



β -1,3 GLUCANASE

PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO DE β -1,3 GLUCANASE

Ilustrações cedidas pelas autoras

RESUMO

O presente trabalho visou o estudo da produção e purificação da β -1,3 glucanase da linhagem *Cellulosimicrobium cellulans* 191. Em fermentador de 5 L, a maior produção de β -1,3 glucanase utilizando 1,5 vvm e 3 vvm, foi respectivamente 0,32 U/mL e 0,72 U/mL, após 24 h de fermentação a 30°C; enquanto que em frascos aletados agitados a produção de β -1,3 glucanase foi de 1,12 U/mL após 24 h a 30°C. A β -1,3 glucanase (45 KDa) foi purificada 11,92 vezes com rendimento de 25% em resina de troca iônica DEAE-Sephadex A50.

Palavras-chave: β -1,3 glucanase, *Cellulosimicrobium cellulans* 191, produção, purificação.

SUMMARY

The aim of this work was to study the production and purification of β -1,3 glucanases from *Cellulosimicrobium cellulans* 191 strain. In a 5 L fermenter, the highest production of β -1,3 glucanase with 1.5 vvm and 3.0 vvm were 0.32 U/mL and 0.72 U/mL respectively, after 24 h of fermentation at 30°C; while in shaken flasks was produced 1.12 U/mL after 24 h at 30°C. The β -1,3

glucanase (45 KDa) was purified 11.92 times with a yield of 25% using a DEAE-Sephadex A50 ion-exchange resin.

Key-words: β -1,3 glucanase, *Cellulosimicrobium cellulans* 191, production, purification.

INTRODUÇÃO

A β -1,3 glucana é o componente encontrado em maior quantidade na parede celular de leveduras (Kim, *et al.* 2004), correspondendo juntamente com a β -1,6 glucana, 48 a 60% da estrutura (Klis, 1994).

A camada de β -glucana corresponde à camada interna da parede celular de leveduras e pode ser hidrolisada por β -1,3 glucanases para diferentes finalidades. Uma grande quantidade de produtos podem ser isolados e purificados da célula microbiana com o auxílio da lise enzimática como, por exemplo: peptídeos, polissacarídeos, proteínas recombinantes, ácidos nucleicos, pigmentos, enzimas, lipídeos, entre outros. Além do potencial de aplicação na preparação de protoplastos, fusão celular e transformação de leveduras, ressalta-se sua aplicação na preparação do polissacarídeo glucana, pré-tratamento para lise mecânica de células em Dyno-Mill, produção de extrato de levedura e lise de microrganismos (Fleuri e Sato, 2005). As β -1,3 glucanases, podem ser produzidas por diferentes microrganismos. Rowley e Bull (1977) estudaram a produção do complexo enzimático extracelular contendo β -1,3 glucanase produzido pelo microrganismo *Arthrobacter* sp. Ferro (2002) estudou a produção de β -1,3 glucanase pela linhagem *Cellulosimicrobium cellulans* 191, assim como Soares (2002) e Fleuri (2003 e 2006). Beshai *et al.* (2003) descreveram a produção de β -1,3 glucanase de *Bacillus* sp. utilizando uma linhagem de *Escherichia coli* recombinante em fermentador.

As preparações enzimáticas de β -1,3 glucanases obtidas por microrganismos são encontradas na forma bruta e na forma parcialmente purificada. Enzimas em estado impuro podem ser aplicadas para finalidades específicas e em muitos casos são requeridas por serem de fácil obtenção e de baixo custo. As enzimas purificadas apresentam a vantagem de estarem livres de outras enzimas e substâncias que interferem nos substratos desviando as reações específicas. Além disso, comercialmente são muito mais valorizadas. Muitas β -1,3 glucanases, obtidas por fermentação de microrganismos, têm sido purificadas, entre elas: a β -1,3 glucanase (27,19 KDa) de *Oer-*

