

PRODUÇÃO DE β -1,3-GLUCANASES SINTETIZADAS POR *Trichoderma harzianum* Rifai NA PRESENÇA DE DIFERENTES SUBSTRATOS

Richard Marllon Silva (PIBIC/CNPq/FA/Uem), Hâmara Milaneze de Souza Zaniboni (Doutoranda), Graciette Matioli (Orientadora), e-mail: gracietteuem@gmail.com.

Universidade Estadual de Maringá/Centro de Ciências da Saúde/Maringá, PR.

21200009 – MICROBIOLOGIA, 21202001 - MICROBIOLOGIA APLICADA

Palavras-chave: enzimas; hidrólise; oligossacarídeos.

Resumo:

As β -glucanases são enzimas capazes de hidrolisar as ligações glicosídicas entre os monossacarídeos formadores de oligossacarídeos e/ou polissacarídeos, apresentando amplas aplicações biotecnológicas. Atualmente a despolimerização das β -glucanas tem sido realizada por hidrólise ácida, porém esta técnica resulta em uma maior quantidade de mono-, di- e trissacarídeos, além de produtos colaterais como furfurais. Em vista disso, a hidrólise enzimática de β -glucanas demonstra ser uma alternativa na produção de oligômeros de maior massa molecular, os quais apresentam maior potencial de aplicações biotecnológicas. Esta pesquisa teve como objetivo produzir β -1,3-glucanases sintetizadas pelo fungo filamentosso *Trichoderma harzianum* Rifai utilizando diferentes substratos, e comparar sua atividade hidrolítica com a enzima comercial Viscozyme L® (Novozymes). Os substratos utilizados foram: biomassa fúngica e os exopolissacarídeos curdlana e succinoglucana. Os resultados mostraram que aconteceu a produção de β -1,3-glucanases pelo fungo *T. harzianum* Rifai em meio líquido, e a síntese enzimática ocorreu frente a todos os substratos avaliados, sendo que a biomassa fúngica foi o melhor indutor.

Introdução

As enzimas β -glucanases são capazes de hidrolisar ligações glicosídicas entre monossacarídeos formadores de oligossacarídeos e/ou polissacarídeos. Uma das principais aplicações biotecnológicas destas enzimas é na produção de oligossacarídeos bioativos, tornando-se uma ferramenta importante para a indústria alimentícia (ZHU et al., 2016).

O complexo enzimático pode ser produzido por diversos microrganismos (ZHU et al., 2016), sendo o fungo filamentosso *Trichoderma harzianum* Rifai descrito como um excelente sintetizador de β -glucanases, e sua produção aumenta significativamente quando o fungo é exposto a um meio de cultivo contendo β -(1,3)(1,6)-glucanas extracelulares (GIESE et al., 2011).

A produção e o tipo de β -glucanases podem ser afetadas pela concentração e composição da fonte de carbono indutora no meio de cultivo, sendo este o principal fator influenciador de sua produção. Desta forma, esta pesquisa teve como objetivo a produção de β -1,3-glucanases sintetizadas pelo fungo filamentosso *T. harzianum*

Rifai utilizando diferentes fontes de carbono indutoras, sendo elas, biomassa fúngica e os exopolissacarídeos curdlana, succinoglucana e succinoglucana mais glicose. Também foi feita uma comparação da atividade enzimática com a enzima comercial Viscozyme L® (Novozymes).

Materiais e métodos

Microrganismos e substratos

Para síntese enzimática foi utilizado o fungo filamentosso *T. harzianum* Rifai concedido pela Dr^a. Aneli de Melo Barbosa Dekker, Prof.^a Sênior do Departamento de Química da Universidade Estadual de Londrina (UEL - PR). Para a produção de β -1,3-glucanases foram utilizados como fonte de carbono indutora os exopolissacarídeos curdlana e succinoglucana, de caráter comercial e a biomassa fúngica oriunda do fungo *Botryosphaeria rhodina* MAMB 05 produzida no Departamento de Química da UEL.

Produção e recuperação da β -1,3-glucanases

O fungo *T. harzianum* Rifai foi reativado em placas de Petri contendo Vogel-xilose-ágar (VXA) por 168 h a 28 °C. Em seguida foi preparado, em salina isotônica, uma solução inóculo na concentração de 1×10^6 conídios, determinado por contagem em câmara de Neubauer. A produção se deu inoculando-se 1 mL da solução inóculo em Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de substrato específico (0,15%) mais meio mínimo de Vogel, um dos tratamento contendo succinoglucana (0,15%) foi suplementado com glicose (0,10%), e então incubado a 28 °C em incubadora tipo shaker a 180 rpm por 168 h com ajuste de pH (5,5) a cada 24 h. Após decorrido o tempo, centrifugou-se a 8000 g por 35 min a 4 °C. Após a dialise do sobrenadante, o mesmo foi utilizado como fonte da enzima, conforme descrito por Bauermeister (2015) e Giese et al. (2011).

Determinação da atividade enzimática

A atividade enzimática foi determinada pela quantificação dos açúcares redutores liberados durante a hidrólise do substrato laminarina, um polissacarídeo formado por ligações β -1,3-glucana, conforme descrito por Bauermeister et al. (2015). A reação de liberação dos açúcares redutores se deu pela adição de 250 μ L do extrato enzimático obtido em cada tratamento juntamente com o polissacarídeo laminarina 150 μ L e 50 μ L de tampão acetato de sódio 0,025 M pH 4,5. Em seguida, incubou-se a 50 °C por 10 min e interrompeu a reação adicionando 50 μ L de NaOH 1,0 mol/L. Por fim, mensurou os açúcares redutores pelo método do cuproarsenato de Somogyi e Nelson. O mesmo procedimento foi realizado com a enzima comercial Viscozyme L®. A unidade de atividade de β -1,3-glucanase foi definida como o número de μ mol de açúcares redutores liberados por min por mL de extrato enzimático.

