

PRODUÇÃO DE β -GLUCANASES SINTETIZADAS PELA LEVEDURA *Aureobasidium pullulans* 1WA1

Richard Marllon Silva (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Graciette Matioli (Orientador),
e-mail: richard_marllon@hotmail.com

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências Exatas/Maringá, PR.

2120009 – MICROBIOLOGIA, 21202001 - MICROBIOLOGIA APLICADA

Palavras-chave: oligossacarídeos, β -glucanas, glucanases

Resumo:

As β -glucanases são enzimas que hidrolisam ligações glicosídicas entre monossacarídeos formadores de oligossacarídeos e/ou polissacarídeos. A hidrólise enzimática de β -glucanas empregando β -glucanases é uma alternativa na produção de oligômeros com maior potencial de aplicações tecnológicas e biológicas. O objetivo desta pesquisa foi produzir β -glucanases sintetizadas pela levedura *Aureobasidium pullulans* 1WA1 utilizando diferentes fontes de carbono, sendo elas, biomassa fúngica, curdulana, succinoglucana e botriosferana. Por meio do teste de zimograma, no qual é feita a observação do halo de hidrólise, verificou-se que todos os substratos avaliados apresentaram resultados positivos quanto a produção de β -glucanases na presença da levedura *A. pullulans* 1WA1. Entretanto, após várias repetições em meio líquido, não foi possível detectar atividade enzimática no extrato bruto das amostras testadas. Desta maneira, sugere-se que sejam realizados novos estudos para detecção da inexistência ou inativação enzimática, tais como presença de protease, remoção de impurezas e concentração da enzima.

Introdução

As β -glucanases são enzimas que hidrolisam as ligações glicosídicas entre monossacarídeos formadores de oligossacarídeos e/ou polissacarídeos. Diversos micro-organismos são capazes de sintetizar as β -glucanases, principalmente leveduras e fungos filamentosos. Uma das principais formas de uso destas enzimas é na produção de oligossacarídeos bioativos com amplo potencial de aplicabilidade na indústria de alimentos (ZHU et al. 2016).

Estudos realizados por Bauermeister et al. (2015) evidenciam a produção das β -glucanases por uma cepa de *Aureobasidium pullulans* 1WA1, isolada de uva orgânica, quando cultivada em micélio fúngico proveniente de *Botryisphaeria rhodina* MAMB-05. Os resultados demonstraram, uma matéria-prima potencial e menos onerosa para a produção enzimática, visto que β -glucanas fazem parte da composição química do micélio do referido fungo.

As β -glucanases possuem uma especificidade que varia de acordo com a fonte de carbono utilizada pelo micro-organismo na indução de sua produção. Uma vez que a produção de β -glucanases pode ser influenciada por componentes do meio de cultivo, como o tipo e concentração da fonte de carbono, é fundamental o estudo e atenção na escolha do substrato utilizado para a indução de sua síntese. Outros fatores do meio de cultivo também podem influenciar na síntese das enzimas, como a concentração de oxigênio e velocidade de aeração (VÁZQUEZ-GARCIDUEÑAS et al., 1998). Considerando o substrato indutor da produção de β -glucanases como um dos principais fatores influenciadores da produção enzimática, esta pesquisa teve como objetivo a produção de β -glucanases sintetizadas pela levedura *Aureobasidium pullulans* 1WA1 por meio de diferentes fontes de carbono indutoras, sendo eles, biomassa fúngica e os exopolissacarídeos curdlana, succinoglucana e botriosferana.

Materiais e métodos

Micro-organismo e substratos

Para a síntese enzimática foi utilizada a levedura *Aureobasidium pullulans* 1WA1 concedida pela Dr^a Aneli de Melo Barbosa Dekker, Prof^a Sênior do Departamento de Química da Universidade Estadual de Londrina (PR). Para a produção de β -glucanases foram utilizados quatro substratos distintos como fonte de carbono, sendo eles: curdlana, succinoglucana, botriosferana e biomassa fúngica, estas duas últimas, foram produzidas no Departamento de Química da UEL utilizando o fungo *Botryosphaeria rhodina* MAMB 05.

Detecção da atividade enzimática em meio sólido – Zimograma

Os substratos foram avaliados, independentemente, quanto à produção de β -glucanases na presença da levedura *A. pullulan* 1WA1, por meio da observação de halo de hidrólise em placa de Petri (BAUERMEISTER et al. 2015). A metodologia consiste em avaliar, qualitativamente, a produção do complexo gluconolítico pela levedura *A. pullulan* 1WA1 na presença dos substratos específicos.

Produção e recuperação da β -glucanases

A produção de β -glucanases se deu por meio do cultivo de *A. pullulans* em meio líquido em frascos de Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de substrato específico (0,5%) mais meio mínimo de Vogel e incubados a 28 °C em um agitador rotativo a 180 rpm por 96 h. O extrato enzimático bruto foi obtido por meio de centrifugação a 7000 g por 10 min a 4 °C (BAUERMEISTER et al. 2015).

