharomyces cerevisiae* expressa em *Escherichia coli*, a qual apresentou maior afinidade por substratos de menor GP como a laminaribiose, gentiobiose e também sobre o *p*-NPG. A enzima foi classificada como uma exo- $\beta$ -1,3-glucanase, por hidrolisar substratos como laminarina e pustulana ( $\beta$ -1,6-glucana) liberando unidades de glucose a partir da unidade terminal não-redutora. As  $\beta$ -glucanases produzidas por fungos filamentosos também podem atuar sobre diferentes substratos, como descrito por Kulminkaya et al. (2001) que demonstraram a atividade de uma exo- $\beta$ -1,3-glucanase produzida por *Trichoderma viride* em laminarina,  $\beta$ -oligoglicosídeos com diferentes graus de ramificações, assim como curdlana e pustulana.

Os tempos de incubação para a determinação da atividade de  $\beta$ -1,3-glucanase descritos na literatura variam em intervalos de 10 a 20 minutos (GIESE et al., 2005; SIM, HANG, 1996) ou bem maiores como 1 hora (VÁSQUEZ-GARCIDUEÑAS; LEAL-MORALES; HERRERA-ESTRELLA, 1998; DAENEN et al., 2008; PENG et al., 2009). Os tampões mais utilizados na determinação da atividade tem sido acetato de sódio (STRAUSS et al., 2001), variando-se o valor de 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 variado de 25 °C (MASIH; PAUL, 2002), 40 °C (PENG et al., 2009), ou até mais elevadas como 50 °C (BAR-SHIMON et al., 2004; GIESE et al., 2005).

As  $\beta$ -glucanases também podem ter a atividade inibida pela presença de compostos como clorofórmio, benzenóides, organofosfatos e quelantes, entre outros, bem como pela concentração de substrato ou de produtos formados durante a reação (RANA et al., 2003). Uma  $\beta$ -glucanase produzida por *Trichoderma viride* teve sua atividade inibida na presença de íons  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  e  $\text{Cu}^{2+}$  e aumentada na de  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  e  $\text{Ca}^{2+}$  (YI et al., 2008).

#### **Fontes de carbono utilizadas para a produção de $\beta$ -1,3-glucanases**

A produção de  $\beta$ -glucanases pode ser influenciada por componentes do meio de cultivo, principalmente pela concentração e natureza química da fonte de carbono. O excesso de glucose ou outra fonte de carbono facilmente acessível pode reprimir a produção de  $\beta$ -glucanases por alguns micro-organismos (BIELECKI; GALAS, 1991; GIESE; CORRADI DA SILVA; BARBOSA, 2003). Entretanto, micro-organismos como o *Trichoderma viride*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Candida albicans* não sofreram repressão catabólica e as  $\beta$ -1,3 e  $\beta$ -1,6-glucanases foram secretadas para o

meio extracelular durante a fase de crescimento (DEL REY; GARCIA-ACHA; MOMBELA, 1979; MOLINA et al., 1989).

As  $\beta$ -1,3-glucanases são produzidas por uma grande diversidade de fungos. Cruz et al. (1993) relataram a presença de atividade lítica do *Trichoderma harzianum* quando cultivado na presença da parede celular de *Saccharomyces cerevisiae* e *Botrytis cinerea* como fonte de carbono, devido à produção de enzimas como  $\beta$ -glucanases e quitinases. O fungo *Trichoderma harzianum* produziu esta enzima também na presença de parede celular de outros micro-organismos como *Mucor rouxii*, *Neurospora crassa* e *Rhizoctonia solani* (VÁSQUEZ-GARCIDUEÑAS; LEAL-MORALES; HERRERA-ESTRELLA, 1998).

Algumas  $\beta$ -glucanas têm sido utilizadas como fontes de carbono indutoras para a produção de  $\beta$ -1,3-glucanases. A escleroglucana, uma  $\beta$ -1,3-1,6-glucana produzida pelo fungo *Sclerotium glucanicum*, foi utilizada como fonte de carbono para a produção de  $\beta$ -1,3-glucanases por *Trichoderma atroviride* (DONZELLI; SIEBERT; HARMAN, 2005), utilizando-se planejamento fatorial e análise por metodologia de superfície de resposta. Os experimentos que continham maiores concentrações de escleroglucana levaram a obtenção dos maiores títulos de produção da enzima. Em outro trabalho, a produção de  $\beta$ -1,3-glucanases por *Trichoderma harzianum* foi comparada utilizando-se duas diferentes fontes indutoras, ou seja, uma  $\beta$ -1,3-1,6-glucana denominada botriosferana, produzida pelo fungo *Botryosphaeria rhodina*, e o micélio autoclavado e liofilizado deste mesmo fungo. Em ambas as fontes de carbono o micro-organismo cresceu e produziu  $\beta$ -glucanase, entretanto, o micélio do *Botryosphaeria rhodina* proporcionou maiores títulos de atividade enzimática (GIESE et al., 2005).