Luciana Francisco Fleuri

Dra. em Ciência de Alimentos pela Universidade Estadual de Campinas e Profa. da Universidade Metodista de Piracicaba

luciana@fea.unicamp.br

Hélia Harumi Sato

Profa. Titular da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas

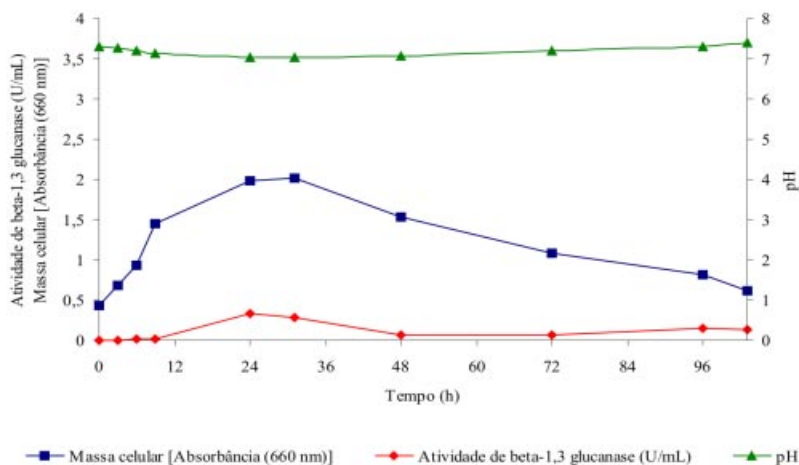


Figura 1. Estudo da produção de β -1,3 glucanase em fermentador de 5 L, em meio de cultivo contendo 1% de parede celular de levedura em tampão fosfato 0,2 M, pH 7,5 a 30°C, 200 rpm e 1,5 vvm

skovia xanthineolytica LL-G109 (Andrews e Asenjo, 1987); β -1,3 glucanase (12 KDa) de *Oerskovia xanthineolytica* LL-G109 (Ventom e Asenjo, 1990); β -1,3 glucanase (82 KDa) lítica de *Rarobacter faecitabidus* (Shimoi *et al.*, 1991); β -1,3 glucanase (40 KDa) de *Oerskovia xanthineolytica* TK-1 (Saeki *et al.*, 1994); β -1,3 glucanase de *Oerskovia xanthineolytica* LL-G109 (Parado *et al.*, 1996; Ferrer *et al.*, 1996); endo-1,3- β glucanase (17 KDa) de *Trichoderma harzianum* (Thrane *et al.*, 1997); β -1,3 glucanase (29 KDa) de *Trichoderma harzianum* (Noronha e Ulhoa, 2000); β -1,3 glucanases (17,1 KDa e 57 KDa) da linhagem *Cellulosimicrobium cellulans* 191 (Ferro, 2002; Soares, 2002); β -1,3 glucanase alcalina (71 KDa) de *Bacillus clausii* NM1 (Miyaniishi *et al.*, 2003); β -1,3 glucanase (83,1 KDa) de *Thichoderma asperellum* (Bara *et al.*, 2003).

O presente estudo visou a produção da β -1,3 glucanase pela bactéria *Cellulosimicrobium cellulans* 191 em frascos agitados e em fermentador e a purificação em coluna de troca iônica.

MATERIALE MÉTODOS

Produção de β -1,3 glucanase em frascos agitados

A β -1,3 glucanase foi produzida, em frascos agitados, em meio de cultivo composto por 2,0 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,2 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 10 g/L de parede celular de levedura em tampão fosfato 0,2 M, pH 7,5. Os frascos foram incubados a 30°C, 200 rpm durante 24 h.

Para a preparação do pré-inóculo, uma alçada da cultura de 24 h do microrganismo em tubo inclinado de meio TYM foi inoculada separadamente em frascos Erlenmeyers aletados de 500 mL contendo 100 mL do meio de cultivo. Aliquotas de 10 mL de pré-inóculo foram transferidas asepticamente para frascos Erlenmeyers de 500 mL contendo 90 mL do mesmo meio de cultivo. Os frascos foram incubados a 30°C, a 200 rpm durante 24 h. Após incubação, o meio de cultivo foi centrifugado a 7.840 g durante 10 min a 5°C e os sobrenadantes utilizados como preparação enzimática bruta.