Análise de dados

Os dados obtidos foram analisados seguindo ANOVA e teste de Tukey no nível de significância de 5%, utilizando os softwares Action Stat 3 e Microsoft Excel 365.

Resultados e Discussão

Todos os substratos avaliados apresentaram resultado positivo quanto à produção de β -1,3-glicanases na presença do fungo *T. harzianum* Rifai, gráfico 1.

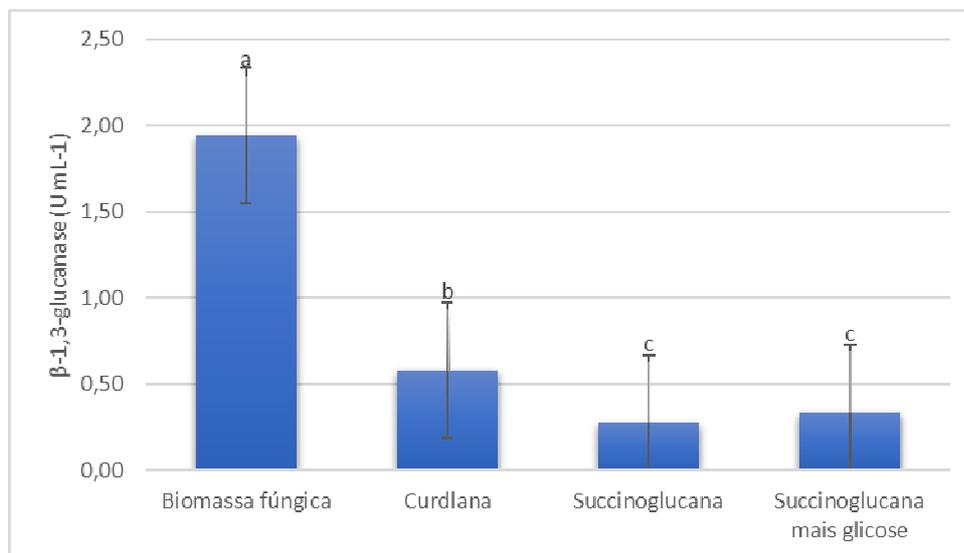


Gráfico 1. Atividade de β -1,3-glicanases sintetizadas pelo fungo *T. harzianum* Rifai em diferentes fontes de carbono expressas em número de μ mol de açúcares redutores liberados por min por mL de extrato enzimático (U). Colunas com letras diferentes indicam que há diferença significativa entre os tratamentos em nível de significância de 5%.

O melhor resultado foi obtido quando utilizado a biomassa fúngica como fonte de carbono indutora, promovendo uma atividade média de $1,95 \pm 0,06$ U. Devido as suas características como agente no controle biológico, as espécies de *Trichoderma* tendem a potencializar a síntese de β -glicanases extracelulares quando são cultivadas em meio suplementado com parede celular fúngica (RAMADA, et al. 2016).

Quando utilizado o substrato indutor curdlana, as médias de atividade enzimática foram de $0,58 \pm 0,06$ U, mostrando-se inferiores quando comparado a biomassa fúngica de *B. rhodina* MAMB 05. Entretanto, os valores encontrados ficaram dentro do descritos na literatura (GIESE et al. 2011).

Os resultados menos satisfatórios foram com o emprego da succinoglucana como substrato indutor, apresentando uma atividade média de $0,28 \pm 0,04$ U. Como trata-se de um exopolissacarídeo complexo com muitas ramificações, foi adicionado glicose (0,10%) ao meio contendo succinoglucana, com intuito de elevar a multiplicação fúngica inicial e estimular a produção de β -1,3-glicanases frente ao exopolissacarídeo testado. Entretanto, mesmo quando acrescida de glicose, não houve diferença significativa entre os tratamentos, $0,34 \pm 0,08$ U.

Não foi possível detectar atividade da enzima comercial Viscozyme L® frente ao substrato laminarina nas condições determinadas no estudo. É possível que este fato tenha ocorrido devido a Viscozyme L® tratar-se de um complexo enzimático com baixa concentração de enzimas β -1,3-glicanases, que são necessárias para

hidrolisar as ligações do polissacarídeo testado. Novos ensaios serão realizados no laboratório com maior concentração da enzima.

Conclusões

Os extratos enzimáticos analisados pela técnica do cuproarsenato mostraram que houve a produção de β -1,3-glucanases quando diferentes fontes de carbono indutoras foram utilizadas, sendo o melhor resultado obtido com a biomassa fúngica, seguido dos exopolissacarídeos curdlana e succinoglucana. Entretanto, os tratamentos com succinoglucana e succinoglucana mais glicose não apresentaram diferença significativa entre si. A enzima comercial Viscozyme L® não apresentou atividade β -1,3-glucanases quando submetida às condições estipuladas no presente trabalho.

Agradecimentos

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

Referências

GIESE, E.C. et al. **Comparison of β -1, 3-glucanase production by *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 and *Trichoderma harzianum* Rifai and its optimization using a statistical mixture-design.** Biochemical Engineering Journal, v. 53, n. 2, p. 239-243, 2011

BAUERMEISTER, A. et al. **β -1,3-Glucanases Fúngicas: produção e aplicações biotecnológicas.** Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas, Londrina, v.31, n.2, p.75-86, 2010.

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.

RAMADA, M. H. S. et al. **Secretome analysis of the mycoparasitic fungus *Trichoderma harzianum* ALL 42 cultivated in different media supplemented with *Fusarium solani* cell wall or glucose.** Proteomics, v. 16, p 477-490, 2016.

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.