A parede celular do fungo *Botrytis cinerea* foi a melhor fonte indutora para a produção de exo- $\beta$ -1,3-glucanases e endo- $\beta$ -1,3-glucanases por *Pichia membranifaciens*, cuja produção foi muito baixa

quando a levedura foi cultivada na presença de glucose, e um pouco maior em laminarina (MASIH; PAUL, 2002). Fragmentos de parede celular do patógeno *Penicillium digitatum*, induziram a atividade da exo- $\beta$ -1,3-glucanase na levedura *Candida oleophila*, quando adicionados aos cultivos (BAR-SHIMON et al., 2004).

Além do substrato, outros fatores também podem interferir na síntese de  $\beta$ -1,3-glucanases. Jayus, McDougall e Seviour (2005) relataram o aumento da produção desta hidrolase com o aumento da concentração de oxigênio no meio de cultivo, por *Acromonium* sp. IMI 383068 em pustulana e, principalmente, escleroglucana como fonte de carbono.

A produção microbiana de  $\beta$ -glucanases extracelulares está relacionada à degradação das  $\beta$ -glucanas presentes como fonte de carbono (PITSON; SEVIOUR; MCDUGALL, 1993). Estas enzimas estão envolvidas no processo de autólise dos micro-organismos e geralmente não são secretadas para o meio extracelular durante a fase exponencial de crescimento, e sim durante a fase estacionária, como no caso da levedura *Saccharomyces exiguous* (INOUE et al., 1997).

### Aplicações das $\beta$ -1,3-glucanases

As  $\beta$ -1,3-glucanases apresentam diversas aplicações desde o uso na caracterização da parede celular microbiana como também na indústria alimentícia, na produção de bebidas como vinho e cerveja, ou também como suplemento alimentar em rações, devido à presença de  $\beta$ -1,3-glucanas. As principais aplicações biotecnológicas destas enzimas estão descritas a seguir.

#### Obtenção de oligossacarídeos bioativos

Alguns exopolissacarídeos fúngicos como escleroglucana, esquizofilana, cinereana, pestalotana têm sido descritos como  $\beta$ -glucanas com atividade antitumoral (BARBOSA, et al., 2004). A

botriosferana é uma  $\beta$ -glucana produzida pelo fungo ascomiceto *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 que demonstrou atividade anticlastogênica (MIRANDA et al., 2008). Algumas  $\beta$ -glucanas que apresentam atividade biológica possuem baixa solubilidade em água e elevada viscosidade, dificultando o desenvolvimento de testes biológicos. Desta forma, as  $\beta$ -glucanases constituem uma ferramenta importante que pode ser utilizada para a obtenção de gluco-oligossacarídeos que, mantenham ou levem a um aumento da atividade biológica original (SUTHERLAND, 1999; GIESE; BARBOSA; DEKKER, 2010). Os gluco-oligossacarídeos bioativos derivados das  $\beta$ -1,3-glucanas têm sido descritos como agentes imunomoduladores e estimulantes da resposta anti-inflamatória, mediada pelas células do sistema imune, através da indução de mediadores pró- e anti-inflamatórios. O mecanismo de ação anti-tumoral tem sido relacionado à indução das diversas respostas imunológicas do hospedeiro, principalmente pela ativação das células “*natural killer*” (NK) (BARBOSA; DEKKER; GIESE, 2010).

A atividade biológica de um polissacarídeo muitas vezes está relacionada à sua massa molecular, configuração e posição das ligações glicosídicas, entre outras características (CALAZANS et al., 2000, CHAIDEDGUMJORN et al., 2002). A hidrólise ácida tem sido a via de obtenção mais utilizada na obtenção de oligossacarídeos, entretanto esta proporciona a produção de maior quantidade de mono-, di- e trissacarídeos, além de produtos colaterais como furfurais. Por este motivo a hidrólise enzimática de  $\beta$ -glucanas tem sido avaliada para a obtenção de diferentes gluco-oligossacarídeos, uma vez que esta proporciona a produção de oligômeros de maior massa molecular ( $GP \geq 4$ ), que apresentam propriedades biológicas (GIESE; BARBOSA; DEKKER, 2010; BARBOSA; DEKKER; GIESE, 2010).