Produção de β -1,3 glucanase em fermentador de 5 L

A produção de β -1,3 glucanases pela linhagem *C. cellulans* 191 foi estudada em fermentador de 5 L no meio de cultivo descrito anteriormente; com 1,5 e 3 vvm de aeração. As condições de pH, temperatura e agitação para a produção de β -1,3 glucanase foram respectivamente, 7,5; 30°C e 200 rpm.

As amostras foram coletadas em diferentes tempos de fermentação. A alteração do pH do meio de cultivo foi determinada com o auxílio de potenciômetro. O crescimento celular foi estimado indiretamente através da medida de absorbância a 660 nm.

Determinação da atividade de β -1,3 glucanase

A atividade de β -1,3 glucanase foi determinada como descrito por Saeki *et al.* (1994) e Santos (2000). A mistura de 250 μ L de solução enzimá-

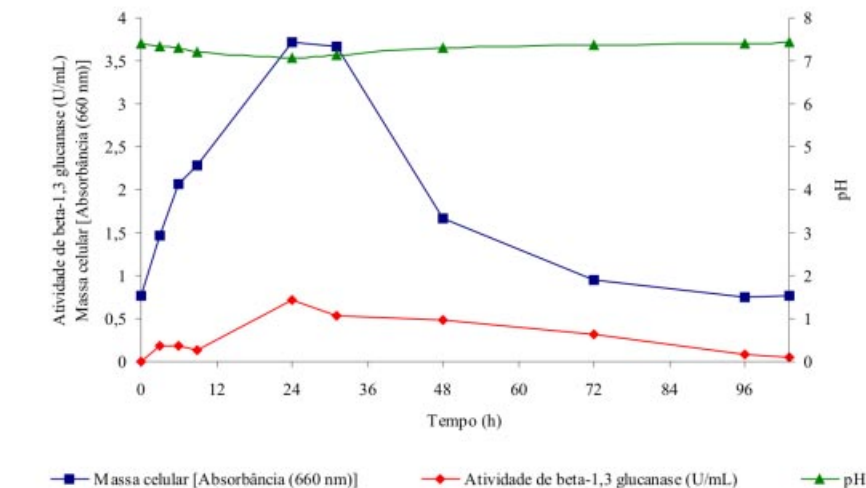


Figura 2. Estudo da produção de β -1,3 glucanase em fermentador de 5 L, em meio de cultivo contendo 1% de parede celular de levedura em tampão fosfato 0,2 M, pH 7,5 a 30°C, 200 rpm e 3,0 vvm

tica e 250 μ L de solução 1,0% de laminarina em tampão acetato de sódio 0,1 M, pH 5,5 foi incubada a 55°C por 30 min. A reação foi interrompida por aquecimento a 100°C por 5 min. Os açúcares redutores foram determinados pelo método de Somogyi (1952) utilizando glicose como açúcar padrão. Para controle foram determinados os açúcares redutores presentes na solução enzimática utilizando água destilada no lugar da solução de laminarina. Para ajuste do espectrofotômetro foi preparado um tubo branco utilizando-se água destilada no lugar da solução de laminarina. Uma unidade de atividade foi definida como a liberação de um μ mol de glicose por minuto por mL de solução enzimática.

Purificação parcial da β -1,3 glucanase

A preparação bruta (20 mL) de β -1,3 glucanase (1,12 U/mL) foi aplicada em coluna de DEAE-Sephadex A50 de 2,5 cm de diâmetro e 40 cm de comprimento, equilibrada em tampão fosfato de sódio 0,01 M, pH 6,5. As proteínas adsorvidas foram eluídas pela aplicação de 250 mL do mesmo tampão usando gradiente de sal (de 0 a 1 M de NaCl). As frações de 5 mL foram coletadas a cada 12,5 min.