Determinação da atividade enzimática

Para a determinação da atividade das β -glucanases utilizou-se o método de quantificação dos açúcares redutores liberados na hidrólise do substrato *Laminaria digitata*, conforme descrito por Bauermeister et al (2015). E se deu incubando o substrato a 0,4% juntamente com tampão acetato de sódio pH

5,0 e o extrato enzimático bruto a 37 °C por 60 min, sendo interrompida pela adição de solução alcalina de NaOH 1,0 mol.L⁻¹ e então realizada a leitura do açúcar redutor pelo método do cuproarsenato descrito por Somogyi e Nelson. A unidade de atividade de β-glucanase foi definida como o número de μmol de açúcares redutores liberados por minuto por mL de extrato enzimático.

Resultados e Discussão

Todos os substratos avaliados, qualitativamente pela técnica de zimograma, apresentaram resultado positivo quanto à produção de β-glucanases na presença da levedura *A. pullulan* 1WA1, por meio da observação do halo de hidrólise, Fig. 1. A presença de crescimento fúngico, em todas as condições de ensaio, sugeriu que o micro-organismo estudado foi capaz de expressar as enzimas necessárias à degradação dos polissacarídeos de glucanas. Uma grande variedade de fungos filamentosos e leveduriformes foram relatados como produtores de β-glucanases extracelulares, entre eles a levedura *A. pullulan* (BAUERMEISTER et al. 2015).

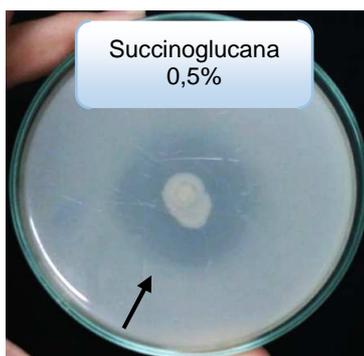


Figura 1: Zimograma demonstrando atividade enzimática de β-glucanases ao redor da colônia de *A. pullulans* 1WA1 (halo indicado pela seta), em ágar-succinoglucana 0,5% em placa de Petri após 120 horas de incubação.

Conforme sugerido pelo teste do zimograma, todos os substratos seguiram para a etapa de produção do complexo enzimático bruto. Entretanto, não foi possível detectar atividade enzimática por meio do método dos açúcares redutores em nenhum dos tratamentos avaliados, resultado este não condizente com o descrito na literatura, na qual Bauermeister et al. (2017) relata a produção de $0,227 \pm 0,009$ U.mL⁻¹ de açúcares redutores em um tratamento utilizando biomassa fúngica como substrato sob mesmas condições.

As preparações enzimáticas microbianas são encontradas tanto na forma bruta, como na parcialmente purificada e purificada. A principal vantagem da aplicação das enzimas no estado bruto é o baixo custo de obtenção, quando comparado com o purificado, contudo, o extrato bruto pode conter componentes produzidos durante a multiplicação microbiana e estes podem vir a inativar a ação das enzimas, exemplos são o excesso de glicose ou outra fonte de carbono facilmente acessível que pode reduzir ou até mesmo

inibir a síntese enzimática (DONZELLI; SIEBERT; HARMAN, 2005). Estes resultados indicam que pode haver fatores que influenciaram negativamente na produção do complexo enzimático, sendo que uma das possíveis hipóteses é a presença de protease no meio líquido, o que levaria a hidrólise das β -glucanases.

Conclusões

Todos os substratos testados pelo método do zimograma expressaram resultados positivos como indutores de β -glucanases pela levedura *A. pullulans* 1WA1. Entretanto, não foi possível determinar quantitativamente a síntese enzimática em nenhum dos tratamentos realizados em meio líquido. Sugere-se que novos estudos sejam realizados para identificação da inexistência ou inativação enzimática, tais como presença de protease, remoção de impurezas e concentração da enzima por meio da técnica de ultrafiltração e liofilização do extrato enzimático bruto.

Agradecimentos

Agradeço à orientadora Graciette Matioli, à doutoranda Hâmara Milaneze e ao CNPq, pelo incentivo e oportunidade.

Referências

BAUERMEISTER, A. et al. **β -(1 \rightarrow 3)-glucanolytic yeasts from Brazilian grape microbiota: Production and characterization of β -glucanolytic enzymes by *Aureobasidium pullulans* 1WA1 cultivated on fungal mycelium.** Journal of agricultural and food chemistry, v. 63, n. 1, p. 269-278, 2015.

BAUERMEISTER, A. et al. **Filamentous fungal biomass as inducer of extracellular β -1,3-glucanases and β -glucosidases by *Aureobasidium pullulans* 1WA1.** Short Communication, v. 5, p. 138-147, 2017.

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 Microb. Technol, v. 37, p. 82-92, 2005.

VÁZQUEZ-GARCIDUEÑAS, S. et al. **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.

ZHU, F., DU, B., XU, B. **A critical review on production and industrial applications of beta-glucans.** Food Hydrocoll. v. 52, p. 275-288, 2016.