Martín-Cuadrado et al. (2008) descreveram a hidrólise enzimática de laminarina e curdlana ( $\beta$ -1,3-glucana) com  $\beta$ -1,3-glucanases produzidas por

*Saccharomyces cerevisiae* e *Schizosaccharomyces pombe*. Os principais produtos da hidrólise de ambos os substratos foram laminaribiose (G2), laminaritriose (G3) e laminaritetraose (G4) após 8 horas de incubação, e acima de 80% de G2 e G3, após 24 horas. Giese et al. (2006, 2009) obtiveram oligossacarídeos de diferentes massas moleculares ( $GP \geq 3$ ) quando utilizaram  $\beta$ -1,3-glucanases produzidas pelos fungos *Trichoderma harzianum* e *Botryosphaeria rhodina* na hidrólise das  $\beta$ -1,3-1,6-glucanas laminarina e botriosferana.

Os gentio-oligossacarídeos e laminari-oligossacarídeos também são considerados fibras alimentares, pois são resistentes às enzimas que atuam no sistema digestivo e auxiliam o funcionamento do sistema digestivo por beneficiarem a proliferação de bifidobactérias e lactobacilos presentes na flora intestinal (SHODA; FUJITA; KOBAYASHI, 1998; RYCROFT et al., 2001; SANZ et al., 2006).

#### Controle biológico

O desenvolvimento de métodos de controle biológico como uma alternativa aos fungicidas químicos no controle de doenças tem sido estudado nos últimos anos. Vários micro-organismos têm sido descritos por apresentarem características antagonistas a certos patógenos, como por exemplo, o fungo *Penicillium expansum*, causador do mofo azul em cerejas (XU; TIAN, 2008). O modo de ação na atividade antagonista contra patógenos pode variar dependendo do micro-organismo. Por exemplo, a levedura *Rhodotorula glutinis* LS-11 competiu por nutrientes com o patógeno, enquanto que outra levedura *Cryptococcus laurentii* LS-28 interagiu diretamente com o patógeno utilizando hidrolases (CASTORIA et al., 1997). A aplicação de  $\beta$ -1,3-glucanases ou dos micro-organismos produtores dessas enzimas é importante para retardar o crescimento de fungos patogênicos e diminuir a deterioração dos frutos causada pelos mesmos. Xu e Tian (2008) observaram indução da produção destas enzimas pela levedura *Pichia membranaefaciens*

na presença de *Penicillium expansum*, causador de stress oxidativo em tomates, favorecendo o controle deste fitopatógeno.

A aplicação das  $\beta$ -1,3-glucanases no controle biológico ocorre devido à composição da parede celular dos micro-organismos patogênicos, a qual é composta principalmente de  $\beta$ -glucanas (IORIO et al., 2008; FLEURI; SATO, 2008). Masih e Paul (2002) observaram a ação hidrolítica de  $\beta$ -1,3-glucanases secretadas pela levedura *Pichia membranifaciens*, isolada de uva, sobre a parede celular de *Botrytis cinerea*, o fungo causador da doença do mofo cinza em parreiras de uvas. A levedura *Pichia guilliermondii* apresentou atividade antagonista ao *Rhizopus nigricans*, encontrado em tomates durante o armazenamento, devido à produção de enzimas como  $\beta$ -glucanases (ZHAO et al., 2008).

Santos, Sánchez e Marquina (2004) avaliaram a ação antagonista de 42 leveduras de 20 espécies diferentes sobre 18 cepas de *Botrytis cinerea*. As leveduras que apresentaram maior ação antagonista foram *Pichia membranifaciens*, *Pichia anomala* e *Debaryomyces hansenii* devido à atividade de  $\beta$ -glucanases.

O produto comercial “Aspire”, recomendado para o controle biológico de podridões pós-colheita de citrus e de frutas como maçã e pêra, tem como base a levedura *Candida oleophila*, devido à produção de  $\beta$ -glucanases. A levedura *C. oleophila*, de acordo com Bar-Shimon et al. (2004), relataram a produção de várias enzimas degradativas da parede celular de *Penicillium digitatum*, incluindo-se  $\beta$ -1,3-glucanases, quitinases e proteases.

#### *Adição em rações para animais*

O uso de hidrolases, principalmente as  $\beta$ -glucanases, como aditivos em rações suplementares fabricadas a partir de grãos como cevada, trigo e milho tornou-se popular durante a década de 80. A ação de  $\beta$ -glucanases sobre estes

cereais liberou nutrientes e, conseqüentemente, aumentou a digestibilidade, uma vez que estes grãos são ricos em fibras insolúveis as quais foram parcialmente hidrolisadas por ação das enzimas adicionadas (BRUFAU; FRANCESCH; PÉREZ-VENDRELL, 2006).