O curso de eluição das proteínas foi acompanhado pela medida da absorbância a 280 nm. As frações contendo atividade de β -1,3 glucanase foram reunidas, dialisadas contra água

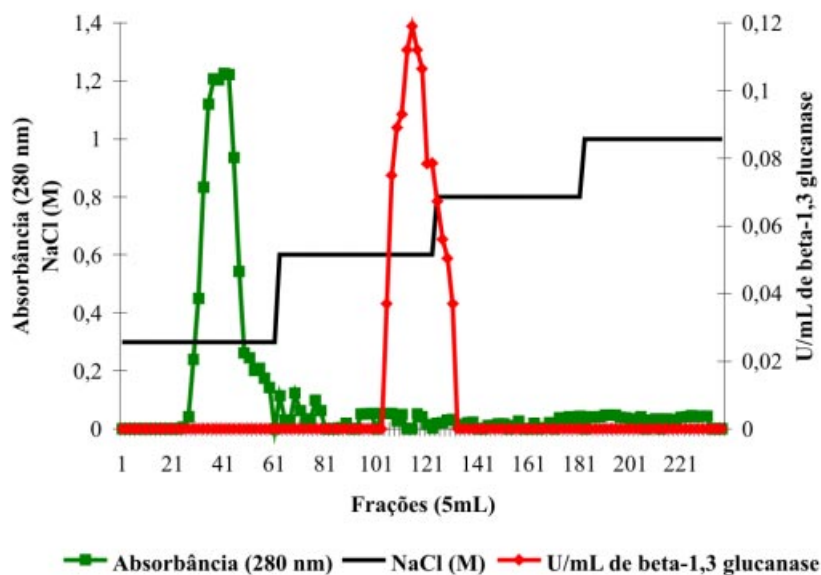
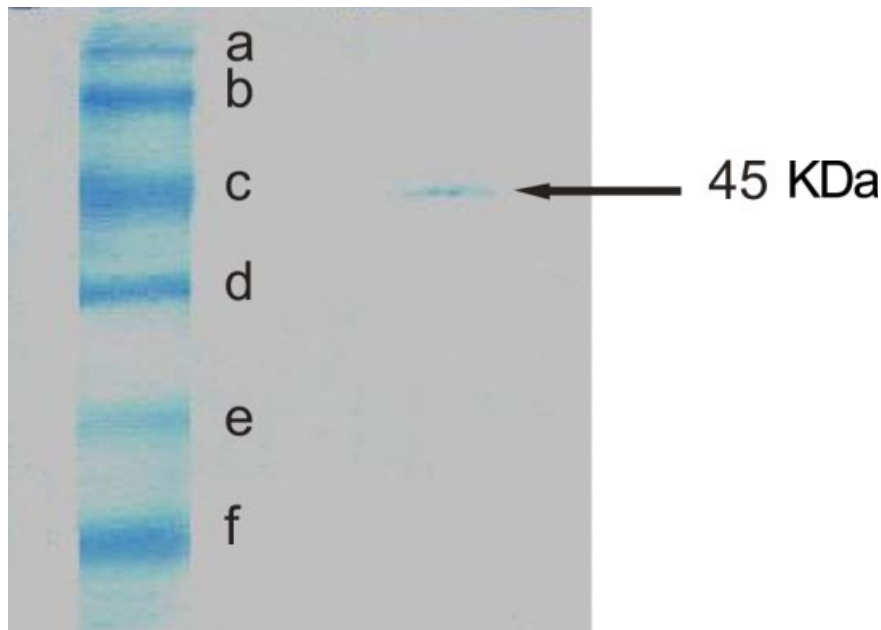


Figura 3. Purificação da β -1,3 glucanase através de cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-Sephadex A50



Padrões β -1,3 glucanase
 Padrões: a- fosforilase b (94,0 KDa); b- albumina bovina (67,0 KDa); c- ovoalbumina (43,0 KDa); d- anidrase carbônica (30,0 KDa); e- inibidor de tripsina de soja (20,1 KDa); f- α -lactoalbumina (14,0 KDa)

Figura 4. Eletroforese da β -1,3 glucanase purificada em gel SDS-poliacrilamida

destilada e liofilizadas. A concentração de proteína das soluções enzimáticas foi determinada como descrito por Lowry *et al.* (1951), usando ovoalbumina como padrão. A atividade de β -1,3 glucanase foi determinada como descrito anteriormente.

Eletroforese da β -1,3 glucanase em gel SDS-poliacrilamida

As frações com atividade de β -1,3 glucanase foram concentradas por liofilização, ressuspensas e aplicadas em gel de dodecil sulfato de sódio-poliacrilamida a 12% (SDS-PAGE), como descrito por Laemmli (1970). A eletroforese foi desenvolvida em duas etapas: a 80 V por aproximadamente 30 min e a 120 V por aproximadamente 2 h.

Após a corrida eletroforética, os géis foram lavados três vezes por 20 min com uma solução fixadora de etanol (30%) e ácido acético (10%) em água destilada. Em seguida, o gel foi corado com Coomassie Blue R250.

A mistura padrão de proteínas, utilizada como parâmetro para determinar a massa molecular da β -1,3 glucanase, continha fosforilase b (94,0 KDa), albumina bovina (67 KDa), ovoalbumina (43,0 KDa), anidrase carbônica (30,0 KDa), inibidor de tripsina de soja (20,1 KDa) e α -lactoalbumina (14,0 KDa).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Produção de β -1,3 glucanase em frascos agitados

Foi obtido 1,12 U/mL de β -1,3 glucanase através da fermentação da linhagem *C. cellulans* 191, em

frascos agitados aletados, em meio de cultivo em tampão fosfato 0,2 M, pH 7,5, a 30°C e 200 rpm, após 24 h de incubação.

Produção de β -1,3 glucanase em fermentador de 5 L, em diferentes condições de aeração

A produção de β -1,3 glucanase pela linhagem *C. cellulans* 191 em meio de cultivo contendo 1% de parede celular de levedura em tampão fosfato 0,2 M, pH 7,5, em fermentador de 5 L, foi estudada em diferentes tempos de fermentação; a 30°C, 200 rpm e 1,5 e 3 vvm de aeração.

Na fermentação da linhagem *C. cellulans* 191 em fermentador de 5 L com 1,5 vvm de aeração, foi obtida máxima produção de β -1,3 glucanase após 24 h de fermentação (0,34 U/mL). O pH do meio de cultivo praticamente não apresentou variação durante a fermentação.

No cultivo do microrganismo em fermentador de 5 L com 3 vvm de aeração, a β -1,3 glucanase foi produzida no final da fase exponencial de crescimento atingindo atividade máxima de 0,72 U/mL de β -1,3 glucanase após 24 h de fermentação. O pH do meio de cultivo também não apresentou variação significativa durante a fermentação.

O presente estudo demonstra que maiores aerações são favoráveis para a produção da enzima. O aumento da aeração de 1,5 vvm para 3 vvm na produção de β -1,3 glucanase pela linhagem *C. cellulans* 191 provocou um aumento de aproximadamente 2,12 vezes na

atividade enzimática. No estudo com aeração de 1,5 vvm foi obtido 0,34 U/mL de β -1,3 glucanase após 24 h de fermentação do microrganismo *C. cellulans* 191, indicando uma produção aproximadamente 3,1 vezes maior que a obtida nos estudos descritos por Ferro (2002); enquanto que no estudo de produção com aeração de 3 vvm, foi obtida uma produção 5 vezes maior que a obtida por Ferro (2002).

Nota-se também que a produção de β -1,3 glucanase em frascos aletados foi superior 1,5 vezes quando comparada à produção em fermentador. O tipo de agitação em frascos aletados e em fermentador são diferentes e parecem interferir diretamente na produção da enzima pela bactéria *C. cellulans* 191.