A cevada, por exemplo, é um cereal utilizado na alimentação animal e é constituída por amido e também por  $\beta$ -1,3-1,4-glucanas (TADA et al., 2008). A suplementação de rações com  $\beta$ -glucanases produzidas por *Trichoderma longibrachiatum* e *Aspergillus niger* aumentou o peso corporal e promoveu maior crescimento de frangos com apenas seis semanas de vida (YU; HSU; CHIOU, 1998).

#### *Melhoramento da qualidade de bebidas*

As  $\beta$ -glucanas e pentosanas são constituintes de diversos cereais, e quando em contato com a água, possuem capacidade de formar géis. Na indústria de cervejas, por exemplo, a alta viscosidade proporcionada pelas  $\beta$ -glucanas presentes no malte, causam problemas durante o processo de filtração (KETTUNEN et al., 1996). Portanto, a adição de  $\beta$ -glucanases nos processos de produção de bebidas é importante para promover a diminuição da viscosidade e aumentar a liberação de açúcares solúveis presentes no malte e outros cereais (BAMFORTH, 2009). Daenen et al. (2008) demonstraram que a levedura *Saccharomyces cerevisiae* utilizada na produção da cerveja apresentou atividade de  $\beta$ -glucanases, as quais estavam envolvidas 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 durante a fermentação. Gil et al. (2005) expressaram o

gene de uma  $\beta$ -glucanase (EXG1) em uma cepa de *Saccharomyces cerevisiae* produtora de vinho, a qual melhorou o perfil do vinho produzido através do aumento da liberação de alcoóis e terpenos como álcool fenilético, nerol e geraniol. Portanto, estas hidrolases desempenham um papel importante na fabricação dos vinhos, desde a fermentação até o envelhecimento, onde catalisam diversas reações de bio-transformação (VANDERHAEGEN et al., 2003; HUMBERT-GOFFARD et al., 2004; BLASCO et al., 2006). Além de atuarem na hidrólise das  $\beta$ -glucanas constituintes das paredes celulares das leveduras presentes no mosto, também promoveram diversas modificações químicas que melhorou a coloração e diminuiu a adstringência do produto final (POZO-BAYÓN; ANDÚJAR-ORTIZ; MORENO-ARRIBAS, 2009).

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). Os níveis de enzimas hidrolíticas como  $\beta$ -1,3-glucanases,  $\beta$ -1,6-glucanases e  $\beta$ -glicosidases podem variar de acordo com o tempo de envelhecimento. Essas enzimas provêm dos próprios bagos da uva ou de micro-organismos presentes nas uvas e no mosto (BLASCO et al., 2006).

Strauss et al. (2001) isolaram diversas leveduras de uvas na África do Sul, e dentre as leveduras que apresentaram atividade de  $\beta$ -glucanase destacaram-se os isolados de *Candida stellata*, *Candida hellenica* e *Kloeckera apiculata*. Dentre as leveduras vínicas, várias espécies de *Saccharomyces* e não-*Saccharomyces* têm sido selecionadas como produtoras de  $\beta$ -glucanases e  $\beta$ -glicosidases (ARÉVALO VILLENA; ÚBEDA IRANZO; BRIONES PÉREZ, 2007).

As  $\beta$ -glucanases, além de participarem do processo de clarificação de vinhos e cervejas (DUBOURDIEU et al., 1985), auxiliam na liberação de compostos precursores do aroma e compostos

fenólicos unidos à cadeia de  $\beta$ -glucanas presentes no mosto (GÜNATA et al., 1988).

O uso de ferramentas de biologia molecular para criar leveduras recombinantes que expressem o gene da  $\beta$ -1,3-glucanase visando o aumento da produção destas enzimas tem sido estudado, principalmente para aumentar a degradação das  $\beta$ -glucanas presentes na composição dos mostos (PLANAS, 2000).

### Considerações Finais

A aplicação das  $\beta$ -1,3-glucanases em biotecnologia tem um futuro promissor para novos processos industriais. Entretanto, a sua produção em maior escala ainda tem custo elevado devido ao substrato utilizado como indutor da enzima. Novas pesquisas sobre a regulação da síntese destas hidrolases por via fermentativa, purificação e mecanismo de ação ainda são necessárias para ampliar a compreensão e exploração das  $\beta$ -1,3-glucanases no desenvolvimento de novas tecnologias.

### Agradecimentos

Os autores agradecem à Fundação Araucária e a CAPES/DGU N° 153/08 pelo apoio financeiro. Anelize Bauermeister também agradece à CAPES pela bolsa de mestrado concedida. Ellen C. Giese agradece à DFAIT (Foreign Affairs and International Trade, Canadá) pela bolsa de pós-doutoramento.