Resultados similares foram relatados por Beshay *et al.* (2003) que estudou a produção de β -1,3 glucanase por *Bacillus* sp. utilizando uma linhagem de *E. coli* recombinante. Foi obtido uma produção enzimática 1,03 vezes menor em fermentador de 3 L, quando comparado com o estudo de produção da enzima em frascos agitados.

Purificação parcial de β -1,3 glucanase

Em estudo preliminar foi testado o fracionamento enzimático por precipitação com sulfato de amônio (40, 60 e 80% de saturação) da preparação bruta de β -1,3 glucanase obtida através do cultivo de *C. cellulans* 191 em frascos agitados aletados. Nesta etapa a atividade específica da preparação enzimática final foi inferior à atividade específica da preparação enzimática inicial. Dessa forma, para a purificação da β -1,3 glucanase o extrato enzimático bruto foi aplicado diretamente na coluna de troca iônica sem concentração prévia com sal.

A purificação da β -1,3 glucanase da linhagem *C. cellulans* 191 foi conduzida em coluna de DEAE-Sephadex A50 equilibrada em tampão fosfato 0,01 M, pH 6,5. A enzima foi eluída da resina utilizando tampão contendo 0,6 M de NaCl. Foi obtido um pico de β -1,3 glucanase (Figura 3), a qual foi purificada 11,92 vezes com um rendimento de 25% (Tabela 1).

Diferentes métodos de purificação de β -1,3 glucanases têm sido relatados. A β -1,3 glucanase de *Oerskovia xanthineolytica* TK-1 foi purificada em coluna de DEAE-Sephacel, DEAE-Toyopearl 650M e Bio-Gel P-2. A enzima foi purificada 21 vezes e apresentou massa molecular estimada em 40 KDa (Saeki *et al.*, 1994).

A β -1,3 glucanase de *Oerskovia xanthineolytica* LL-G109 foi purificada em coluna HR 16/10 Q-Sepharose FF. Em eletroforese em gel SDS, a enzima apresentou massa molecular de aproximadamente 27,19 KDa (Parrado *et al.*, 1996). Ferrer *et al.* (1996) prosseguiram os procedimentos de purificação desta enzima através de ultrafiltração e duas colunas consecutivas de HR 16/10 Q-Sepharose FF em diferentes valores de pH (pH 8,5 e 5,0).

Thrane *et al.* (1997) purificou uma endo- β -1,3 glucanase do filtrado de uma cultura de *Trichoderma harzianum* através de filtração em gel utilizando coluna Sephacryl S-300R e

Tabela 1. Purificação da β -1,3 glucanase em coluna de DEAE-Sephadex A50

Extratos	VOLUME (mL)	U/mL	U total	Proteínas (mg/mL)	Proteínas Totais (mg)	Atividade Específica (U/mg)	Rendimento (%)	Fator de Purificação
Bruto	20	1,12	22,4	9,18	183,6	0,12	100	1
Purificado	50	0,112	5,6	0,078	3,9	1,43	25	11,92

focalização isoeletrica, sendo obtido fator de purificação de 12,5 vezes e rendimento de 13%. Em eletroforese em gel SDS, a enzima apresentou massa molecular em torno de 17 KDa.

Noronha e Ulhoa (2000) purificaram uma β -1,3 glucanase de *Trichoderma harzianum* através de várias etapas cromatográficas utilizando coluna Sephacryl S-200, coluna Fenil-Sepharose e coluna CM-Sepharose. A enzima foi purificada 65 vezes e foi obtido 0,32% de rendimento. Através de SDS-PAGE a massa molecular foi estimada em aproximadamente 29 KDa.

Uma β -1,3 glucanase da linhagem *Cellulosimicrobium cellulans* de 17,1 KDa foi purificada e caracterizada. A β -1,3 glucanase foi purificada do sobrenadante do meio de cultivo através de ultrafiltração e cromatografia em coluna de CM-Sepharose CL6B (purificação de 78,2 vezes e rendimento de 5,53%) (Ferro, 2002). Outra β -1,3 glucanase de massa molecular de 57 KDa da linhagem *Cellulosimicrobium cellulans* 191 foi purificada do sobrenadante do meio de cultivo através de ultrafiltração (membrana de exclusão de 10 KDa) e cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-Sepharose equilibrada em pH 5,5. A enzima foi purificada 1,18 vezes quanto à atividade de β -1,3 glucanase e 5,1 vezes quanto à atividade de liticase (Soares, 2002).

A β -1,3 glucanase alcalina produzida por *Bacillus clausii* NMI foi purificada 124 vezes por precipitação com sulfato de amônio, cromatografia de troca iônica com DEAE-Sepharose FF e filtração em gel com Sephacryl S-200HR com rendimento de 41,8%. A massa molecular da enzima purificada foi estimada em 71 KDa por eletroforese em gel de SDS-PAGE (Miyaniishi *et al.*, 2003).

Thichoderma asperellum produz pelo menos duas β -1,3 glucanases extracelulares na presença de parede celular de *Rhizoctonia solani* como indutor. A β -1,3 glucanase foi purificada por filtração em gel em coluna Sephacryl S-100 e cromatografia de troca iônica em coluna de Q-Sepharose Fast Flow, sendo obtido fator de purificação de 35,7 vezes e rendimento de 9,5%. A massa molecular da exo- β -1,3 glucanase purificada foi estimada em 83,1 KDa utilizando eletroforese SDS-PAGE (Bara *et al.*, 2003).

No presente estudo a β -1,3 glucanase (45 KDa em SDS-PAGE) da linhagem *C. cellulans* 191 pôde ser purificada através de uma única etapa cromatográfica, utilizando a coluna de troca iônica DEAE-Sephadex A50.

CONCLUSÕES

A maior produção de β -1,3 glucanase (1,12 U/mL) foi obtida através do cultivo da bactéria *C. cellulans* 191 em frascos agitados aletados, em

comparação com a produção em fermentador. Em fermentador a maior produção da enzima foi obtida com 3 vvm de aeração, em comparação com a produção utilizando 1,5 vvm. A β -1,3 glucanase foi purificada 11,92 vezes em coluna de DEAE-Sephadex A50 com rendimento de 25% e apresentou massa molecular de 45 KDa em SDS-PAGE.

REFERÊNCIAS

Andrews, B. A.; Asenjo, J. A. Continuous-culture studies of synthesis and regulation of extracellular β -1,3 glucanase and protease enzymes from *Oerskovia xanthineolytica*. *Biotechnol. Bioeng.* v. 30, p. 628, 1987.

Andrews, B. A.; Asenjo, J. A. Enzymatic lysis and disruption of microbial cells. *Tibtech.* v. 5, p. 273, 1987.

Bara, M. T. F.; Lima, A. L.; Ulhoa, C. J. Purification and characterization of an exo- β -1,3 glucanase produced by *Trichoderma asperellum*. *FEMS Microbiol. Lett.* v. 219, p. 81, 2003.

Beshay, U.; El-Enshasy, H.; Ismail, I. M. K.; Moawad, H.; Ewa, W.; Abd-El-Ghany, S. β -Glucanase production from genetically modified recombinant *Escherichia coli*: Effect of growth substrates and development of a culture medium in shake flasks and stirred tank bioreactor. *Process Biochem.* v. 39, p. 307, 2003.

Ferrer, P.; Hedegaard, L.; Halkier, T.; Diers, I.; Savva, D.; Asenjo, J. A. Molecular cloning of a lytic β -1,3 glucanase gene from *Oerskovia xanthineolytica* LLG109. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* v. 782, p. 555, 1996.

Ferro, L. A. Produção, Purificação e Caracterização da enzima β -1,3 glucanase de *Cellulomonas cellulans* YLM-B191-1 e ação da enzima na parede celular de leveduras. *Tese de Doutorado* - FEA - Universidade Estadual de Campinas, Brasil, 2002, p. 175.

Fleuri, L. F. β -1,3 glucanases, protease e quitinases: produção, purificação e aplicação. *Tese de Doutorado* - FEA - Universidade Estadual de Campinas, Brasil, 2006, p. 95.