### Referências

- ADAMS, D. J. Fungal cell wall chitinases and glucanases. *Microbiology*, Washington, v. 150, p. 2029-2035, 2004.
- ARÉVALO VILLENA, M.; ÚBEDA IRANZO, J. F.; BRIONES PÉREZ, A. I.  $\beta$ -Glucosidase activity in wine yeasts: application in enology. *Enzyme and Microbial Technology*, Guildford, v. 40, p. 420-425, 2007.
- BAMFORTH, C. W. Current perspectives on the role of enzymes in brewing. *Journal of Cereal Science*, London, v. 50, p. 353-357, 2009.

- BARBOSA, A. M.; CUNHA, P. D. T.; PIGATTO, M. M.; CORRADI da SILVA, M. L. Produção e aplicações de exopolissacarídeos fúngicos. *Semina*, Londrina, v. 25, p. 29-42, 2004.
- BARBOSA, A. M.; DEKKER, R. F. H.; GIESE, E. C. *Bioactive oligosaccharides: production, biological functions and potential commercial applications*. New York: Nova Science Publishers, 2010.
- BARSANTI, L.; VISMARA, R.; PASSARELLI, V.; GUALTIERI, P. Paramylon content in wild type and WZSL mutant of *euglena gracilis*. Effects of growth conditions. *Journal of Applied Phycology*, Dordrecht, v. 13, p. 59-65, 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*, New York, v. 45, p. 140-148, 2004.
- BHAGWAT, A. A.; GROSS, K. C.; TULLY, R. E.; KEISTER, D. L. β-Glucan synthesis in *Bradyrhizobium japonicum*: characterization of a new locus (ndvc) influencing β-1,6 linkages. *Journal of Bacteriology*, Baltimore, v. 178, p. 4635-4642, 1996.
- BIELECKI, S.; GALAS, E. Microbial β-glucanases different from cellulases. *Biotechnology*, Frankfurt, v. 10, p. 275-304, 1991.
- BLASCO, L.; VEIGA-CRESPO, P.; POZA, M.; VILLA, T. G. Hydrolases as markers of wine aging. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, Oxford, v. 22, p. 1229-1233, 2006.
- BROCK, T. D. β-Glucanase of yeast. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, New York, v. 19, p. 623-629, 1965.
- BRUFAU, J.; FRANCESCH, M.; PÉREZ-VENDRELL, A. M. The use of enzymes to improve cereal diets for animal feeding. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, London, v. 86, p. 1705-1713, 2006.
- 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*, Guildford, v. 27, p. 245-247, 2000.
- CASTORIA, R.; CURTIS, F.; LIMA, G.; CICCO, V. β-1,3-glucanase activity of two saprophytic yeasts and possible mode of action as biocontrol agents against postharvest diseases. *Postharvest Biology and Technology*, Amsterdam, v. 12, p. 293-300, 1997.
- 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*, Amsterdam, 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*, Amsterdam, v. 343, p. 793-798, 2008.
- CORRADI DA SILVA, M. L.; MARTINEZ, P. F.; IZELI, N. L.; SILVA, I. R.; VASCONCELOS, A. F. D.; CARDOSO, M. S.; STELUTI, R. M.; GIESE, E. C.; BARBOSA, A. M. Caracterização química de glucanas fúngicas e suas aplicações biotecnológicas. *Química Nova*, São Paulo, v. 29, p. 85-92, 2006.
- 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*, Amsterdam, v. 308, p. 349-357, 1998.
- CRUZ, J.; REY, M.; LORA, J. M.; HIDALGO-GALLEGO, A.; DOMÍNGUEZ, F.; PINTOR-TORO, J. A.; LLOBELL, A.; BENÍTEZ, T. Carbon source control on β-glucanases, chitobiase and chitinase from *Trichoderma harzianum*. *Archives of Microbiology*, New York, 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*, New York, v. 104, p. 478-488, 2008.
- DELMER, D. P. Cellulose biosynthesis: exciting times for a difficult field of study. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, Palo Alto, v. 50, p. 245-276, 1999.
- DEL REY, F.; GARCIA-ACHA, I.; NOMBELA, C. The regulation of β-glucanase synthesis in fungi and yeast. *Journal of General Microbiology*, London, v. 110, p. 83-89, 1979.
- DONZELLI, B. G. G.; SIEBERT, K. J.; HARMAN, G. E. Response surface modeling of factors influencing the production of chitinolytic and β-1,3-glucanolytic