Fleuri, L. F. Produção de β -1,3 glucanases, proteases líticas e quitinases por microrganismos e aplicação na lise de leveduras. *Dissertação de Mestrado* - FEA - Universidade Estadual de Campinas, Brasil, 2003, 141 p.

Fleuri, L. F.; Sato, H. H. Produção, purificação, clonagem e aplicação de enzimas líticas. *Quim. Nova.* v. 28, n. 5, p. 871, 2005.

Klis, F. M. Review: Cell wall assembly in yeast. *Yeast.* v.10, p.851, 1994.

Kim, K. S.; Chang, J. E.; Yun, H. S. Estimation of a soluble β -glucan content of yeast cell wall by the sensitivity to Glucanex 200G treatment. *Enzyme Microb. Technol.* v. 35, n.6, p.672, 2004.

Laemmler, U. K. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* v. 227, p. 680, 1970.

Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, L. A.; Randall, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* v. 193, p. 265, 1951.

Miyaniishi, N.; Hamada, N.; Kobayashi, T.; Imada, C.; Watanabe, E. Purification and characterization of a novel extracellular β -1,3 glucanase produced by *Bacillus clausii* NMI isolated from ezo abalone *Haliotis discus hannai*. *J. Biosci. Bioeng.* v. 95, p. 45, 2003.

Noronha, E. F.; Ulhoa, C. J. Characterization of a 29-KDa β -1,3 glucanase from *Trichoderma harzianum*. *Microbiol. Lett.* v. 183, p. 119, 2000.

Parrado J.; Escudero, P. R.; Conejero-Lara, F.; Kotik, N.; Ponting, C. P.; Asenjo, J. A.; Dobson, C. M. Molecular characterization of a thermoactive β -1,3-glucanase from *Oerskovia xanthineolytica*. *Biochim. Biophys. Acta.* v. 1296, p. 145, 1996.

Rowley, B. I., Bull, A. T. Isolation of a yeast-lysing *Arthrobacter* species and the production of the lytic enzyme complex in batch and continuous-flow fermentors. *Biotech. Bioeng.* v. 19, p.879-899, 1977.

Saeki, K.; Iwata, J.; Yamazaki, S.; Watanabe, Y.; Tamai, Y. Purification and characterization of a yeast lytic β -1,3-glucanase from *Oerskovia xanthineolytica* TK-1. *J. Ferment. Bioeng.* v. 78, p. 407, 1994.

Santos, L. F. Caracterização bioquímica da protease lítica produzida por *Cellulomonas cartae* n^o 191 e estudo da lise enzimática de leveduras. *Dissertação de Mestrado* - FEA - Universidade Estadual de Campinas, Brasil, 2000, p. 71.

Shimoi, H.; Muranaka, Y.; Sato, S.; Saito, K.; Tadenuma, M. Purification of the enzymes responsible for the lysis of yeast cell by *Rarobacter faecitabidus*. *Agr. Biol. Chem.* v. 55, p. 371, 1991.

Soares, G. A. M. Enzimas que lisam a parede celular de leveduras - Clonagem e sequenciamento do gene da β -1,3 glucanase lítica de *Cellulomonas cartae* 191. *Tese de Doutorado* - FEA - Universidade Estadual de Campinas, Brasil, 2002, p. 113.

Somogyi, N. A new reagent for the determination of sugars. *J. Biol. Chem.* v. 195, p. 19, 1952.

Thrane, C.; Tronsmo, A.; Jensen, D. F. Endo-1,3- β -glucanase and cellulase from *Trichoderma harzianum*: purification and partial characterization, induction of biological activity against plant pathogenic *Pythium* spp. *Eur. Plant Pathol.* v. 103, p. 331, 1997.

Ventom, A. M.; Asenjo, J. A. Purification of the major glucanase of *Oerskovia xanthineolytica* LL-G109. *Biotech. Tech.* v. 4, n. 3, p. 165, 1990.