- enzymes in *Trichoderma atroviride* strain P1. *Enzyme and Microbial Technology*, Guildford, v. 37, p. 82-92, 2005.
- DUBOURDIEU, D.; DESPLANQUES, C.; VILLETAZ, J. C.; RIBÉREAU-GAYON, P. Investigations of an industrial  $\beta$ -D-Glucanase from *Trichoderma harzianum*. *Carbohydrate Research*, Amsterdam, v. 144, p. 277-287, 1985.
- FLEURI, L. F.; SATO, H. H.  $\beta$ -1,3 Glucanases e quitinasas: aplicação na lise de leveduras e inibição de fungos. *Ciência e Agrotecnologia*, Lavras, v. 32, p. 1224-1231, 2008.
- GIESE, E. C.; BARBOSA, A. M.; DEKKER, R. F. H. Pathways to bioactive oligosaccharides: biological functions and potential applications. In: ITO, R.; MATSUO, Y. *Handbook of carbohydrate polymers: development, properties and applications*. New York: Nova Science Publishers, 2010. p. 279-309.
- GIESE, E. C.; CORRADI DA SILVA, M. L.; BARBOSA, A. M. Glucanases fúngicas: produção e aplicações das  $\beta$ -1,3 e  $\beta$ -1,6-glucanases. *Revista Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento*, Brasília, v. 30, p. 97-104, 2003.
- GIESE, E. C.; COVIZZI, L. G.; BORSATO, D.; DEKKER, R. F. H.; CORRADI DA SILVA, M. L.; BARBOSA, A. M. Botryosphaeran, a new substrate for the production of  $\beta$ -1,3-glucanases by *Botryosphaeria rhodina* and *Trichoderma harzianum* Rifai. *Process Biochemistry*, Barking, 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 botryosphaeran and laminarin  $\beta$ -1,3-glucanases produced by *Botryosphaeria rhodina* and *Trichoderma harzianum* Rifai. *Process Biochemistry*, Barking, v. 41, p. 1234-1466, 2006.
- GIESE, E. C.; MONTEIRO, A. C.; BARBOSA, A. M.; DEKKER, R. F. H.; SANTOS JUNIOR, O. A.; CORRADI DA SILVA, M. L.; GOMES, E.; SILVA, R. Evaluation of the  $\beta$ -glucanolytic enzyme complex of *Trichoderma harzianum* Rifai for the production of gluco-oligosaccharide fragments by enzymatic hydrolysis of 1,3;1,6- $\beta$ -D-glucans In: MENDEZ-VILAS, A (Ed.). *Current research topics in applied microbiology and microbial biotechnology*. London: World Scientific Publishing, 2009. p. 438-441.
- 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*, Amsterdam, v. 103, p. 57-68, 2005.
- GÜNATA, Y.; BITTEUR, S.; BRILLOUT, J.-M.; BAYONOVE, C. L.; CORDONNIER, R. E. Sequential enzymatic hydrolysis of potential aromatic from grape. *Carbohydrate Research*, Amsterdam, v. 184, p. 139-149, 1988.
- HERNANDEZ, L. M.; OLIVERO, I.; LARRIBA, G. Detection of inactive precursors of  $\beta$ -glucanases *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters*, Amsterdam, v. 161, p. 190-194, 1983.
- HUMBERT-GOFFARD, A.; SAUCIER, C.; MOINE-LEDOUX, V.; CANAL-LLAUBÈRES, R. M.; DUBOURDIEU, D.; GLORIES, Y. An assay for glucanase activity in wine. *Enzyme and Microbial Technology*, Guildford, v. 34, p. 537-543, 2004.
- INOUE, M.; SUGO, E.; TOHOYAMA, H.; JOHO, M.; NEVINS, D. J. Cell wall metabolism and autolytic activities of the yeast *Saccharomyces exiguus*. *International Journal of Biological Macromolecules*, Guildford, v. 21, p. 11-14, 1997.
- IORIO, E.; TOROSANTUCCI, A.; BROMURO, C.; CHIANI, P.; FERRETTI, A.; GIANNINI, M.; CASSONE, A.; PODO, F. *Candida albicans* cell wall comprises a branched  $\beta$ -D-(1,6)-glucan with  $\beta$ -D-(1,3)-side chains. *Carbohydrate Research*, Amsterdam, v. 343, p. 105-1061, 2008.
- JAYUS; McDOUGALL, B. M.; SEVIOUR, R. J. The effect of dissolved oxygen concentrations on 1,3 and 1,6- $\beta$ -glucanase production by *Acremonium* sp. IMI 383068 in batch culture. *Enzyme and Microbial Technology*, Guildford, v. 36, p. 176-181, 2005.
- 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*, Westport, v. 29, p. 185-200, 1996.
- KIRK, O.; BORCHET, T. V.; FUGLSANG, C. C. Industrial enzyme applications. *Current Opinion Biotechnology*, London, v. 13, p. 345-351, 2002.
- 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 an exo-1,3- $\beta$ -glucanase from *Trichoderma viride*. *European Journal of Biochemistry*, Weinheim, v. 268, p. 612-6131, 2001.
- KUMAR, N. N.; DEOBAGKAR, D. N. Multifunctional glucanases. *Biotechnology Advances*, Oxford, v. 14, p. 1-15, 1996.
- MARTÍN-CUADRADO, A. B.; FONTAINE, T.; ESTEBAN, P. F.; DEL DEDO, J. E.; MEDINA-REDONDO, M.; DEL REY, F.; LATGÉ, J. P.; ALDANA,

- C. R. V. Characterization of the endo-β-1,3-glucanase activity of *S. cerevisiae* Eng2 and other members of the GH81 family. *Fungal Genetics and Biology*, Orlando, v. 45, p. 542-553, 2008.
- MASIH, E. I.; PAUL, B. Secretion of β-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*, New York, v. 44, p. 391-395, 2002.
- McLEOD, A.; SMART, C. D.; FRY, W. E. Characterization of 1,3-β-glucanase and 1,3;1,4-β-glucanase genes from *Phytophthora infestans*. *Fungal Genetics and Biology*, Orlando, v. 38, p. 250-263, 2003.
- MIRANDA, C. C. B. O.; ROBERT, F. H. D.; SERPELONI, J. M.; FONSECA, E. A. I.; CÔLUS, I. M. S.; BARBOSA, A. M. Anticlastogenic activity exhibited by botryosphaeran, a new exopolysaccharide produced by *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05. *International Journal of Biological Macromolecules*, Guildford, v. 42, p. 172-177, 2008.
- MIYANISHI, N.; MATSUBARA, Y.; HAMADA, N.; KOBAYASHI, T.; IMADA, C.; WATANABE, A. The action modes of an extracellular β-1,3-glucanase isolated from *Bacillus clausii* NM-1 on β-1,3-glucooligosaccharides. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, Osaka, v. 96, p. 32-37, 2003.
- MOLERO, G.; CID, V. J.; VIVAR, C.; NOMBELA, C.; SÁNCHEZ-PÉREZ, M. *Candida albicans* exoglucanase as a reporter gene in *Schizosaccharomyces pombe*. *FEMS Microbiology Letters*, Amsterdam, v. 175, p. 143-148, 1999.
- MOLINA, M.; CENAMOR, R.; SANCHEZ M.; NOMBELA, C. Purification and some properties of *Candida albicans* Exo-1,3-β-glucanase. *Journal of General Microbiology*, London, v. 135, p. 309-314, 1989.
- MULENGA, D. K.; BERRY, D. R. Isolation and characterization of a unique endo-β-1,6-glucanase from the yeast *Saccharomycopsis fibuligera* NCYC 451. *Microbioscience*, Cambridge, v. 80, p. 143-154, 1994.
- NEBREDÁ, A. R.; VAZQUEZ, C. R.; VILLA, T. G.; VILLANUEVA, J. R.; DEL REY, F. Heterogeneous glycosylation of the EXGI gene product accounts for the two extracellular exo-β-glucanases of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters*, Amsterdam, v. 220, p. 27-30, 1987.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. *Lehninger principios de bioquímica*. 3. ed. São Paulo: Sarvier, 2002. p. 282-285.
- NOMENCLATURE COMMITTEE OF THE INTERNATIONAL UNION OF BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY. *Enzyme Nomenclature; Recommendations of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry*. Orlando: Academic Press, 1992.
- NOTARIO, V.; VILLA, T. G.; VILLANUEVA, J. R. Purification of an exo-β-glucanase from cell-free extracts of *Candida utilis*. *Biochemical Journal*, Amsterdam, v. 159, p. 555-562, 1976.
- PENG, Y.; CHI, Z. M.; WANG, X. H.; LI, J. Purification and molecular characterization of exo-β-1,3-glucanases from the marine yeast *Williopsis saturnus* WC91-2. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v. 85, p. 85-94, 2009.
- PITSON, S. M.; SEVIOUR, R. J.; MCDUGALL, B. M. Noncellulolytic fungal β-glucanases: their physiology and regulation. *Enzyme and Microbial Technology*, Guildford, v. 15, p. 178-190, 1993.
- PLANAS, A. Bacterial 1,3-1,4-β-glucanases: structure, function and protein engineering. *Biochimica et Biophysica Acta*, Amsterdam, v. 1543, p. 361-382.
- POZO-BAYÓN, M. A.; ANDÚJAR-ORTIZ, I.; MORENO-ARRIBAS, M. V. Scientific evidences beyond the application of inactive dry yeast preparations in winemaking. *Food Research International*, Ottawa, v. 42, p. 754-761, 2009.
- RANA, D. S.; THÉODORE, K.; NAIDU, S. N.; PANDA, T. Stability and kinetics of β-1,3-glucanase from *Trichoderma harzianum*. *Process Biochemistry*, Braking, v. 39, p. 149-155, 2003.
- RAPP, P. 1,3-β-glucanase, 1,6-β-glucanase and β-glucosidase activities of *Sclerotium glaucum*: synthesis and properties. *Journal of General Microbiology*, London, v. 135, p. 2847-2858, 1989.
- RAST, D. M.; BAUMGARTNER, D.; MAYER, C.; HOLLENSTEINA, G. O. Cell wall-associated enzymes in fungi. *Phytochemistry*, Oxford, v. 64, p. 339-366, 2003.
- RYCROFT, C. E.; JONES, M. R.; GIBSON, G. R.; RASTALL, R. A. Fermentation properties of gentio-oligosaccharides. *Letters in Applied Microbiology*, Oxford, v. 32, p. 156-161, 2001.
- RUIZ-HERRERA, J. Biosynthesis of β-glucans in fungi. *Antonie van Leeuwenhoek*, Wageningen, v. 60, p. 73-81, 1991.
- SÁNCHEZ, A.; VILLANUEVA, J. R.; VILLA, T. G. Effect of tunicamycin on exo-1,3-beta-D-glucanase synthesis and secretion by cells and protoplasts of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of General Microbiology*, London, v. 128, p. 3051-3060, 1982.

- SANTOS, A.; SÁNCHEZ, A.; MARQUINA, D. Yeasts as biological agents to control *Botrytis cinerea*. *Microbiological Research*, Jena, v. 159, p. 331-338, 2004.
- SANZ, M. L.; CÔTÉ, G. L.; GIBSON, G. R.; RASTALL, R. A. Selective fermentation of gentiobiose-derived oligosaccharides by human gut bacteria and influence of molecular weight. *FEMS Microbiology Ecology*, Amsterdam, v. 56, p. 383-388, 2006.
- SEVIOUR, R.; STASINOPOULOS, S.; AUER, D.; GIBBS, P. Production of pullulan and other exopolysaccharides by filamentous fungi. *Critical Reviews in Biotechnology*, Boca Raton, v. 12, p. 279-298, 1992.
- SHODA, S.; FUJITA, M.; KOBAYASHI, S. Glycanase-catalyzed synthesis of non-natural oligosaccharides. *Trends in Glycoscience and Glycotechnology*, Ibaraki-ken, v. 10, p. 279-289, 1998.
- SIM, S. L.; HANG, Y. D. Sauerkraut brine: a potential substrate for production of yeast  $\alpha$ -glucosidase. *Technology*, New York, v. 29, p. 365-367, 1996.
- STONE, B.; CLARKE, A. *Chemistry and biology of (1,3)- $\beta$ -Glucans*. Melbourne: La Trobe University Press, 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 of Applied Microbiology*, New York, 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*, Weinheim, v. 263, p. 889-895, 1999.
- SUTHERLAND, I. W. Polysaccharases for microbial exopolysaccharides. *Carbohydrate Research*, Amsterdam, 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, and Biochemistry*, Tokyo, 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*, Washington, v. 56, p. 1442-1450, 2008.
- TINGLE, M. A.; HALVORSON, H. O. A comparison of  $\beta$ -glucanase and  $\beta$ -glucosidase in *Saccharomyces lactis*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Enzymology*, Amsterdam, v. 250, p. 165-171, 1971.
- 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*, Washington, v. 64, 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*, New York, v. 62, p. 140-150, 2003.
- VILLA, T. G.; NOTARIO, V.; BENÍTEZ, T.; VILLANUEVA, J. R. Synthesis of fl-Glucanase and Other Extracellular Proteins by Cells and Protoplasts of the Yeast *Pichia polymorpha*: effect of 2-Deoxy-D-Glucose. *Archives in Microbiology*, New York, v. 105, p. 335-337, 1975.
- 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*, New York, v. 105, p. 1170-1177, 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*, Berlin, 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*, Amsterdam, v. 70, p. 353-361, 1998.
- 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*, Amsterdam, v. 49, p. 113-120, 2008.
- ZOBEL, H. F. Molecules to granules: a comprehensive starch review. *Starch*, Weinheim, v. 40, p. 44-50, 2006.

Recebido em 17 julho, 2010 – Received on July 17, 2010.  
Aceito em 3 Setembro, 2010 – Accepted on September 3, 2010.